

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、保健所及び衛生試験所）による IS-PS 精度管理および分子疫学手法活用に関する研究

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
石黒亜基子 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 11 施設（地方衛生研究所、保健所及び衛生試験所）に対して、迅速・簡便な方法として各地方衛生研究所（地衛研）で汎用されている IS-PS について 3 件の腸管出血性大腸菌 0157 抽出 DNA を用いて精度管理を実施した。また、東海・北陸ブロックで今年度分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を行った。

1. IS-PS 精度管理

1st set：検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。2nd set：検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 に関しても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設でおおよそ良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認をおこなうことが重要である。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

118 株の 0157 は 106 MLVA 型に 42 株の 026 は 37 MLVA 型に型別することが出来た。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的を用いて解析した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *Escherichia albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てが 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた。

A. 研究目的

東海・北陸ブロックはこれまでの研究班活動として、分子疫学手法である pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 及び IS-printing system (IS-PS) の精度管理を行ってきた。その結果、腸管出血性大腸菌 (EHEC) による集団事例発生時には各自治体が迅速かつ正確に PFGE 及び IS-PS を実施し、その結果を行政に還元することが可能となった。

昨年度は PFGE の精度管理を再度実施し、手技の再確認を行った。その結果、各検体の同一性は菌株 1 が 96.8%、菌株 2 は 96.5%、菌株 3 は 97.8% と何れも高く、優れた結果であった。この結果はこれまでの精度管理の成果であり各施設で食中毒事例の分子疫学解析に PFGE を使用していることによると思われた。そこで今年度は迅速・簡便な方法として各地方衛生研究所（地衛研）で汎用されている IS-PS について精度管理を実施した。

また、愛知県衛生研究所で今年度より実施可能となった 0157 及び 026 の MLVA 解析の結果、及び東海・北陸ブロックで今年度分子疫学手法を用いて解析した事例の報告も併せて行った。

B. 研究方法

1. IS-PS 精度管理

愛知県衛生研究所（愛知衛研）から 11 施設（衛生研究所 8 カ所、愛知県内中核市保健所若しくは衛生検査所 3 カ所）に 3 件の腸管出血性大腸菌 0157 抽出 DNA と試薬（IS-PS（東洋紡社））を配布した。タイムスケジュールは令和元年 11 月に抽出 DNA と試薬の配布、12 月に結果提出とし、当所で IS-PS 泳動図の解析を実施した。

配布 DNA のエキストラバンドは検体 No1 では 2 本（1-2 と 1-3 の間と 1-14 と 1-15 の間）、検体 No2, 3 はエキストラバンド 1 本（1-14 と 1-15 の間）（図 1、2）である。

2. 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. 研究結果及び D. 考察

1. IS-PS 精度管理

・1st set

検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。

・2nd set

検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。具体的には 1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 に関しても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。具体的には 1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。

使用した電気泳動装置は Multina DNA1000、QIAxcel DNA Screening Kit (AM320) 及びミニゲルであった。ミニゲルを使用した施設は 3% NuSieveGTG Agarose を使用し泳動条件は 100V・70 分であった。

以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設でおおよそ良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認をおこなうことが重要である。

2. 腸管出血性大腸菌の multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) 解析

当所においても今年度から腸管病原性大腸菌の MLVA 解析が可能となったことから保存株について実施した。その結果、118 株の 0157 は 106 MLVA 型に 42 株の 026 は 37 MLVA 型に型別することが出来た。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的を用いて解析した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *Escherichia albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てが 95%以上の同一性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた（図 3）また、2 つの食中毒事例を起こした *E.*

albertii の PFGE 型が異なっていたことからその感染源が異なることが示唆された。

なし

E. 結論

学会発表

1. IS-PS 精度管理

なし

・1st set

検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。

H. 知的財産権の出願・登録状況

・2nd set

検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 についても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。

なし

以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設でおおよそ良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認をおこなうことが重要である。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

