

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

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	大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
研究協力者	河合高生 若林友騎、原田哲也、河原隆二 井上英耶、梅原成子 藤本直樹、大石剛史、武田直樹 清水麻衣、中川力 荻田堅一、坂野桂、秋山由美 濱夏樹、野本竜平 横田隼一郎 村山隆太郎、平垣内雅規 中村寛海 福田弘美、下迫純子 田邊純子、佐伯美由紀 西山貴士 中岡加陽子、岩下さくら	大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター 滋賀県衛生科学センター 京都府保健環境研究所 京都市衛生環境研究所 兵庫県立健康生活科学研究所 神戸市環境保健研究所 姫路市環境衛生研究所 尼崎市衛生研究所 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター 堺市衛生研究所 奈良県保健研究センター 和歌山市衛生研究所 和歌山県環境衛生研究センター

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) 法について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 法の精度管理では全 12 施設が正確な判定を行ったが、1 施設は 5 株中 3 株でエキストラバンドを検出した。結果には影響しなかったものの、誤判定につながる可能性が考えられた。PFGE 法の精度管理については 1 施設を除き概ね良好な結果であった。画像によっては解析困難な部分があり、分離されたバンドの位置が不明瞭な点を解消することが課題である。近畿 IS データベースへの登録は 2 年続けて減少したが、5 月には感染研 IS パターン番号 AA831 が、8 月には AA756 が集中して分離された。ブロック内の情報交換により、それぞれ全株または多くの株で MLVA complex の一致が確認され、いずれも同一の感染源が疑われた。一方で、AA023、AA063 および AA031 は分離時期が長期にわたっており、複数の MLVA 型が含まれることが判明した。

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重要なツールである。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するとともに、近畿 IS データベースを活用した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。

B. 研究方法

1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には、2017 年に大阪府内で分離された EHEC O157 5 株を使用し（表 1）、所定の菌株搬送容器を用いて近畿圏の地衛研 13 施設に送付した。

2. IS 法の精度管理

IS 法は、IS-printing System Version 2（東洋紡）を使用し、マニュアルに従い、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

施設毎に 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地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所森ノ宮センター（森ノ宮 C）に送付し、森ノ宮 C 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. 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、かつ 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 12 施設が参加し、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 1-12 と 1-13 の間にエキストラバンドが増幅されるが、すべての施設でエキストラバンドと正しく判定された。また、施設 8 や施設 10 では、増幅レンジよりも大きなバンドをエキストラバンドと判定していた（図 1）。

施設 1 では弱く増幅されるバンドが多い傾向があり、増幅レンジにエキストラバンドが生じないセット 2 の菌株 3、菌株 4 および菌株 5 については、エキストラバンドありと判定していた (図 2)。今回は結果の判定には影響はなかったものの、誤判定に繋がる可能性が考えられた。

また、結果は正しく判定されていたものの、コントラストが低い (施設 12 および施設 13)、バンド背景がやや高い (施設 3、図 3) といった判定の客観性を保つ上で改善を要する点が認められた。

2. 近畿 IS データベース 2017 年分離株の傾向

2017 年は 12 施設から 177 株が登録された (2018 年 1 月 12 日現在)。10 株以上登録されたタイプは 5 タイプであった (表 3、4)。このうち感染研 IS パターン番号 AA756 は 7 月下旬から 8 月に分離され、5 施設から 3 つの家族またはグループ事例を含む 16 株が登録されていた。その後の精査で、これらの株の MLVA 型は、2017 年夏に関東を中心に広域流行した 17c013 であることが判明した。近畿ブロックの感染者に直接関東地方で発生した事例と結びつく疫学情報はなかったが、7~8 月に近畿圏内にも関東地方の事例と共通する感染源が存在した可能性が推察された。また、AA831 はこれまでに見られなかったタイプで、ブロック内の情報交換により、少なくとも 8 株は MLVA 17c025 で、同一施設を原因とする食中毒事例由来株であった。一方で、AA023、AA063 および AA031 は分離時期が長期にわたっており、

複数の MLVA 型が含まれていた。

3. EHEC O157 の PFGE 精度管理

PFGE の精度管理には 11 施設が参加した。得られた 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バンドの分離が悪く、バンド自体が不明瞭なものもあった (図 4)。また、バンド (特に、低分子量のバンド) がやや不明瞭な施設 (施設 2) や、全体的にバンドがかなり薄く、不鮮明な施設 (施設 12) もみられた。

