

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 27－29 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
	坂本裕美子	札幌市保健福祉局衛生研究所
	阿部正太郎	札幌市保健福祉局衛生研究所
	武沼 浩子	青森県環境保健センター
	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
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	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
	菊地 理慧	福島県衛生研究所
	三瓶 歩	福島県衛生研究所
	川瀬 雅雄	新潟県保健環境科学研究所
	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

平成 27 年度から平成 29 年度の 3 年間、北海道・東北・新潟ブロック内の地方衛生研究所 11 施設において、分子疫学的解析手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 の IS-Printing System について精度管理を実施した。秋田県で分離された菌株から毎年 DNA 溶液 4 種類を作製し、それを共通検体とした精度管理の結果は、いずれの施設も全体的には良好な電気泳動像が得られた。しかし、一部にはエキストラバンドの判定等に苦慮した施設もあった。施設における検査担当者の変更も頻繁にあり、検査精度を一定に保つためには技術の確

実な伝承と精度管理による評価がとても重要であると考えられた。また、ブロック内での情報共有化システム構築の基礎的検討として、平成 28 年度は各施設で分離された散発事例の株、平成 29 年度は O157 VT2 タイプの菌株の IS-Printing System による結果 (IS コード) を集積し発生パターンを調査した。秋田県においては、事例の発生の際、迅速に IS-Printing System の結果を行政へ情報提供を行う体制を構築し、平成 28 年度には冷凍メンチカツを感染源とする事例の隣県との情報共有に役立った。平成 29 年度には関東を中心に発生した O157 VT2 タイプの IS コードと秋田県内において発生した事例の IS コードを比較し、所轄の保健所を含めた関連行政部署と連携体制の構築を検討した。

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、各地で食中毒等の事例対応の検査に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 の利用が進んでいない。広域に食中毒患者等が発生した際の事例対応において、感染経路や原因食品を特定するためには、近隣の自治体との情報共有が重要であることから、北海道・東北・新潟ブロックにおける 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、各県において分離された菌株の IS コードを集積し、実際に広域に患者発生がみられる菌株の有無を調査した。

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 27～29 年度に秋田県内で分離された EHEC O157 菌株のうち、各年 4 株を共通解析菌株とし、IS-Printing System (東洋紡) の取扱説明書に従い DNA 溶液を作製、ブロック内の地方衛生研究所 11 施設に配布した。

2) IS-Printing System による解析

各施設で付属の取扱説明書に従い検査を実施した。平成 27 年度には、解析と同時に行ったアンケートにより、各施設の工夫や経験からくる泳動条件や日頃感じている疑問などを情報収集した。(図 2)

2. 広域患者発生菌株の探索

平成 28 年度は、北海道・東北・新潟ブロックの各施設から散発事例由来の 5 株程度の菌株の IS コードを集約し、同一の IS コードを示す菌株を探索した。平成 29 年度は関東を中心に発生した O157 VT2 タイプがブロック内でも発生したため、同タイプの IS コードを集約し、発生状況を調査した。

3. 秋田県における食中毒事例への試行例

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた精度管理

平成 27 年度における供試菌株 4 株の結果、11 施設中全ての施設で一致した。

(図 1) 平成 28 年度、29 年度はエキストラバンド判定結果が施設間で異なり、判定が分かれた。(図 3) 各施設の解析画像は各年度報告書を参考にされたい。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おり、それが判定結果に影響したと考えられた。平成 27 年度のアンケート調査結果では、担当者の変更が頻繁に行われている施設があることや 11 施設中 4 施設において、当該年度実施件数が 0 件など検査の現状があきらかになった。検査の工夫についても情報があり、サンプル調製時に DNA 量を一定にするためコロニーを液体培地で増菌したり、PCR の工程についても、反応液の調製を氷上で行う、検査件数が多いときは半量で行う、*eae*、*hlyA* 等のバンドが薄い場合にはアニーリング温度を 62°C に下げて実施するなどがあげられた。電気泳動の条件については、ゲル濃度やゲルサイズの調整、泳動直前までゲルと Buffer を冷却する、バンドが太い場合にアプライ量を減らす等の工夫が見られた。