118 株の 0157 は 106 MLVA 型に 42 株の 026 は 37 MLVA 型に型別することが出来た。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的を用いて解析した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *E. albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てが 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

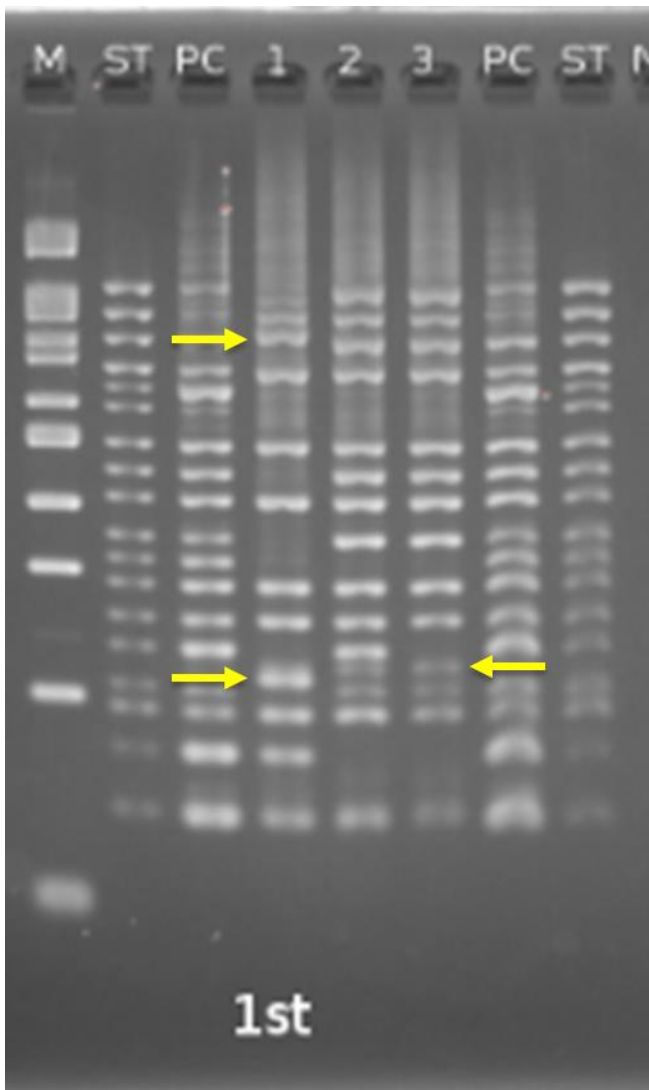


図1 配布株 IS パターン (1st set)