画像解析にあたっては、上記の薄いバンドのほか、バックグラウンドの汚れがバンドとして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 (図 5)、施設 5 の 2 株を除き (05-2 および 05-3)、5 種類の菌株は施設に関係なく菌株毎にクラスターを作り、その近似度は 81.5~89.2% であった。

D. 考察

近畿ブロックでは、EHEC O157 の遺伝子型別スクリーニング法に IS 法を位置づけ、2009 年から近畿 IS データベースを運用している。データベースへの登録数は 2 年連続で減少したが、5 月には AA831 が、8 月には AA756 が集中して分離された。この 2 タイプは、これまでに登録がないあるいは 1 株のみであり、IS 法は型別能力に限界があるものの、このような新規タイプが同一時期に集中して分離される場合は、同一感染源であることを強く示唆すると言える。

AA023 は過去 2 年も 10 株以上登録されていたが、8 月下旬から 9 月上旬にかけて同一 MLVA 型を示した株が複数あったことから、このような「頻発タイプ」であっても分離時期を考慮して疫学情報を交換することが望ましいと考えられた。

近畿 IS データベースを運用するにあたり、品質保証のために毎年精度管理を実施している。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 12 施設に配付した。この菌株 4 は 1-12（300 bp）は増幅されるが、1-13（269bp）は増幅されず、約 280bp のエキストラバンドが増幅されるため、1-13 との判別に注意を要する株である（図 1）。菌株 2 および 3 は 1-13 が陽性であり、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、バンド間隔が狭いと誤判定されると考えられた。しかし、今年度はすべての施設でエキストラバンドと認識され、各施設で一定の泳動条件の最適化が実施されたと考えられた。しかし、施設 1 は、電気泳動画像において太く明瞭なバンドを陽性と判定し、細く薄いバンドを陰性もしくはエキストラバンドと判定する傾向が認められた（図 2）。他施設と比べ、細くて薄いエキストラバンドが多く観察されたことから、鋳型 DNA 量が多いあるいは泳動のためのアプライ量が多いといった原因が考えられた。また、判定に支障はなかったものの、バンド背景がやや高い（図 3）、画像のコントラストが低い（図示せず）といった判定の客観性を保つ上で問題があると考えられた施設もあった。これらについては、脱色が不十分、染

色条件が悪い、ゲル作製に問題があった、または Standard DNA や Template mix に対してサンプルのアプライ量が多い等の原因が考えられ、プロトコールの細かな点の改善が必要と考えられた。

PFGE 法については、11 施設で精度管理株を 5 株使用して評価した。画像データの解像度が不鮮明な施設が複数あったが、1 施設の結果を除き、概ね良好な結果が得られた。デンドログラムでは、施設 5 で解析された菌株は、他の施設で解析された菌株よりも近似度が低くなる傾向が認められた。それ以外は約 80%以上の近似度を示した。このように、鮮明な画像データが得られないとデンドログラムでは近似度が低くなることが再確認された。良好な画像結果が得られなかったのは、菌量の過多あるいは過小、ゲルブロックの洗浄が不十分、泳動条件が悪かった、または脱色を含め染色条件が悪かった等が原因と考えられた。一方、すべての菌株でバンドが鮮明で良好な画像結果を得た施設もあったことから、施設間で技術的な差があることが考えられた。これは、PFGE の画像データを 1 施設に集約して結果を解析することの困難さを示している。今後は、施設間の技術的な差をなくし鮮明かつ均一な画像データが得られるよう、技術レベルの画一化を図る方策が必要と考えられた。あるいは、地衛研で実施する遺伝子型別法として、PFGE 法よりも技術的な差が生じにくいと考えられる、PCR 法をベースとした MLVA（Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis）法に変更し、データ解析が可能かどうか検討す

る必要性が考えられた。

E. 結論

IS-printing System (IS) 法の精度管理については、概ね良好の結果を得られた。しかし、誤判定につながる可能性が考えられる非特異増幅の不確実な判定や鮮明でない画像結果が得られたことから、プロトコールの細かな点の改善が必要と考えられた。

近畿 IS データベースへの登録は昨年より減少したが、7～8月には感染研 IS パターン番号 AA756 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。

PFGE 法の精度管理については、1施設を除き概ね良好な結果であった。鮮明な画像結果が得られなかった施設が複数あり、これまでの課題が改善されずに残っていることが考えられた。PFGE 法は施設間の技術的な差が結果に強く反映されるため、施設間の技術的要因の影響を受けにくいと考えられる MLVA 法のような新たな遺伝子型別法を検討することが必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato MP, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, Maeda E, Piérard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee KI, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T: Population structure of *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple lineages. *Microbial Genomics* 2017, 3.