2. 広域患者発生菌株の探索

ブロック内の各施設から平成 28、29 年度計 68 株の IS コード解析結果が集まった。68 株は 27 パターンに分類され、同一 IS コードを示す菌株も存在した。IS-Printing System は、迅速性に優れ、広域大規模事例の際などには解析も簡便

であり、疫学情報が一致している他の施設からの問い合わせなどに今後活用が高まると思われる。(表 1)

3. 秋田県における食中毒事例への試行例

平成 28 年 10 月に秋田県内の医療機関から検査依頼のあった菌株が EHEC O157 VT2 と同定された。結果が判明した時点で、患者が溶血性尿毒症症候群を発症していたこともあり、すでに患者は隣県の中核市の医療機関へと転院となっていたことから、感染症法による患者発生報告届も隣県に提出された。

隣県でも患者から菌株が検出されており、その菌株を国立感染症研究所にて multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による解析が行われた。その結果、静岡県沼津市で製造された冷凍メンチカツを原因食品とする食中毒事例との関連が示唆された。秋田県で分離された菌株についても IS-Printing System による解析を行ったところ、当該事例の菌株と同一の IS コードであることが判明し、これらの解析結果を行政担当部局に情報提供した。その後の疫学調査から、患者が利用している社会福祉施設においてメンチカツの喫食歴があることが判明し、当該食中毒の患者であることが確認されている。また、患者の利用していた社会福祉施設では、患者を含め 12 名がメンチカツを喫食していたが、他に感染者は確認されなかった。当該食中毒では、原因食品が広域に流通していたことから、最終的に全国で 40 人以上の患者が発生した。

近年、個人情報保護の観点から自治体間の患者情報のやり取りは難しくなっ

いるが、菌株の解析データが共有化できれば、感染経路や原因食品の特定に有用であることが改めて示された。平成 29 年度においては、関東を中心に発生した O157 VT2 タイプの IS コードの比較を行った。ブロック内でも同タイプが発生したが、国立感染症研究所より早期に IS コードの情報を得ることができていたため、迅速に関連行政機関へ情報提供を行うことが可能であった。

D. 考察

IS-Printing System の精度管理は、平成 27 年の検討では、すべての施設で解析結果が一致していたが、平成 28 年度は 4 株中 1 株において 1-12 付近のエキストラバンドを 8 施設が (+) 判定した。解析画像をみると、いずれの施設の解析結果においてもこのバンドの照度は他のバンドとそれほど大きな差はなく、バンド位置もコントロールと差がない場合もあり、解析条件によってはエキストラバンドと判定するのは困難であった。各施設の検査精度向上のためには、本研究で実施したアンケート結果をもとに、精度の高かった施設の解析条件等をブロック内で共有し、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。平成 29 年度は、同じくエキストラバンド判定での違いで結果が異なる施設があったが、バンド間を十分分離して判定することでコントロールとの差が明確になると思われる。今後、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共有化することが必要である。

ブロック内の各施設で分離された菌株の一部について広域患者発生菌株を探索したところ、複数の菌株で IS コードの一致が見られた。今回の検討では、その他の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、今後情報共有化システムが構築された際には、広域な患者発生を伴う食中毒や感染症の早期探知に IS-Printing System は有用と考えられる。本研究の成果を踏まえ、今後のブロック内での情報共有化システムの構築に向けては精度管理を重ね、さらなる検査精度の向上を図る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 の精度管理結果は、エキストラバンドについて判定で分かれたが、概ね良好であった。IS-Printing System は、広域にわたる事例発生時の病原体情報としては迅速性と有用性が高いことから、今後も精度管理で検査技術の精度を保ち、データの集積を継続する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