矢印：非特異バンド、M：分子量マーカー、ST：全バンドパターン、PC：陽性コントロール、1から3：検体

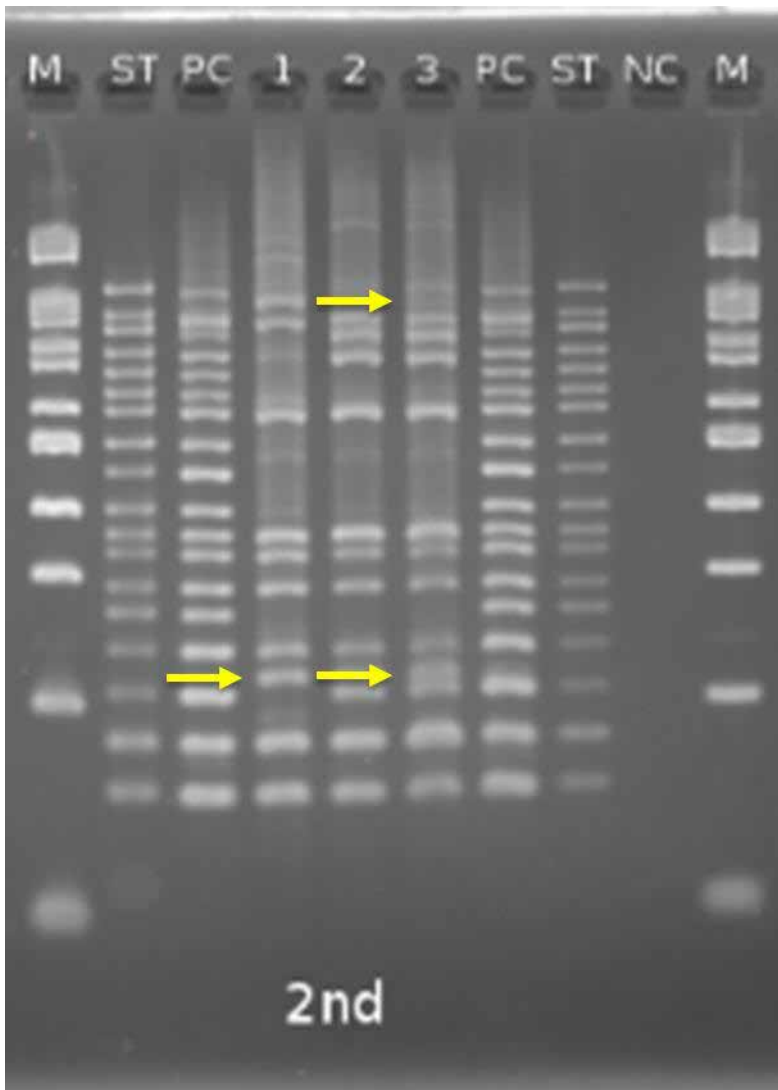


図2 配布株 IS パターン (2nd set)

矢印：非特異バンド、M：分子量マーカー、ST：全バンドパターン、PC：陽性コントロール、1から3：検体

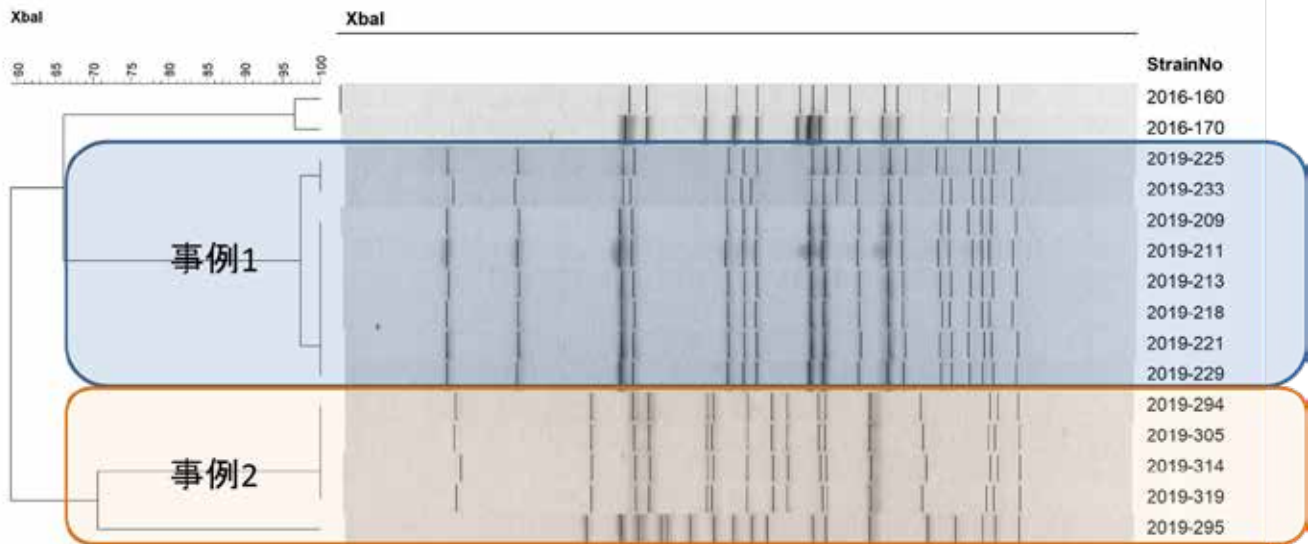


図3 *E. albertii* 集団事例の PFGE 解析