2. 学会発表

- 1) 勢戸和子, 原田哲也, 若林友騎, 伊豫田淳: EHEC O165 選択分離培地の検討. 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2017年11月, 鹿児島)

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)	2017	162447	199757	17m0032
2	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2017	216957	117227	17m0034
3	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2017	183663	98543	14m0025
4	EHEC O157:H7 (VT2)	2017	203341	215274	17m0117
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2017	137741	198734	17m0223

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	Mupid-exU	100V 180min
2	6210A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	Mupid-2plus	100V 60min + 50V 30min
3	6201A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	Mupid-2plus	50V 60min + 100V 45min
4	5001A	Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	Mupid	100V 40min + 50V 25min
5	6201A	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	QIAxcel (DNA High Resolution Cartridge)	5kV 35min
6	6201A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 / Applied Biosystems veriti ThermalCycler	Mupid-2plus	50V 45min + 100V 60min + 50V 35min
8	6201A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	i-Mupid J	135V 25min + 50V 37min
9	6201A	BIOER Life Touch	GelMate2000	100V 125min
10	6201A	Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	Mupid	100V 60min + 50V 30min
11	6210A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-600	Mupid-exU	50V 45min + 100V 45min
12	6201A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	Mupid-exU	50V 120min
13	5001A	Agilent SureCycler 8800	Mupid-2plus	50V 60min + 100V 45min

表 3 2017 年分離株の主な IS 型

近畿ISコード ^a	ISパターン 番号 ^b	登録数	登録 施設数	分離時期	備考	
216959	84463	AA023	17	8	1月, 5月, 7-9月	1つの家族事例を含む
68207	84106	AA756	16	5	7-8月	3つの家族またはグループ事例を含む
249711	116975	AA063	14	7	6-9月	1つの家族事例を含む
183663	98543	AA831	10	4	5-6月	2つの家族事例を含む
137743	198734	AA031	10	2	5月, 9月, 10-11月	2つの家族またはグループ事例を含む

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

表 4 主な IS 型の判定

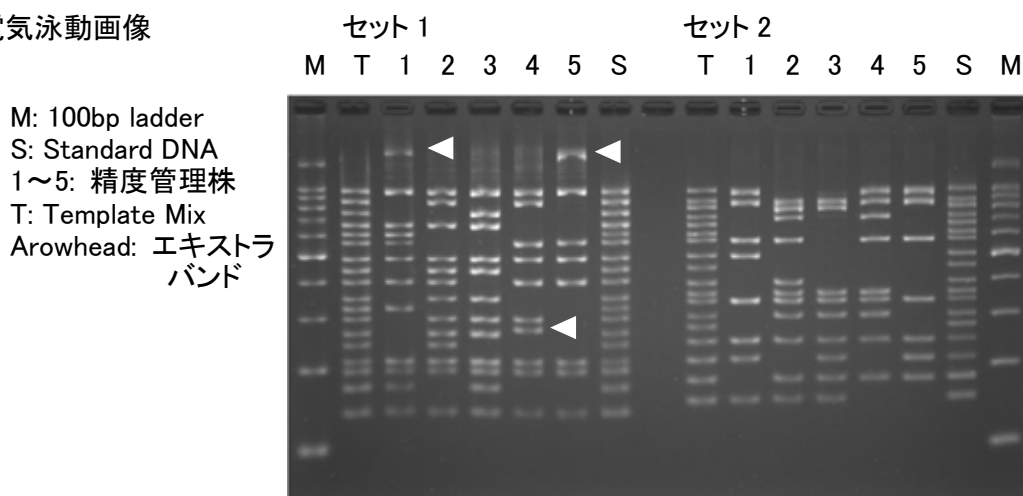
近畿ISコード ^a	ISパターン 番号 ^b	セット1 判定 ^c																セット2 判定																									
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16										
216959	84463	AA023	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
68207	84106	AA756	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
249711	116975	AA063	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
183663	98543	AA831	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
137743	198734	AA031	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0

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

c 1: 増幅あり, 0: 増幅なし

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	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	<1500
菌株2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
菌株3	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
菌株4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	280
菌株5	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	<1500

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	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
菌株2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
菌株3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
菌株4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
菌株5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	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 8)