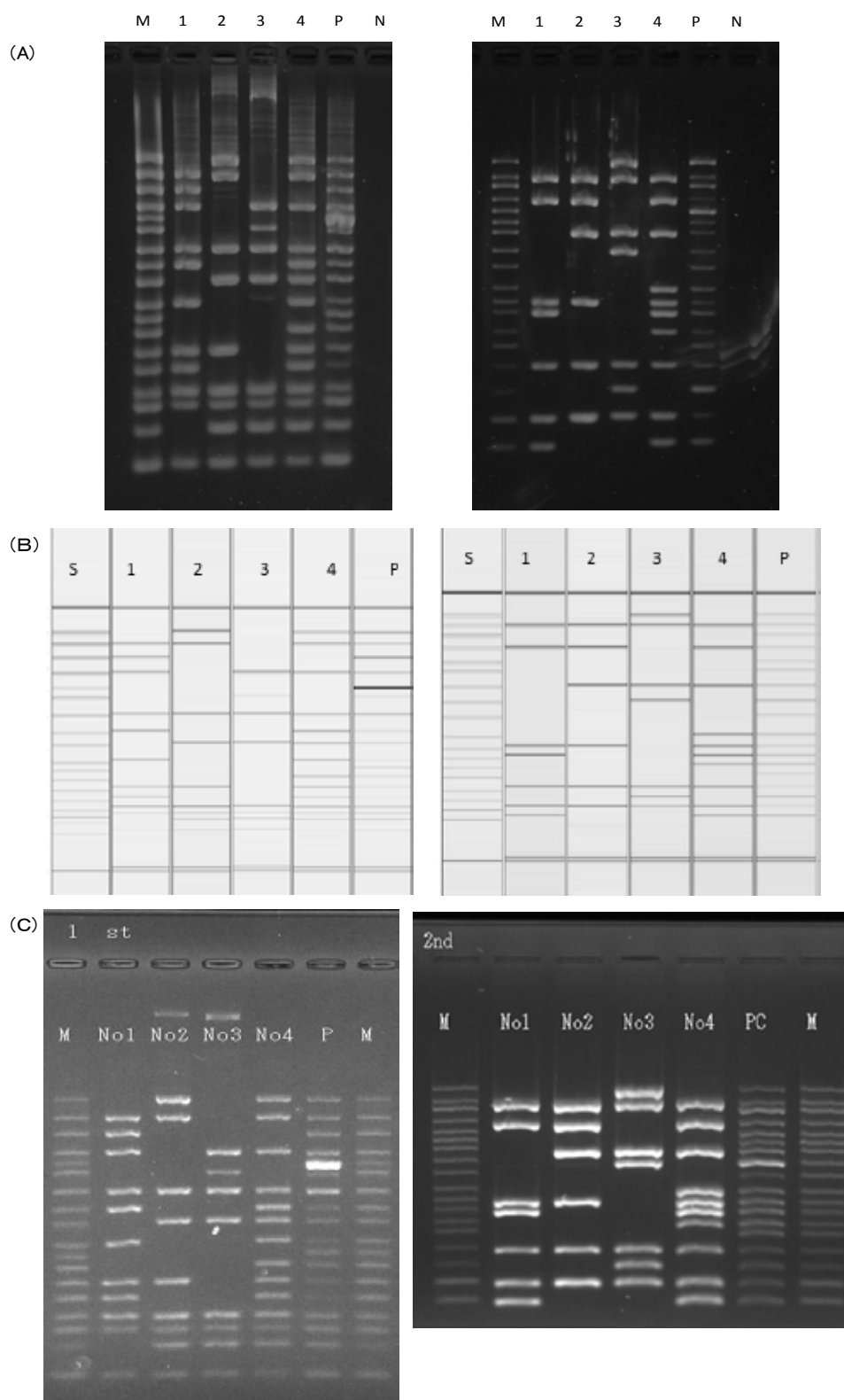
G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1 各施設の電気泳動像（平成 27 年度）



検査機器、泳動条件の違いによる様々な泳動画像より解析結果を IS コードにする

平成27年 IS-Printing キット使用時におけるアンケート調査

施設名 _____

平成 27年 月 日

- 1 細菌検査を担当して何年目ですか？
- 2 IS-Printingキットを使用するのは何年目ですか？
- 3 IS-Printingを一年間で何件位実施しますか？