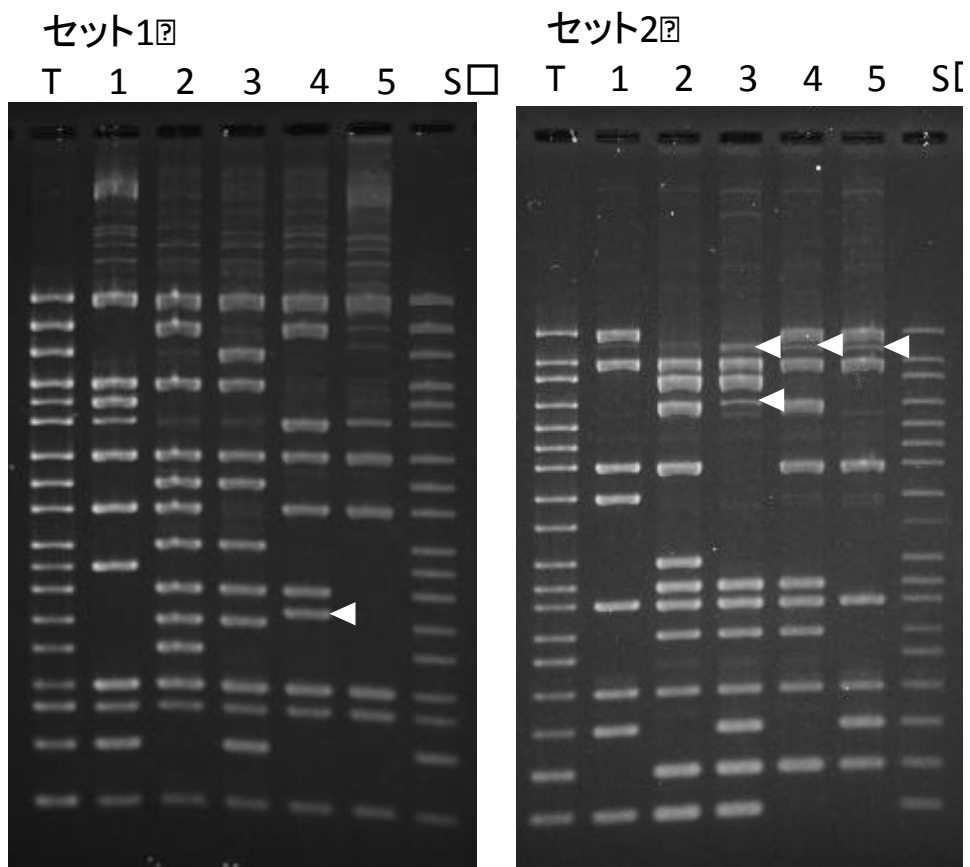


図2 IS-printing System の精度管理実施例(施設 1)

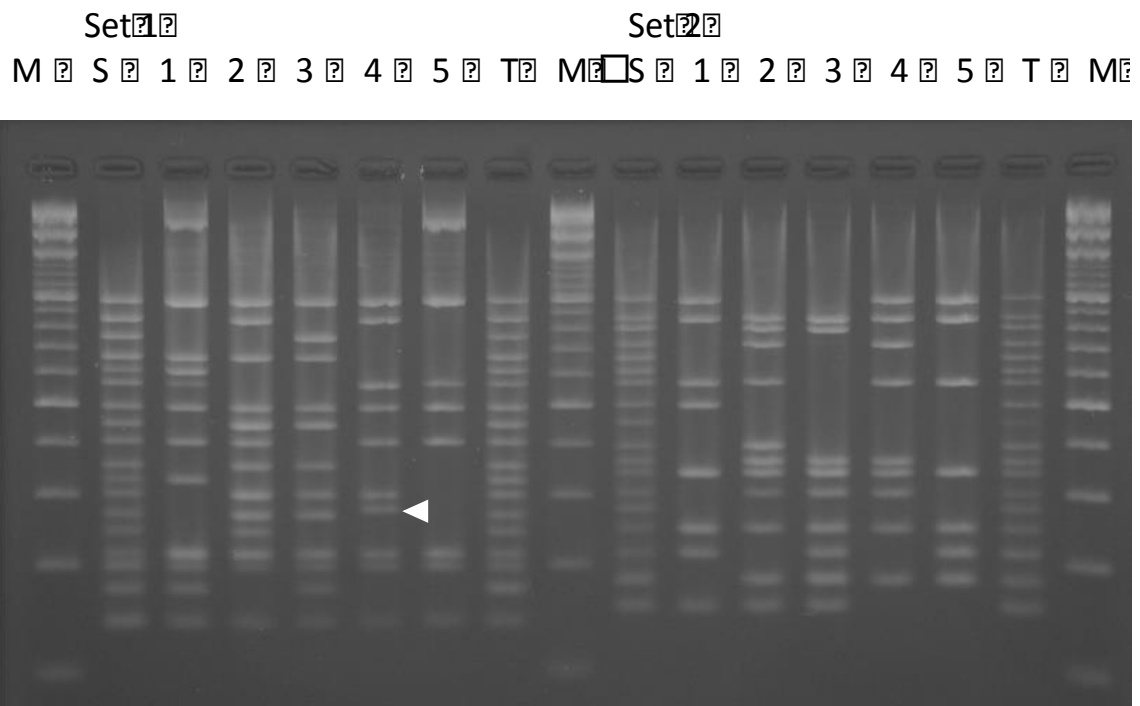


図3 IS-printing System の精度管理実施例(施設 3)