- 4 サンプル調整について工夫している事はありますか？

- 5 PCR反応液の調整について工夫している事はありますか？

- 6 PCRサイクル条件について工夫している事はありますか？

- 7 電気泳動の条件について工夫している事はありますか？

- 8 バンド判定で注意が必要な事はありますか？

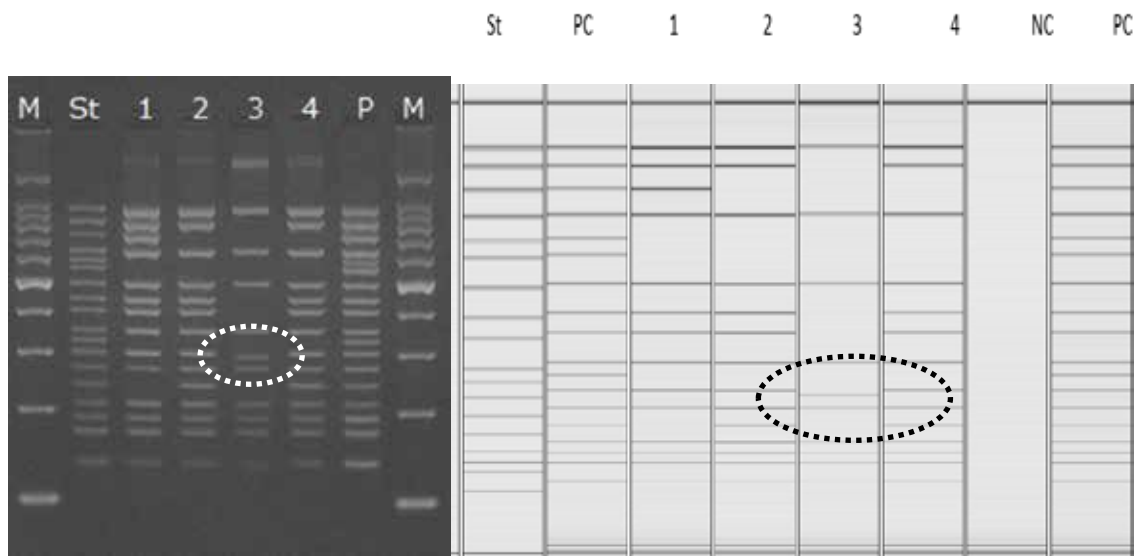
- 9 北海道・東北・新潟ブロックにおいて広域にわたる事例の際、どのようにして情報共有したら良いでしょうか？

- 10 他施設への質問やキット実施で感じた事などお書き下さい。

何でもお書き下さい。

ありがとうございました。

図 2 各施設の現状と検査状況の把握のため行ったアンケート



各施設でエキストラバンドと判定された泳動画像

1. 精度管理用配布テンプレート No.3
 2. 電気泳動ゲルから切り出したバンドより抽出
 3. 平板コロニーから直接テンプレート作成
- P. 陽性コントロール(配布テンプレート No.2)

Single PCR

1st set 1-12

CTCAGGGAGTTTAGTCTCCAGG

CCCAGTCGCAGCTGTGCTGTA size300bp

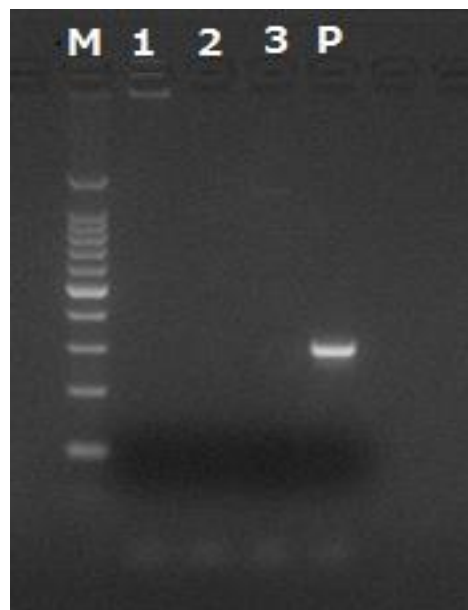


図 3 エキストラバンド疑い確認のための single PCR (平成 28 年度)

表 1 北海道・東北・新潟ブロック内 ISコード

ブロック内O157VT2タイプ株 17パターン (平成29年度)

1st set

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	eee	1-16	hlyA
1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
4	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
5	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
6	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
7	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
9	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
10	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
11	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
12	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
13	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
14	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
15	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
16	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
17	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1

2nd set

No.	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
1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
2	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
3	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
4	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
6	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
7	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
8	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
9	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
10	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
11	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
12	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
13	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
14	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
15	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
16	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
17	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0

No.4 関東を中心に発生したタイプ

No.16 3施設一致株

ブロック内他施設と一致株 10パターン (平成28年度)

1st set

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	eee	1-16	hlyA
1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
6	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
7	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
10	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

2nd set

No.	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
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
6	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
7	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
8	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
9	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
10	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1