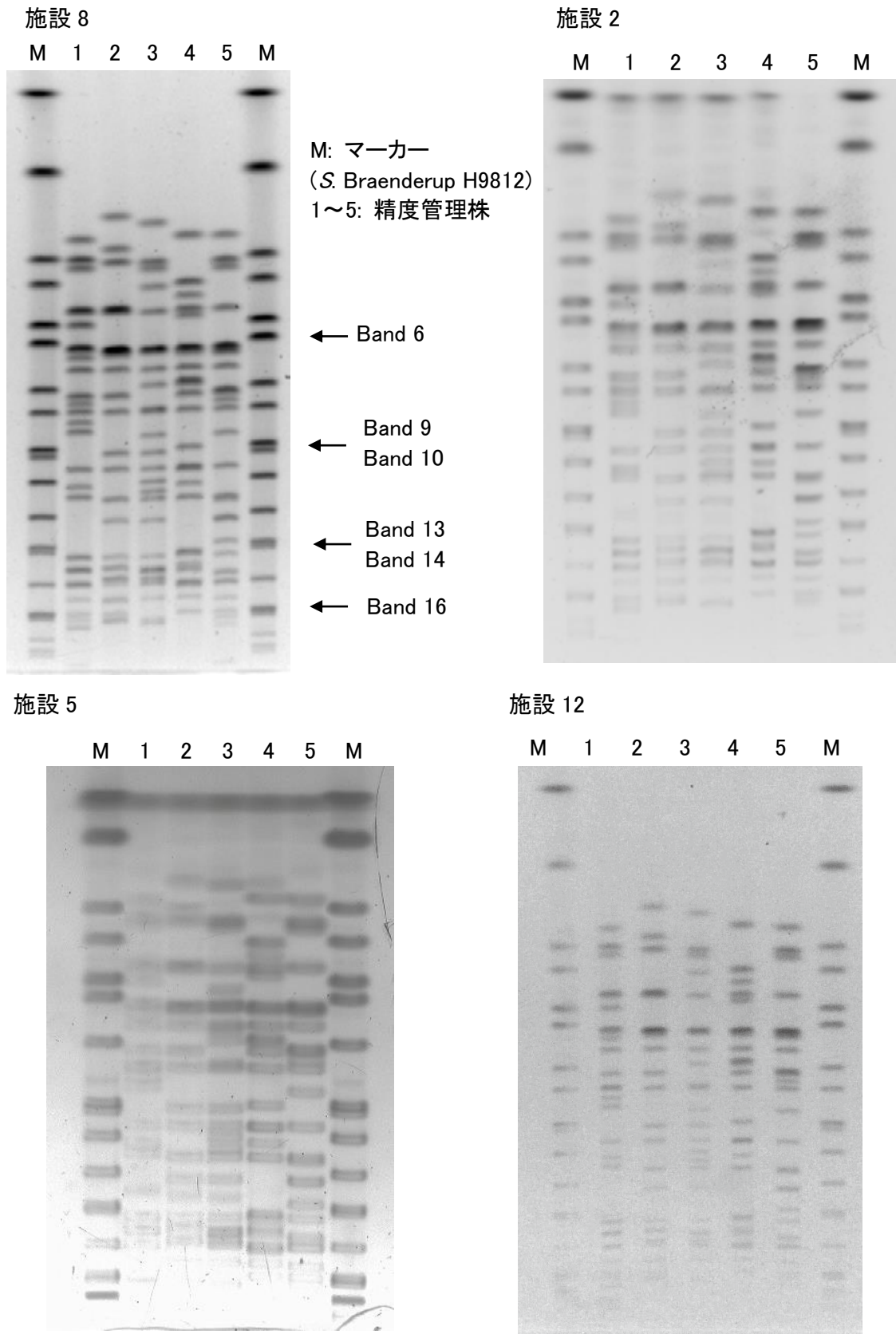


図4 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像例

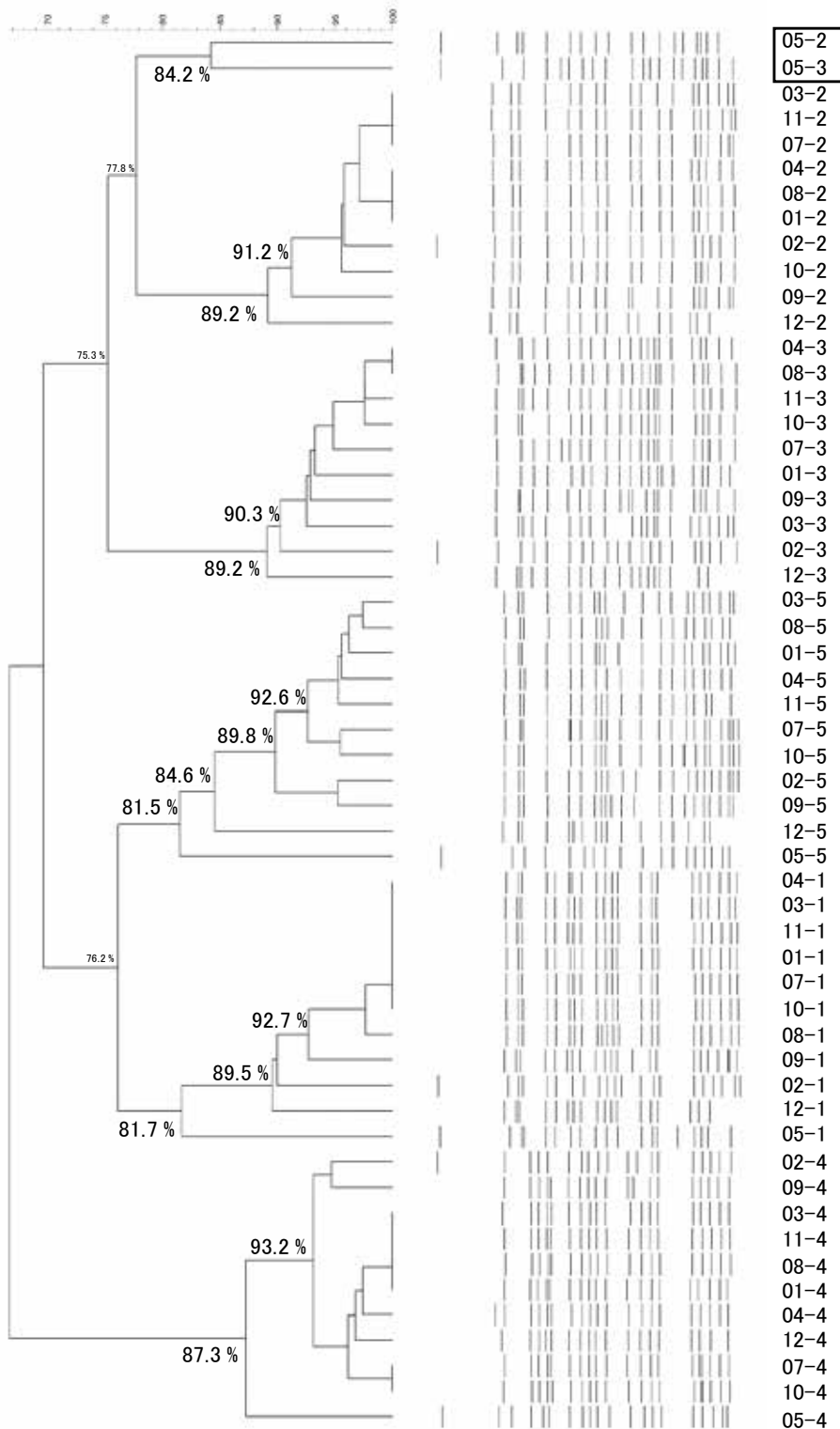


図5 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム