

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
(課題番号：H27－新興行政－一般－002)

平成 28 年度 総括・研究分担報告書

(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)

研究代表者 泉谷 秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

平成 29(2017)年 4 月

目次

1. 平成 28 年度総括研究報告書

| | | |
|---|-------|----------|
| 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…………… | 1 | |
| 研究代表者 | 泉谷 秀昌 | 国立感染症研究所 |

2. 平成 28 年度分担研究報告書

グループ 1：細菌

(I) 国立感染症研究所

| | | | |
|--|-------|----------|-------|
| a) 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…………… | 11 | | |
| 研究代表者 | 泉谷 秀昌 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究分担者 | 伊豫田 淳 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | 石原 朋子 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| | 李 謙一 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| | 大西 真 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| | | 地方衛生研究所 | |

| | | | |
|--|-------|----------|-------|
| b) 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…………… | 20 | | |
| 研究分担者 | 伊豫田 淳 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | 石原 朋子 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| | | 地方衛生研究所等 | |

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

| | | |
|---|-------|---------------|
| 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…………… | 29 | |
| 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 |
| | 武沼 浩子 | 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 |
| | 山田 香織 | 仙台市衛生研究所 |

| | |
|-------|--------------|
| 菊地 理慧 | 福島県衛生研究所 |
| 川瀬 雅雄 | 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 |

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

関東ブロックの食品・ヒト由来腸内細菌の解析及び精度管理に関する研究…………… 37

| | | |
|-------|-------|---------------|
| 研究分担者 | 平井 昭彦 | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 山本 和則 | 茨城県衛生研究所 |
| | 桐谷 礼子 | 栃木県保健環境センター |
| | 小林 美保 | 群馬県衛生環境研究所 |
| | 倉園 貴至 | 埼玉県衛生研究所 |
| | 平井晋一郎 | 千葉県衛生研究所 |
| | 古川 一郎 | 神奈川県衛生研究所 |
| | 松本 裕子 | 横浜市衛生研究所 |
| | 山上 隆也 | 山梨県衛生環境研究所 |
| | 井川由樹子 | 長野県環境保全研究所 |
| | 山田 俊博 | 静岡県環境衛生科学研究所 |
| | 小西 典子 | 東京都健康安全研究センター |
| | 尾畑 浩魅 | 東京都健康安全研究センター |

(Ⅳ) 東海・北陸ブロック

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等活用状況調査および情報共有に関する研究…………… 57

| | | |
|-------|-------|-------------|
| 研究分担者 | 鈴木 匡弘 | 愛知県衛生研究所 |
| 研究協力者 | 松本 昌門 | 愛知県衛生研究所 |
| | 山田 和弘 | 愛知県衛生研究所 |
| | 木全 恵子 | 富山県衛生研究所 |
| | 北川恵美子 | 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 |
| | 田中 保知 | 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 |

(V) 近畿ブロック

a) 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及び共有化システムの構築に関する研究…………… 62

| | | |
|-------|-------|----------------|
| 研究分担者 | 勢戸 和子 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| 研究協力者 | 梅原 成子 | 滋賀県衛生科学センター |
| | 坂口 初美 | 滋賀県衛生科学センター |
| | 木上 照子 | 京都府保健環境研究所 |
| | 大石 剛史 | 京都府保健環境研究所 |
| | 藤本 直樹 | 京都府保健環境研究所 |
| | 清水 麻衣 | 京都市衛生環境研究所 |
| | 吉田 有希 | 京都市衛生環境研究所 |
| | 齋藤 悦子 | 兵庫県立健康生活科学研究所 |
| | 荻田 堅一 | 兵庫県立健康生活科学研究所 |
| | 秋山 由美 | 兵庫県立健康生活科学研究所 |
| | 濱 夏樹 | 神戸市環境保健研究所 |
| | 野本 竜平 | 神戸市環境保健研究所 |
| | 横田隼一郎 | 姫路市環境衛生研究所 |
| | 村山隆太郎 | 尼崎市衛生研究所 |
| | 中村 寛海 | 大阪市立環境科学研究所 |
| | 福田 弘美 | 堺市衛生研究所 |
| | 下迫 純子 | 堺市衛生研究所 |
| | 木村 友美 | 堺市衛生研究所 |
| | 田邊 純子 | 奈良県保健研究センター |
| | 久野 翔平 | 奈良県保健研究センター |
| | 辻本 真弓 | 奈良県保健研究センター |
| | 西山 貴士 | 和歌山市衛生研究所 |
| | 金澤 祐子 | 和歌山市衛生研究所 |
| | 中岡加陽子 | 和歌山県環境衛生研究センター |
| | 若林 友騎 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 原田 哲也 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 河原 隆二 | 大阪府立公衆衛生研究所 |

(VI) 中国・四国ブロック

a) 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…………… 76

| | | |
|-------|-------|--------------|
| 研究分担者 | 中嶋 洋 | 岡山県環境保健センター |
| 研究協力者 | 佐倉 千尋 | 鳥取県衛生環境研究所 |
| | 川上 優太 | 島根県保健環境科学研究所 |
| | 福岡 藍子 | 島根県保健環境科学研究所 |
| | 河合 央博 | 岡山県環境保健センター |

| | |
|-------|---------------------|
| 仲 敦史 | 岡山県環境保健センター |
| 畑 ますみ | 岡山県環境保健センター |
| 秋田 裕子 | 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| 増田加奈子 | 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| 平塚 貴大 | 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| 千神 彩香 | 広島市衛生研究所 |
| 青田 達明 | 広島市衛生研究所 |
| 栗林 智早 | 広島市衛生研究所 |
| 坂本 綾 | 広島市衛生研究所 |
| 松室 信宏 | 広島市衛生研究所 |
| 石村 勝之 | 広島市衛生研究所 |
| 尾羽根紀子 | 山口県環境保健センター |
| 亀山 光博 | 山口県環境保健センター |
| 大塚 仁 | 山口県環境保健センター |
| 野村 恭晴 | 山口県環境保健センター |
| 市原 ふみ | 徳島県立保健製薬環境センター |
| 内田 順子 | 香川県環境保健研究センター |
| 岩下 陽子 | 香川県環境保健研究センター |
| 関 和美 | 香川県環境保健研究センター |
| 福田千恵美 | 香川県環境保健研究センター |
| 仙波 敬子 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
| 園部 祥代 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
| 高木 春佳 | 高知県衛生研究所 |
| 高橋とみよ | 高知県衛生研究所 |
| 戸梶 彰彦 | 高知県衛生研究所 |
| 松本 道明 | 高知県衛生研究所 |

| | |
|--|----|
| b) 鳥取県における IS-printing System の検討..... | 98 |
| 研究協力者 佐倉 千尋 鳥取県衛生環境研究所 | |

| | |
|--|-----|
| c) 島根県における IS printing 法による腸管出血性大腸菌 O157 の 分子疫学解析の有用性の検討..... | 104 |
| 研究協力者 川上 優太 島根県保健環境科学研究所 | |
| 福間 藍子 島根県保健環境科学研究所 | |

| | |
|---|---------------------------|
| d) 広島県で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析..... | 107 |
| 研究協力者 | 秋田 裕子 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| | 増田加奈子 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| | 平塚 貴大 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| e) 2016年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌O157株の分子疫学的解析..... | 112 |
| 研究協力者 | 千神 彩香 広島市衛生研究所 |
| | 青田 達明 広島市衛生研究所 |
| | 栗林 智早 広島市衛生研究所 |
| | 坂本 綾 広島市衛生研究所 |
| | 松室 信宏 広島市衛生研究所 |
| | 石村 勝之 広島市衛生研究所 |
| f) 2016年に山口県内で発生した腸管出血性大腸菌O26感染症の分子疫学的解析..... | 117 |
| 研究協力者 | 尾羽根紀子 山口県環境保健センター |
| | 亀山 光博 山口県環境保健センター |
| | 大塚 仁 山口県環境保健センター |
| | 野村 恭晴 山口県環境保健センター |
| g) 中四国ブロックにおける香川県内で発生したカンピロバクター食中毒事例..... | 123 |
| 研究協力者 | 内田 順子 香川県環境保健研究センター |
| | 岩下 陽子 香川県環境保健研究センター |
| | 関 和美 香川県環境保健研究センター |
| | 福田千恵美 香川県環境保健研究センター |
| h) 高知県で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析..... | 127 |
| 研究協力者 | 高木 春佳 高知県衛生研究所 |
| | 高橋 富世 高知県衛生研究所 |
| i) 腸管出血性大腸菌O26感染症事例での分子疫学的解析..... | 131 |
| 研究協力者 | 高橋 富世 高知県衛生研究所 |
| | 高木 春佳 高知県衛生研究所 |
| | 戸梶 彰彦 高知県衛生研究所 |
| | 松本 道明 高知県衛生研究所 |

(VII) 九州ブロック

a) 九州地区における効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究
—IS型別データベースの運用、EHEC検出状況、集団発生事例の集約、
精度管理(ISPS、PFGE)及びISPSエクストラバンド情報の集約— 135

| | | |
|-------|-------|---------------|
| 研究分担者 | 世良 暢之 | 福岡県保健環境研究所 |
| 研究協力者 | 岩佐奈津美 | 福岡市保健環境研究所 |
| | 有川 衣美 | 北九州市環境科学研究所 |
| | 塘 由香 | 佐賀県衛生薬業センター |
| | 川野みどり | 長崎県環境保健研究センター |
| | 江原 裕子 | 長崎市保健環境試験所 |
| | 成松 浩志 | 大分県衛生環境研究センター |
| | 福島 宏暢 | 熊本県保健環境科学研究所 |
| | 矢坂多佳子 | 熊本市環境総合センター |
| | 水流 奈己 | 宮崎県衛生環境研究所 |
| | 穂積 和佳 | 鹿児島県環境保健センター |
| | 高良 武俊 | 沖縄県衛生環境研究所 |
| | 濱崎 光宏 | 福岡県保健環境研究所 |
| | カール由起 | 福岡県保健環境研究所 |
| | 岡元 冬樹 | 福岡県保健環境研究所 |
| | 西田 雅博 | 福岡県保健環境研究所 |
| | 重村 洋明 | 福岡県保健環境研究所 |

グループ2：ウイルス

(I) ロタウイルスのRNA-PAGE泳動パターンによる流行株分類法の検討 149

| | | |
|-------|-------|----------------------|
| 研究分担者 | 片山 和彦 | 北里大学生命科学研究所・国立感染症研究所 |
| 研究協力者 | 藤井 克樹 | 国立感染症研究所 |

(II) “GatVirusWeb” ウェブサイトの構築 155

| | | |
|-------|-------|--------|
| 研究分担者 | 三瀬 敬治 | 札幌医科大学 |
|-------|-------|--------|

3. 研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 28 年度) 159

平成 28 年度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 28 年度総括研究報告書

「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」

研究代表者 泉谷秀昌 国立感染症研究所細菌第一部第二室長

研究要旨：

食品由来感染症における原因物質である細菌やウイルスが保有する病原体情報、すなわち分子疫学解析から得られる遺伝子情報は、疫学情報とともに、流行株を把握し、感染原因を究明し、感染拡大を阻止する上で重要である。実際の感染症対策および施策にあたっては当該病原体情報を効率よく効果的に共有することが肝要である。腸管出血性大腸菌 (EHEC) に関し、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)、IS-printing system および multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) の各解析法について検討、データベースの構築、精度評価などを行った。IS 法は現在地方衛生研究所 (地衛研) において最も積極的に活用されている方法であることが示された。精度管理の実施を通して明らかとなった IS 法における判定補助のため、エキストラバントなど泳動像に係る情報収集を行った。PFGE は感染研および各地衛研で、MLVA は主として感染研で実施されており、各地域もしくは全国的な広域株の把握、集団事例への対応などに活用された。広域株に関する情報共有は電子メールによる回覧および食中毒調査システム NESFD 掲示板など活用した。

ウイルスでは、カリシウェブから発展させた下痢症ウイルス分子疫学データベースツールである、GatVirusWeb (GVW) の改良、安定稼働を推し進めた。これまでに約 10 万件のデータを収集した。OS 改訂に伴う対応を行った。検索ツールおよび情報取得環境の改善を行った。ロタウイルス RNA-PAGE のバンドパターンから分類アルゴリズムを開発し、GVW への実装を検討した。

研究分担者

グループ 1：

熊谷優子 (秋田県健康環境センター)
平井昭彦 (東京都健康安全研究センター)
鈴木匡弘 (愛知県衛生研究所)
勢戸和子 (大阪府公衆衛生研究所)
中嶋 洋 (岡山県環境保健センター)

世良暢之 (福岡県保健環境研究所)

伊豫田淳 (国立感染症研究所)

研究協力者：大西 真、石原朋子、李謙一
(国立感染症研究所) および各地方衛生研究所等関係者 (各研究分担報告書を参照)

グループ 2：

片山和彦 (北里大学)

三瀬敬治 (札幌医科大学)

A. 研究目的

食品由来感染症において、細菌では腸管出血性大腸菌 (EHEC) などが、ウイルスではノロウイルスなどが毎年流行を繰り返している。これらの病原体には多様なバリエーションが存在し、その流行型は毎年変化している。本研究では分子疫学解析の開発・評価・精度管理、当該解析法に基づく病原体情報の収集およびデータベース化、ならびに当該病原体情報の効率的、効果的な共有化を行うためのシステムの開発を柱としている。本研究によって流行株の把握、ならびに広域事例における感染源の究明及び感染拡大の防止に貢献することを目指している。

B. 研究方法

対象となる病原体別に本研究班を 1) 細菌、2) ウイルスの二グループに分け、それぞれの班を中心に病原体検査法の開発、評価及びネットワークの構築を行う。各グループでの研究方法について以下に述べる。

1) 細菌グループ ; a) 日本全国の地方衛生研究所 (地研) を 6 ブロックに分け、各ブロック内の地研で分離菌株 (腸管出血性大腸菌 0157 等) に対する PFGE 解析及び 0157 については IS-printing system (IS 法) の精度管理を継続した。b) 平成 22 年度に立ち上げた BioNumerics サーバーの環境整備を継続した。c) EHEC 0157 の IS 法オンラインデータベースに関しては、平成 23 年度までの厚生労働科学研究事業で構築してきたデータベースを基盤に、データの拡充を行った。d) 分担研究者の統括ブロックにおいて、発生事例に応用した PFGE 或いは IS 法

によるデータベース構築を検討もしくは継続した。さらに、データベースを活用して集団発生事例等に対応した。e) EHEC 0157、026、0111 に関して multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による解析の運用を検討した。f) PFGE、IS 法等の得られた結果を迅速に共有するため、電子メール配信および食中毒調査システム (NESFD) 掲示板を使用した。g) EHEC 分子疫学解析の手法について、地衛研における実施状況を把握するためのアンケートを実施した。

2) ウイルスグループ ;

ロタウイルス (RV) は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。RV 感染患者の便検体から RNA を抽出し、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いて分離した。得られたバンドパターン画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積を行った。すべての検体について、次世代シーケンスシステムを用いたウイルスゲノムの塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定してパターンライブラリーに蓄積した。相関値の算出は、泳動パターンの長鎖部分 (上部)、中鎖部分 (中部)、短鎖部分 (下部) に分け、electrophoregram のフィッティング処理を行った後、その相関係数をそれぞれ算出した。

オンライン下痢症ウイルスデータベース (GatVirusWeb) の構築、改良及び維持管理を行う。ユーザーから提案される改良案等の案件に関して、データベースウェブサイトに掲載を行い、テストドライブにてパブリックベータ版をユーザーに評価させる。実際のユーザーからのリクエストをウ

ウェブサイトと併設している掲示板を通じて入手し、リクエストを反映させつつウェブサイトの実態を図る。さらに、現状のユーザーを把握するため、アクセスモニターを施行し、利用状況に応じたウェブ管理、改変を実施する。

C. 研究結果

細菌グループ；

1. 感染研における研究

BioNumerics (BN) server によるオンラインシステムのデータベースの継続的な運用を行った。2016年に分離された EHEC について MLVA および PFGE 解析を行い、その遺伝子型別に基づいて分離株の動向について調べた。EHEC 0157 1397 株、026 607 株、0111 57 株について MLVA 法を用いて解析し、それぞれ、527、196、29 のタイプが同定された。このうち、2 株以上検出された型は 0157 で 190 (36%)、026 で 92 (47%)、0111 で 11 (38%) であった。解析した EHEC 株のうち、5 地研以上で検出された MLVA コンプレックスもしくはタイプに含まれる株は 668 株であった。当該コンプレックスは 0157 20 種類、026 1 種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは 0157 で 1 種類、026 で 1 種類であった。複数の地研で同一の MLVA 型を示す株、もしくはコンプレックスに含まれる株が検出された場合には関係機関、もしくは研究分担者を介して情報を提供し注意喚起を行った。広域株には集団事例に関連するものも含まれたが、一方で疫学的な関連性が不明の株もあり、今後も引き続き病原体情報の迅速な提供、共有について検討の必要があると考えられた。

2016年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を行い、そのパターンに基づいて各 0 群における分離株の動向について調べた。EHEC 0157 の 429 株、026 の 183 株については、それぞれ 296、146 種類のサブタイプが付与された。0157、026、0111 以外の 0 群の EHEC のうち、検出頻度の高い 0 群として、0103 は 57 種類、0121 は 25 種類、0145 は 19 種類、091 は 17 種類、0115 は 8 種類、0128 は 9 種類、08 は 10 種類の PFGE パターンが確認された。これらの PFGE パターンのうち、5 つの 0 群 (0103、0121、0145、0115、05) において、2 ヶ所以上の地方衛生研究所等で検出された同一 PFGE パターンが 13 種類確認された。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロック内の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) 0157 IS-Printing System 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。さらに、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、各県で分離された菌株の IS-Printing System のデータを集積し発生パターンを調査した。また、平成 28 年度は冷凍メンチカツを原因食品とする食中毒が広域に発生し、ブロック内でも患者発生が確認された。その際、IS-Printing System による解析が、関係機関との情報共有に有用であった。

【病原体情報の疫学調査への活用例の報告 (以下、追加事例報告等) : 秋田県】

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

精度管理は、検査・解析レベルの維持、向上を目的として実施される。平成28年度も共通菌株を用いて PFGE 法、IS 法の精度管理を行った結果、いずれも良好な成績であった。しかし、PFGE 法では画像が若干不鮮明なもの、IS 法ではエキストラバンドの報告が無いものがあった。

アンケート調査の結果、各施設では分子疫学解析を行政活用した事例を数多く経験しており、他施設との共同により広域事例を明らかにした事例も多くあることが判明した。

IS 法および MLVA 法の導入と手技の統一を目的として、標準プロトコルの作成について検討を行った。

【追加事例報告等：東京都、千葉県、横浜市など】

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 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. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

すべての地研から予定どおりの IS-printing 型が得られた。昨年度多く見られた *hly* の増幅不良は見られなかった。今年度の精度管理サンプルを昨年度使用した IS-printing 試薬のロットで試験したところ、*hly* の増幅が悪く、ロット間差によるものとみられた。

3. 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-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

5. 近畿ブロック

腸管出血性大腸菌 0157 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) 法の信頼性確保の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 11 施設中 2 施設で誤判定があり、正確な判定には、18 本の陽性対照バンドが十分な間隔で識別できる電気泳動画像と慎重な判断が必要であることを再認識した。PFGE 法の精度管理については概ね良好な結果であったが、画像によっては解析困難な部分があり、未消化バンドや薄いバンドあるいは極端に太いバンドの解消が課題である。近畿 IS データベースへの登録は昨年より減少したが、7 月には感染研 IS パターン番号 AA024 が急増した。ブロック内の情報交換により、一部の感染者については 7 月 2 日および 7 月 8 日に同一施設を利用しており、感染研 MLVA タイプも一致することが判明した。これまでのデータの蓄積から、IS 法は菌株によって

エキストラバンドが増幅されることがわかっており、近畿 IS データベース登録株についてエキストラバンド情報を整理した。判定に影響があると考えられるサイズのエキストラバンドは、セット 1、セット 2 合わせて 22 か所に 643 本が登録されていた。特に運動性陰性株 (O157:HNM) は、セット 1 で約 800bp のエキストラバンドが増幅されることが多く、1-03 との判別に注意が必要であると考えられた。

6. 中国四国ブロック

食品由来感染症の広域発生事例においては、事例由来株の分子疫学解析結果等を共有・比較する必要がある。このため、中四国地域の各施設における分子疫学解析手法の技術の維持と解析精度の向上や、将来的に解析データや疫学情報を用いたデータベースを構築し利用可能にすることを目的として、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 菌株を用いた IS-printing System、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) 及び multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA 法) による精度管理を、実施した。その結果、多くの施設が良好な結果であったが、一部施設では検査法の改良・工夫や技術の習熟が必要と思われた。

平成 28 年度に中四国地域で発生した EHEC による感染事例について、IS-printing system 等による分子疫学解析データや疫学情報を収集し解析した結果、7 種類の IS コードの菌による感染事例の発生が、複数の県で確認された。このうち、疫学的な関連が確認された 2 事例を含めて 5 事例では、MLVA 法による解析結果も一致していた。広域発生事例の疫学解析に重要

である分子疫学解析結果等を用いたデータベース構築に向け、今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になるものと思われる。

【追加事例報告等：鳥取県、島根県、広島県、広島市、山口県、香川県、高知県】

7. 九州ブロック

九州地区では、1. IS-printing System (以下、IS 法とする) による IS 型別データベースの運用、2. 腸管出血性大腸菌 (以下、EHEC) 検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約、4. 精度管理 (IS 法、PFGE) 及び 5. IS 法で発生したエキストラバンド情報の集約の 5 項目について取り組んだ。

九州地区における腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157EHEC) の IS 型別の登録数は平成 28 年 12 月現在で 1602 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 229 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 224 件、平成 26 年度 206 件、平成 27 年度 204 件及び平成 28 年度 198 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。九州地区で平成 28 年度に収集された EHEC は 471 株であった。その内訳は、O157EHEC が 227 株、O26 EHEC が 164 株、O111 EHEC が 18 株、O103 EHEC が 17 株、O121 EHEC が 9 株、O91 EHEC が 6 株、O145 EHEC が 6 株、その他の血清型が 16 株及び血清型別不能が 8 株であった。九州地区は非 O157EHEC の占める比率 48.2% であり、本研究で O157EHEC に加えて非 O157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。平成 28 年度の O157EHEC 及び 非 O157EHEC による集団発生事例は 11 事例であった。その内訳は、O157EHEC によるものが 5 事例で、O26EHEC によるものが 6 事

例であった。精度管理では昨年度に引き続き IS 法、PFGE について実施した。IS 法では、エキストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、11 地衛研の各担当者が判定したバンド数で、全 4 株一致した地衛研は 1 地衛研のみであった。ほとんどの地衛研が 0~3 本相違であり、昨年度と比べると相違数が少なくなっていた。一致しなかったのは、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

8. ブロックアンケート結果

EHEC の分子疫学解析手法 PFGE、IS 法および MLVA について各地衛研での実施状況をアンケート形式で情報収集した。PFGE 実施率は 74%で、このうち（ほぼ）全株試験している地衛研は 34%であった。同様に、IS 法実施率は 88%（うち全株試験は 68%）、MLVA 実施率は 15%（うち全株試験は 80%）であった。全体としては昨年度と変わらなかったが、なかには実施状況に変化が見られた地衛研もあった。

ウイルスグループ；

ロタウイルス（RV）は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。RV 感染患者の便検体から抽出した RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動（RNA-PAGE）すると、その分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することが可能である。この泳動パターンは遺伝子型や株によって異なるため、検体間のウイルスの類似性を推定する事も可能である。我々は、RNA-PAGE によるパターン分

類をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA に適応させ、MultiNA 泳動パターンフィッティング解析によって算出される相関係数を用いた株分類法の開発を進めている。本研究班では、このパターンフィッティングソフトウェアと標準株のパターンをウェブページ上に公開し、全国の地方衛生研究所からアクセスしてオンラインでロタウイルスの遺伝子型分類、株分類が可能なシステム構築を進めた。

ロタウイルス遺伝子データベースおよび遺伝子型判定システムを CaliciWeb に加え、新たに GatVirusWeb として運用するべく Web site の構築、維持、開発を行う。具体的には、これまで運用してきたカリシウイルスデータベース&配列検索システムに、NoroNet norovirus genotyping system へのリンクを加え、さらにロタウイルスでは、RNA-PAGE によるパターン分類をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA に適応させ、MultiNA 泳動パターンフィッティング解析によって算出される相関係数を用いた株分類法の搭載準備を進めた。本年度は過去三年間で倍増したデータに対応し、今後搭載されるロタウイルスのパターンフィッティングソフトウェアへの対応へも対応するため、サーバー環境の刷新を行った。

D. 考察

食品由来感染症の病因物質である細菌やウイルスの病原体情報、すなわち分子疫学解析によって得られる遺伝子等の情報は、患者の疫学情報とともに、感染原因究の明や感染拡大の阻止などの感染症対策を講じるために重要な要素である。

分子疫学解析による得られた病原体情報を具体的な対策に結び付けるために、当該病原体情報を共有化することも重要な工程の一つである。

本研究班においては closed network 上に病原体情報のデータベースを利用するシステム、すなわちウイルスでは GatVirusWeb、細菌ではパルスネットの構築および運用を進めた。また、細菌グループではより迅速かつ積極的に病原体情報を共有すべく、電子メールおよび NESFD 掲示板などのルートも情報共有のあり方の一つとして推し進めた。今後もこれらの情報共有システムを継続的に運用し、システムの向上につなげることが重要である。

本年度も病原体情報から全国および各ブロックならびに各自治体において流行把握ならびに食中毒および行政指導などの行政対応に結び付いた事例報告がなされた。報告にはメンチカツ喫食による広域事例等も含まれた。事例対応については日頃からの検査体制および病原体情報の共有化システムの整備があって初めて可能となるため、継続的な運用が必要である。

解析手法のアンケートから、現在 EHEC 0157 の解析において IS 法が重要な位置を占めていることが示唆された。一方で、各ブロックにおける精度管理の結果から泳動像の判定、エキストラバンドの取り扱いなどに関して、問題点も指摘された。IS 法は市販キット化されているが、電気泳動等の使用機器によって結果の判定に影響が出ることが示された。IS 法について泳動像の判定精度を向上・維持するため、エキストラバンドに関する情報収集を行った。収集した情報を集約し、利用可能な形にすること

が重要である。

地衛研では担当者の交代も頻繁にあるため、解析技術の精度維持は病原体情報ネットワークの構築に不可欠な要素である。そのためには、本研究のような継続した精度管理の運用が必要と考えられる。

MVLA を導入したことでよりリアルタイムに近いサーベイランスが可能になりつつある。MLVA は IS 法と同様、結果がデジタル形式なので情報共有がしやすい。いくつかの地衛研においては MLVA が実施されており、今後感染研の結果と照合するとともに、データをやり取りすることで病原体情報の収集ならびに共有化が一層早められることが期待される。

一方で、類似株をまとめた MLVA コンプレックスが複雑なものもあった。地域別、型別の検出状況の整理を行ったが、情報提供の仕方については今後も検討の余地があると考ええる。

ロタウイルス RNA-PAGE は迅速かつ簡便なロタウイルスの解析法として本研究班の前身より検討を始めた新規システムである。本解析法は糞便から直接かつ迅速に泳動パターンを取得し、細菌の分子疫学解析における PFGE 法のように泳動パターンを比較することでデータベース化を図れる手法である。MultiNA を用いることで泳動パターンの安定化を図りラボ間アッセイを可能にした。泳動パターンの解析ツールを開発し、株判定システムの正答率を実用レベルにした。

ノロウイルス、サポウイルスなどのカリシウイルスに特化した CaliciWeb から、他の下痢症ウイルス情報も統合した GatVirusWeb の構築を進めている。上記ロ

タウイルス RNA-PAGE 法の実装に向けて準備を始めた。ウイルス遺伝子データベースは年々増加の一途をたどっている。GVW でも同様であり、病原体情報を収集するオートパイロットプログラムにより、データベース上にはこれまでに 8 万以上のデータが収集されている。より効率よく目的とする遺伝子を検索できるようにするためのプログラムの改善を図っている。今後も国内外の下痢症ウイルス情報共有の重要な場として機能を充実させていく予定である。

E. 結論

病原体情報取得のための技術開発、データの蓄積ならびに情報の共有は感染症対策において必須である。

EHEC 感染症においては病原体の解析手法も主要な 3 種類の技術 (PFGE、IS、MLVA 法) を含めて多様化してきており、それぞれの分解能、利便性、迅速性等の特徴を把握することは、病原体情報の事例対応への活用に重要である。

よりリアルタイムに近い事例探知および解析に向けて、その精度を確保すべく精度管理およびそれに基づくデータベースの構築、さらに効果的な情報共有が重要である。情報共有のあり方も含め、各々の解析手法に係る各工程において検討および改善を図っていくことが重要である。

ウイルスの GatVirusWeb (前 CaliciWeb) では、広範なウイルスを対象に病原体情報の収集及び解析プログラムの実装などが進められている。新たな機能として RNA-PAGE 法によるロタウイルスデータベースの搭載が視野に入ってきた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1. Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. J Med Microbiol. 2016 Sep;65(9):1007-12.
2. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T: Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Front. Microbiol. 2016, 7:765.
3. Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. Microbiol Immunol 60, 609-616, 2016.
4. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, and Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, 2016. Genome Announcements, vol. 4 (5) e01099-16, 2016.

5. Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K. Functional receptor molecules CD3001f and CD3001d enable murine norovirus to internalize into host cells. Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 11;113(41):E6248-E6255., 2016.
6. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. Sci Rep. 2016 Jul 7;6:29400. doi: 10.1038/srep29400.
7. Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan. DOI: 10.7883/yoken. Jpn J Infect Dis. 2016 Jun 30. [Epub ahead of print]
8. Suzuki Y, Doan H. Y., Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K. Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan. Microbiol and Immunol. 60, 418-426, 2016.
9. Doan HY, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon-Tanaka N, and Katayama K. Genetic analysis of human rotavirus C: the appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries. Infect Genet Evol. 2016 Apr 9;41:160-173. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.027. [Epub ahead of print]
10. 泉谷秀昌、黒木俊郎、林賢一、齊藤志保子、八柳潤、今野貴之、大西真：*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4:b:-株の解析。日本感染症学雑誌、第90巻、652-656、2016年
11. 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真：2015年に分離された腸管出血性大腸菌O157、O26およびO111株のMLVA解析について。IASR、第37巻、93-95、2016年
12. 勢戸和子、原田哲也、田口真澄、河原隆二、久米田裕子、田邊純子、福田弘美、中村寛海、松原弘明、泉谷秀昌：近畿の飲食チェーン店で発生した食中毒が疑われる腸管出血性大腸菌 O157 事例。IASR、第 37 巻、89-90、2016 年。

2) 学会発表

1. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2015年における腸管出血性大腸菌 O157・O26・O111 の分子疫学解析。第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月、東京都。

2. 泉谷秀昌:腸管出血性大腸菌の MLVA 解析。平成 28 年度希少感染症診断技術研修会、2017 年 2 月、東京都。
3. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真: 2015 年の Non-0157/026/0111 腸管出血性大腸菌における分子疫学解析 第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月、東京
4. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、李謙一、大西真:2015-2016 年における EHEC 広域 PFGE 型の発生動向 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2016 年 11 月、富山
5. 平井晋一郎、横山栄二:腸管出血性大腸菌 0157 の subclade 8a 及び 8b における Stx2 産生性の比較、第 20 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会、2016 年 11 月、富山県
6. 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 伊豫田淳: Non-0157 STEC の検査法—大阪府公衛研の経験を中心に— 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2016 年 11 月、富山県
7. 田口真澄, 河原隆二, 原田哲也, 勢戸和子: 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向. 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2016 年 11 月、富山県

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 28 年度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

「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」

研究分担報告書

| | | | |
|-------|-------|----------|-------|
| 研究代表者 | 泉谷秀昌 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | 伊豫田 淳 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | 石原朋子 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | 李 謙一 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | 大西 真 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | | 地方衛生研究所 | |

研究要旨 BioNumerics (BN) server によるオンラインシステムのデータベースの継続的な運用を行った。2016 年に分離された EHEC について MLVA および PFGE 解析を行い、その遺伝子型別に基づいて分離株の動向について調べた。EHEC 0157 1397 株、026 607 株、0111 57 株について MLVA 法を用いて解析し、それぞれ、527、196、29 のタイプが同定された。このうち、2 株以上検出された型は 0157 で 190 (36%)、026 で 92 (47%)、0111 で 11 (38%) であった。解析した EHEC 株のうち、5 地研以上で検出された MLVA コンプレックスもしくはタイプに含まれる株は 668 株であった。当該コンプレックスは 0157 20 種類、026 1 種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは 0157 で 1 種類、026 で 1 種類であった。複数の地研で同一の MLVA 型を示す株、もしくはコンプレックスに含まれる株が検出された場合には関係機関、もしくは研究分担者を介して情報を提供し注意喚起を行った。広域株には集団事例に関連するものも含まれたが、一方で疫学的な関連性が不明の株もあり、今後も引き続き病原体情報の迅速な提供、共有について検討の必要があると考えられた。

A. 研究目的

細菌性食品由来感染症への対応においては、患者から分離された菌株の解析から得られる病原体情報に基づいた菌株同士の類縁性の比較、さらに食品等の推定原因材料からの分離菌株の病原体情報との比較、そして得られた情報の迅速な共有化が重要である。

こうした病原体情報という科学的エビデ

ンスに基づく事例対応および感染症対策に資するため、病原体情報に関する解析手法並びに情報共有化システムの構築が本研究の目的である。

本研究では特に EHEC 感染症の中でも発生頻度の高い 3 大血清群 (0157, 026, 0111) を対象に、新規に導入された multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) 法を用いて解析し、類縁菌株の情報

取得、複数の機関で検出される所謂広域株の解析、及び情報共有について検討を行った。

B. 研究方法

平成 28 年に感染研に送付された腸管出血性大腸菌に対して PFGE 解析および MLVA を行った。解析結果のデータベース化を BioNumerics (Applied Maths 社)により行った。結果については、電子メールにより菌株送付機関に還元した。広域事例が疑われる場合には、必要に応じて、電子メールにより全国 6 ブロックの研究分担者を介して各地方衛生研究所への配信および／もしくは、食中毒調査支援システム (NESFD)において情報共有を行った。

MLVA については Izumiya ら (2008)に記載の遺伝子座を用いて、PFGE については Pulsenet International に準拠した方法で解析した。なお、PFGE 解析の詳細については研究分担者 (伊豫田) の報告書を参照されたい。

C. 研究結果

平成 26 年度より EHEC3 大血清群 (0157、026 及び 0111) については MLVA を実施し、その一部について PFGE 解析を実施している。(なお、本結果は平成 28 年分離株で平成 29 年 2 月 22 日におけるものである。)

1. MLVA

EHEC 0157 1397 株、026 607 株、0111 57 株を MLVA で解析した。それぞれ、527、196、29 のタイプが同定された。このうち、2 株以上検出された型は 0157 で 190 (36%)、026 で 92 (47%)、0111 で 11 (38%) であった。

2. 広域株の解析

MLVA では、得られた型から関連が疑われるタイプ同士をコンプレックスとして包括している。平成 28 年分離、解析した EHEC 株のうち、5 地研以上で検出された MLVA コンプレックスもしくはタイプに含まれる株は 668 株であった。このうちコンプレックスは 21 種類 (0157 が 20 種類、026 が 1 種類) であり、コンプレックスに含まれない広域タイプとしては 2 種類 (0157 で 1 種類、026 で 1 種類) であった (表 1 および表 2)。

このうち、関与した機関数の多い上位 5 種類のコンプレックス 16c010、16c008、16c027、16c059、16c026 の検出状況ならびに MLVA 型に基づく minimum spanning tree は図 1 に示すとおりである。このうち、16c027、16c059、16c044 はそれぞれ、7 月、10 月、8 月に発生した広域集団事例関連株を含んでいた。

3. 広域株に関する情報提供

複数地研で共通の MLVA タイプもしくはコンプレックスが検出された場合には、検出菌株リストおよび MLVA 型間の関係を示す minimum spanning tree (MST) をまとめ、関係機関に還元した。必要に応じて IS-printing system および PFGE 解析に関する病原体情報を収集し、NESFD 内掲示板ならびに全国 6 ブロックの研究分担者を介した各ブロックの地研への情報提供を行った (図 2)。一定以上の菌株から成る広域株については、MLVA 型及び地域別の発生状況についても情報提供を行った (図 3)。

D. 考察

平成 26 年度から稼働し始めた EHEC3 大血清群の MLVA の結果から、集団事例、家族内事例における病原体情報の一致もしくは類

似が認められ、本法の事例解析の有用性が示された。

上記事例関連株および散発事例株において2株以上検出されたMLVAタイプは全タイプの4割程度であった。これは菌株数にして約7割となり、病原体情報から、互いに何らかの関連性を有していることを示唆している。

MLVAの結果は広域株の探知にもつながった。5地研以上から検出されたMLVAコンプレックス/タイプは0157で20種類、026で1種類であった。広域株には集団事例関連株も含まれた。各事例において病原体解析結果によって関連性が示され、事例の全体像の把握ならびに行政対応につながった。また、広域株には互いの疫学的関連性が不明の菌株も含まれており、病原体情報の迅速な解析と還元および共有をより一層推し進める必要があると考えられる。

リアルタイムに分離菌株を解析していくに当たり、コンプレックスの中には16c008、16c010などのように、含まれる型数が10を超える複雑なものもあった。そこで、MLVA型別、発生地域別の情報を考慮した情報提供を行った。今後も、病原体の解析から情報還元、情報共有までの工程の迅速化を推し進め、よりよい病原体共有化について検討していく必要があると考えられる。

E. 結論

EHEC感染症におけるMLVA法を活用することで、より迅速に病原体情報が獲得され、その情報還元および共有が図られることが期待された。

現在EHEC感染症ではMLVA法、IS-PS法、およびPFGE法が利用されている。今後も各

解析法の長所を生かし、迅速な情報共有に結び付けて感染源の究明に努めることが肝要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. J Med Microbiol. 2016 Sep;65(9):1007-12.

2. 泉谷秀昌、黒木俊郎、林賢一、齊藤志保子、八柳潤、今野貴之、大西真：
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar 4:b:-株の解析。日本感染症学雑誌、第90巻、652-656、2016年

3. 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真：2015年に分離された腸管出血性大腸菌0157、026および0111株のMLVA解析について。IASR、第37巻、93-95、2016年5月

2) 学会発表

泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2015年における腸管出血性大腸菌0157・026・0111の分子疫学解析。第37回日本食品微生物学会学術総会、2016年9月、東京都。

泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌のMLVA解析。平成28年度希少感染症診断技術研修会、2017年2月、東京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

表 1. 2016 年広域コンプレックス検出状況 (5 機関以上)

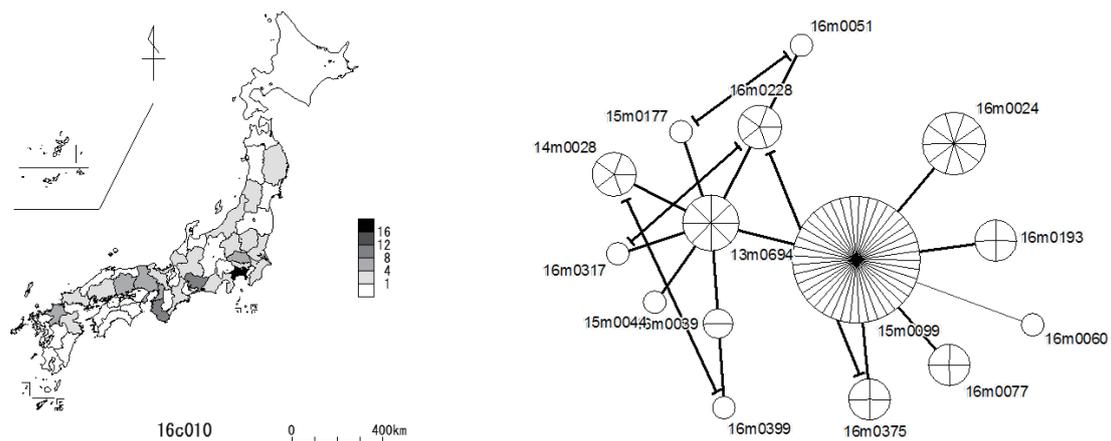
| コンプレックス | 株 | 機関 | 都道府県 | O 群 | VT 型 |
|---------|----|----|------|------|---------|
| 16c010 | 89 | 33 | 25 | O157 | VT1+VT2 |
| 16c008 | 97 | 25 | 19 | O157 | VT1+VT2 |
| 16c027 | 33 | 18 | 14 | O157 | VT2 |
| 16c059 | 59 | 15 | 8 | O157 | VT2 |
| 16c026 | 21 | 14 | 13 | O157 | VT1+VT2 |
| 16c204 | 64 | 11 | 11 | O26 | VT1 |
| 16c038 | 24 | 10 | 10 | O157 | VT2 |
| 16c011 | 20 | 10 | 9 | O157 | VT2 |
| 16c021 | 18 | 9 | 8 | O157 | VT2 |
| 16c029 | 18 | 9 | 6 | O157 | VT2 |
| 16c013 | 18 | 9 | 8 | O157 | VT1+VT2 |
| 16c025 | 22 | 7 | 6 | O157 | VT2 |
| 16c036 | 13 | 7 | 6 | O157 | VT1+VT2 |
| 16c039 | 12 | 7 | 6 | O157 | VT2 |
| 16c081 | 9 | 7 | 5 | O157 | VT2 |
| 16c044 | 55 | 6 | 6 | O157 | VT1+VT2 |
| 16c051 | 10 | 6 | 6 | O157 | VT1+VT2 |
| 16c049 | 7 | 6 | 6 | O157 | VT2 |
| 16c046 | 13 | 5 | 5 | O157 | VT2 |
| 16c052 | 8 | 5 | 3 | O157 | VT2 |
| 16c048 | 6 | 5 | 5 | O157 | VT1+VT2 |

表 2. 2016 年広域 MLVA 型検出状況 (5 機関以上、表 1 コンプレックスに含まれない型)

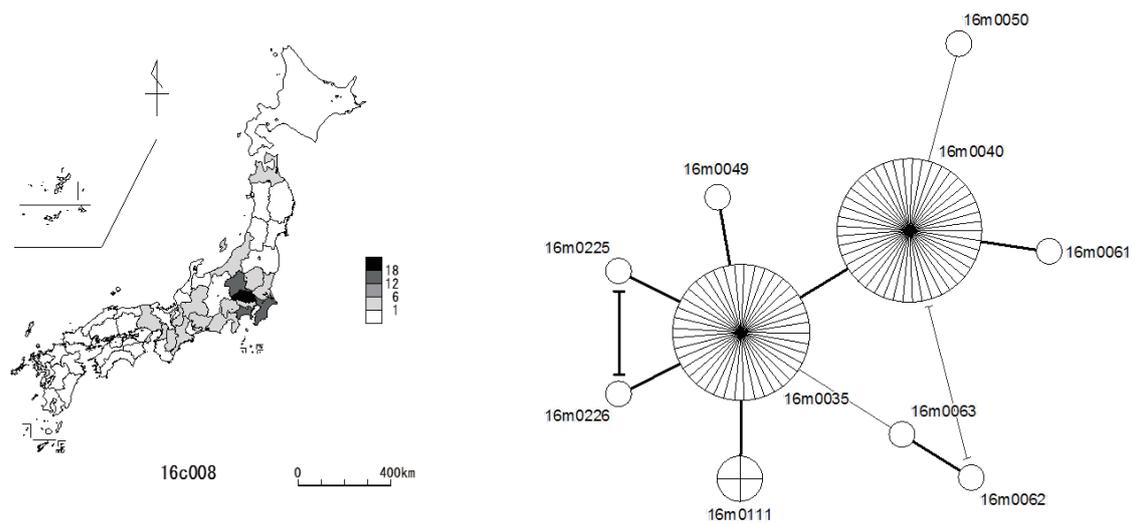
| MLVA 型 | 株 | 機関 | 都道府県 | O 群 | VT 型 |
|---------|----|----|------|------|---------|
| 16m2012 | 17 | 8 | 7 | O26 | VT1 |
| 16m0095 | 35 | 7 | 5 | O157 | VT1+VT2 |

図1. 広域コンプレックス株の分布状況（左：塗りつぶしの濃さで表示）ならびにその MST（右）

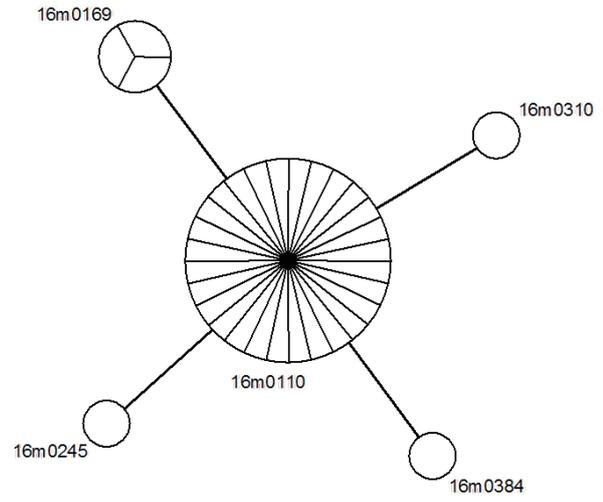
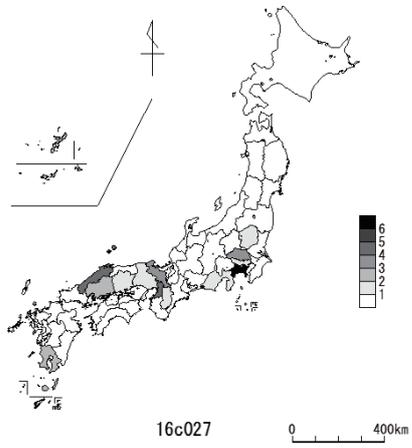
a) 16c010



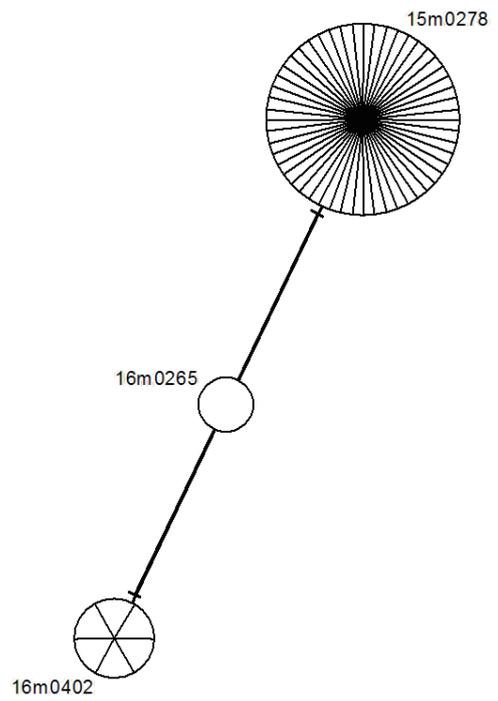
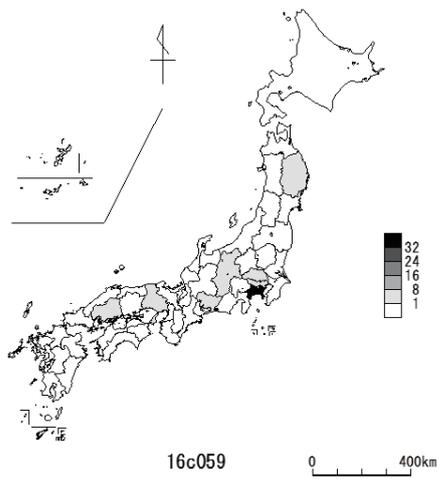
b) 16c008



c) 16c027



d) 16c059



e) 16c026

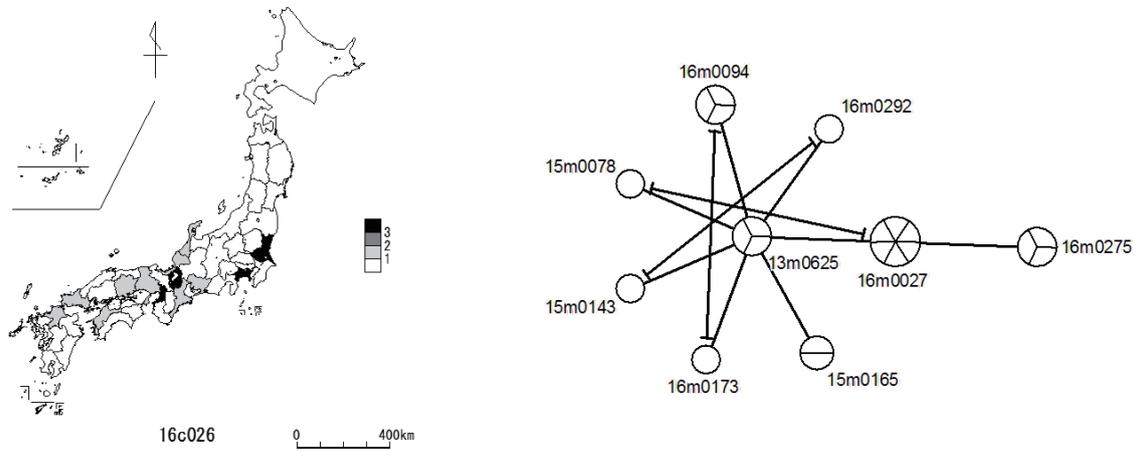


図 2. 広域株パルスネット回覧例 (左上：検出状況、右上：IS-PS 情報、左下：MLVA 情報、右下：PFGE 情報)

O157 VT2 MLVAコンプレックス16c027
検出状況(9月9日現在)

| Key | date | source | MLVA Type | MLVA Comp |
|-------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 18Shizuoka-V1010* | | Shizuoka | 16m0110 | 16c027 |
| cor101004 | 2010-08-10 | Osaka c | 16m0110 | 16c027 |
| cor101105 | 2010-08-01 | Osaka | 16m0110 | 16c027 |
| cor101100 | 2010-08-05 | Osaka | 16m0110 | 16c027 |
| cor101204 | 2010-08-09 | Tochigi | 16m0110 | 16c027 |
| cor101201 | 2010-08-09 | Chiyama | 16m0110 | 16c027 |
| cor101209 | 2010-08-09 | Saitama c | 16m0110 | 16c027 |
| cor101311 | 2010-08-10 | Yokohama | 16m0110 | 16c027 |
| cor101312 | 2010-08-10 | Yokohama | 16m0110 | 16c027 |
| cor101313 | 2010-08-10 | Yokohama | 16m0110 | 16c027 |
| cor101314 | 2010-08-22 | Yokohama | 16m0110 | 16c027 |
| cor101323 | 2010-08-04 | Osaka | 16m0110 | 16c027 |
| cor101323 | 2010-08-02 | Hirogo | 16m0110 | 16c027 |
| cor101404 | 2010-08-12 | Shimane | 16m0110 | 16c027 |
| cor101405 | 2010-08-15 | Shimane | 16m0110 | 16c027 |
| cor101400 | 2010-08-15 | Shimane | 16m0110 | 16c027 |
| cor101407 | 2010-08-17 | Shimane | 16m0110 | 16c027 |
| cor101410 | 2010-08-10 | Kyoto c | 16m0110 | 16c027 |

(※: 静岡県産肉用牛乳等検出状況からのデータ数によるもので)

関連株のISパターン(例)

| primer set 1- | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Size (bp) | 974 | 839 | 742 | 645 | 595 | 561 | 496 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 185 | 171 | 137 |
| 判定 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| primer set 2- | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Size (bp) | 987 | 893 | 803 | 730 | 642 | 599 | 535 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 303 | 278 | 240 | 213 | 183 | 151 |
| 判定 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |

(1-02の下にエキストラバンド)
(1-12の下にエキストラバンドが出る場合がある)
(set 1で 1kb以上のエキストラバンドが出る場合がある)

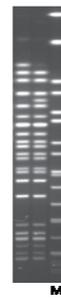
(沖縄県衛生環境検査所よりご提供いただきます)

16c027株のPFGE泳動像(例)

MLVA型16m0110における
各遺伝子座のレポート数

| MLVA型 | hskrA | O157-34 | hmc1 | hmc2 | O157-9 | hmc5 | O157-3 | O157-19 | hmc3 | hmc4 |
|---------|-------|---------|--------|---------|---------|---------|--------|---------|-------|------|
| 16m0110 | hskrA | h11-14 | h11-11 | O157-17 | O157-36 | O157-19 | hmc-6 | O157-17 | hmc-7 | |
| 16c027 | | -2 | 02 | 03 | -2 | 05 | -2 | 08 | -2 | |

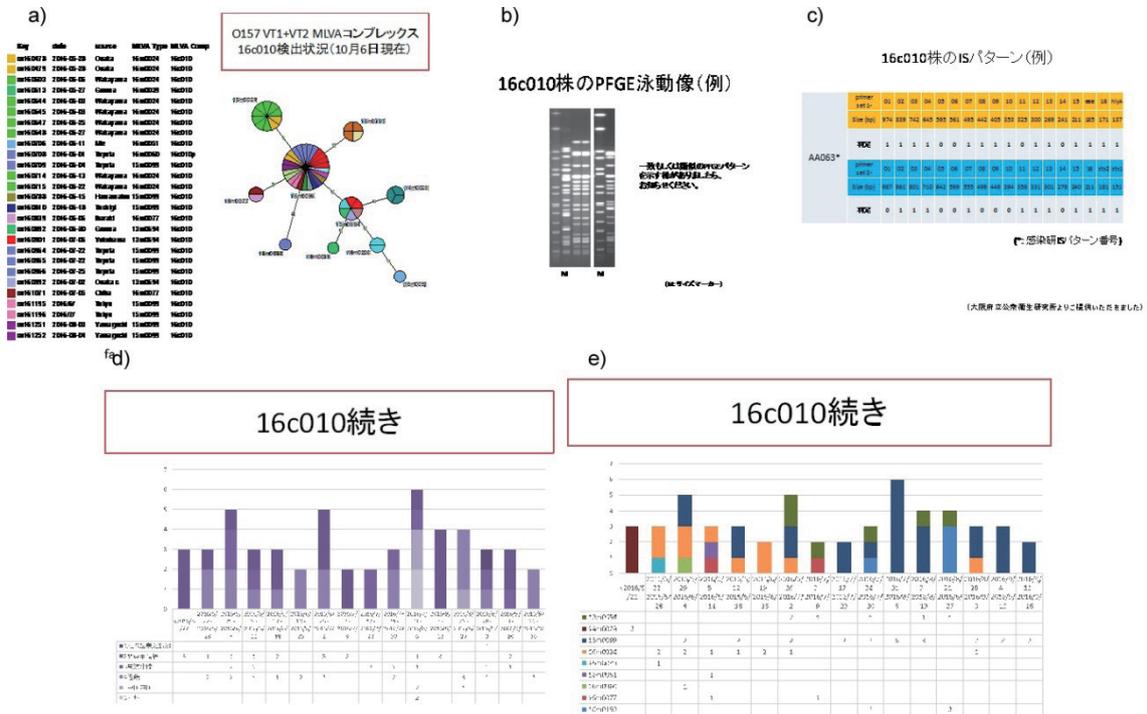
(-2:増幅産物なし)



一致もしくは類似のPFGEパターンを示す株がありましたら、お知らせください。

(M:DNAサイズマーカー)

図3. 広域株パルスネット回覧例2 (a) 検出及びMLVA-MST情報、 b) PFGE情報、 c) IS-PS情報、 d) 検出状況(ブロック別)、 e) 検出状況(MLVA型別)



厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
「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」

(H27-新興行政-一般-002)

研究分担報告書

研究分担者 伊豫田 淳 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究協力者 石原 朋子 (国立感染症研究所 細菌第一部)、
地方衛生研究所等

研究要旨

2016年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を行い、そのパターンに基づいて各 O 群における分離株の動向について調べた。EHEC 0157 の 429 株、026 の 183 株については、それぞれ 296、146 種類のサブタイプが付与された。0157、026、0111 以外の O 群の EHEC のうち、検出頻度の高い O 群として、0103 は 57 種類、0121 は 25 種類、0145 は 19 種類、091 は 17 種類、0115 は 8 種類、0128 は 9 種類、08 は 10 種類の PFGE パターンが確認された。これらの PFGE パターンのうち、5 つの O 群 (0103、0121、0145、0115、05) において、2 ヶ所以上の地方衛生研究所等で検出された同一 PFGE パターンが 13 種類確認された。

A. 研究目的

食品由来の細菌感染症の調査において、患者および食品・食材由来株の解析から得られた科学的データが関係機関内で迅速に共有されることが重要である。感染研・細菌第一部では、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学的解析について、分離株数の多い 3 つの O 群 (0157、026、0111) については 2014 年度より multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を優先的に導入しているため、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析はその他の O 群 (non-0157/026/0111) を優先的に実施している。本研究では PFGE 法による解析結果を関係機関で共有することで、当該事例の早期

探知、拡大阻止に結びつけることを目的とした。

B. 研究方法

2016年に国内で分離され、国立感染症研究所(感染研)に送付された EHEC に対して PFGE 解析を行った。PFGE 解析は Pulsenet International に準拠した方法を用いて実施し、解析結果のデータベース化については BioNumerics (Applied Maths 社) により行った。non-0157/026/0111 EHEC については、解析結果を電子メールにより菌株送付機関に還元した。広域事例が疑われる場合には、必要に応じて、電子メールによる全国の地方衛生研究所等(地衛研)もしくは事例に関連する地衛研が属する地域ブロック

(北海道東北新潟、関東甲信静、東海北陸、近畿、中国四国、九州(沖縄を含む))の各地衛研への配信や、食中毒調査支援システム(NESFD)における公開によって情報共有を行った。

C. 研究結果

1. 0157、026 及び 0111 の EHEC

感染研に送付された2016年分離株のうち、0157、026 及び 0111 については MLVA による解析を優先して実施しているため、一部の菌株(0157 429 株、026 183 株、0111 31 株)で PFGE 解析を実施した。0157 と 026 については、デンドログラムによるサブタイピング(感染研において継続的に実施しているサブタイプの付与)を行った。0157 では 296 種類のサブタイプが同定され、うち 252 種類が 2016 年に新規に同定された。026 では 146 種類のサブタイプが同定され、うち 135 種類が 2016 年に新規に同定された(2016 年 2 月現在)。

2. non-0157/026/0111 EHEC

感染研に送付された2016年分離株のうち、non-0157/026/0111 は 307 株で、0 群は 46 種類であった(表 1)(2017 年 2 月現在)。non-0157/026/0111 の 0 群は検出頻度の高い順に 0103 (93 株)、0121 (48 株)、0145 (25 株)、091 (17 株)、0115 (11 株)、0128 (11 株)、08 (10 株)であり、これらの菌株の PFGE パターンは、それぞれ 0103 57 種類、0121 25 種類、0145 19 種類、091 17 種類、0115 8 種類、0128 9 種類、08 10 種類であった(表 1)。0103、0121、0145、0156 の菌株については、2015 年以前に検出された PFGE パターンが 1 種類以上存在したが、non-0157/026/0111 の多くの PFGE パターンは

2016 年に初めて検出されたパターンであった。各 0 群のデンドログラムにおいては、家族内感染事例ならびに疫学関連事例由来株等がクラスターを形成した。

広域で共通 PFGE パターンを示す株(広域株と呼ぶ)の検索を行った結果、2ヶ所以上の地衛研で検出された同一 PFGE パターンは 5 つ 0 群(0103、0121、0145、0115、05)において 13 種類が確認された。これら 13 種類の PFGE パターンには、広域 PFGE 型(2ヶ所以上の地衛研で検出された同一 PFGE パターンの型別)の Type No. を付与した(表 1-2、図 1-5)。広域 PFGE 型は、0103 で 8 種類、0145 で 2 種類、0121、0115、05 で各 1 種類あり、すべて 2016 年に初めて検出された PFGE パターンであった。0103 の広域 PFGE 型のうち TN103m2 および TN103m3 は、それぞれ同一県内の 2 地衛研で検出され、それぞれ家族内感染事例であった(表 2、図 1)。広域 PFGE 型 TN121m1 株は、0121 株全体の 37.5%(48 株中 18 株)を占め、4ヶ月間(6-9月)に東海北陸、関東甲信静、近畿ブロック内の 7 地衛研において検出された(表 2、図 2)。0145 の 2 つの広域 PFGE 型株は、それぞれ 1 地衛研管轄内で発生した集団発生事例由来株とその他の地衛研管轄内で発生した散发事例由来株により構成されたが、集団発生事例と散发事例間の関連は不明であった(表 2、図 3)。

3. 食品由来株とヒト由来株の比較解析

2016 年 7 月に検疫所におけるモニタリング検査の結果、韓国産白菜キムチから EHEC 0103 が検出され、当該株が感染研に送付された。当該株の PFGE 解析を実施し、データベースとの照合を行った。また、随時更新されるデータベースとの照合を継続した結果、現時点(2017 年 2 月現在)

で、ヒト由来株中に同一 PFGE パターンは検出されなかった。

4. 解析結果の共有

複数の地衛研で共通パターンを示す株について、構成菌株の情報（検出が確認された地衛研、菌株数、PFGE パターンの泳動像など）を関係機関と情報共有した。また、先述の韓国産白菜キムチ由来株の PFGE 泳動像等関連情報について、全国の地衛研へ情報提供を行うとともに、解析の更新情報を関係機関と情報共有した（図 6）。

D. 考察

0157、026、0111 については、2014 年度から MLVA を主体とした解析システムが導入され、MLVA の解析結果から関連が疑われる株など、一部の菌株に限り PFGE 解析が行われている。0157、026、0111 の 2016 年分離株の PFGE 解析結果は、PFGE データベースの拡充と活用に使われたほか、関係機関と共有可能な情報として活用された。今後も、同様な解析結果の活用が適切であると考えられる。

non-0157/026/0111 については、分離頻度の高い 0 群 0103、0121、0145 で複数の広域 PFGE 型が存在することが明らかとなった。一方、091 は毎年比較的高い分離頻度を示すが、前年と同様に広域 PFGE 型は検出されず、広域株発生の可能性が低いことが示唆される。

0146 は、2013 年以降広域 PFGE 型 TN146k1 株の流行が示唆されたが、現時点（2017 年 2 月現在）では 2016 年分離株中に当該株は認められず、本解析から流行は収束に向かっていることが推測される。

05 の 2016 年分離株数は比較的少ないが、4 株中 3 株が広域 PFGE 型 TN5m1 を示した（表 1、図 5）。TN5m1 は、前年に九州ブロック内の 3 地衛研において検出された TN5L1 の類似パターンであり、TN5m1 が検出された地衛研は TN5L1 と同様であった（表 2）。05 は、国内の多くの地衛研において実施される 0 型別試験法で型別不能な 0 群であるが、前年の TN5L1 関連事例の対応をモデルケースとして、TN5m1 関連事例は早期に対応がなされた。

0121 の広域 PFGE 型 TN121m1 株（家族内感染事例を含む 14 事例 18 株）は広域における流行が推測されたが、疫学的な関連性や感染源は不明であった。

non-0157/026/0111 の 2016 年分離株においては、13 種類の広域 PFGE 型が検出され、PFGE 解析結果から近縁と推測される non-0157/026/0111 株が広域で分離されている現状が明らかとなった。近年、国内外において non-0157 株の分離が増加傾向にあり、今後、当該株の分離増加に伴い non-0157/026/0111 の広域株も増える可能性が示唆される。また、広域株の多くは散发事例由来（家族内事例由来を含む）であるが、一部を除き 1-2 ヶ月の期間に集中して分離されており、潜在的な疫学的関連性が推測される。このような PFGE 解析結果が迅速に情報共有され、今後、感染源の究明や拡大阻止に寄与することが期待される。

E. 結論

現在、感染研では、広域発生事例を迅速に探知するために、MLVA、PFGE 解析法を併用し、各解析法の長所を生かして活用

している。事例の早期探知に加え、有益な情報を関連機関と迅速に共有することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

なし

2) 学会発表

石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真
；2015年のNon-0157/026/0111 腸管出血性大腸菌における分子疫学解析 第37回日本食品微生物学会学術総会、東京、2016

石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、李謙一、大西真 ；2015-2016年における EHEC 広域PFGE型の発生動向 第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会、富山、2016

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1 2016 年 PFGE 解析結果のまとめ

| O群 | 解析株数 | PFGE型の種類 | 広域株 | |
|--|------|----------|---------------|--------------|
| | | | 広域PFGE型 (株数) | 血清型及びVT型 |
| O103 | 93 | 57 | TN103m1 (2) | O103:H2 VT1 |
| | | | TN103m2 (4) | |
| | | | TN103m3* (6) | |
| | | | TN103m4 (3) | |
| | | | TN103m5 (2) | O103:H25 VT1 |
| | | | TN103m6 (2) | O103:H2 VT1 |
| | | | TN103m7 (3) | |
| | | | TN103m8 (6) | |
| O121 | 48 | 25 | TN121m1* (18) | O121:H19 VT2 |
| O145 | 25 | 19 | TN145m1 (3) | O145:H- VT2 |
| | | | TN145m2* (7) | |
| O91 | 17 | 17 | | |
| O115 | 11 | 8 | TN115m1 (2) | O115:H10 VT1 |
| O128 | 11 | 9 | | |
| O8 | 10 | 10 | | |
| O156 | 9 | 8 | | |
| O165 | 6 | 6 | | |
| O76 | 各5 | 4 | | |
| O113,O174 | | 各5 | | |
| O5 | 4 | 2 | TN5m1 (3) | O5:H- VT1 |
| O178 | 3 | 3 | | |
| O7,O109 | 各2 | 各1 | | |
| O55,O57,O77,O130, O146,O150,O171 | | 各2 | | |
| O1,O2,O6,O22,O28ac,O80 O84,O89,O98,O110,O126 O136,O137,O148,O152, O163,O166,O172,O177, O179,O182,O183,O186 | 各1 | 各1 | | |
| OUT | 14 | 13 | | |
| Total | 307 | | | |

*類似パターンを含む

表 2 広域 PFGE 型の地域ブロック別分離状況

| O群 | 広域 PFGE型 | ブロック別菌株数(地衛研数) | | | | | | | 総菌株数 (地衛研数) | 分離時期 (月) |
|------|-------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----------------|-------------|
| | | 北海道 東北新潟 | 関東甲信静 | 東海北陸 | 近畿 | 中国四国 | 九州 | | | |
| O103 | TN103m1 | | 1 (1) | 1 (1) | | | | 2 (2) | 7 | |
| | TN103m2 | | | | | 4 (2) | | 4 (2) | 6 | |
| | TN103m3 | 6 (2) | | | | | | 6 (2) | 8-9 | |
| | TN103m4 | | | | 1 (1) | | 2 (1) | 3 (2) | 7-9 | |
| | TN103m5 | | | | 2 (2) | | | 2 (2) | 10-11 | |
| | TN103m6 | | | 2 (2) | | | | 2 (2) | 8 | |
| | TN103m7 | | | 1 (1) | | | 2 (1) | 3 (2) | 1-10 | |
| | TN103m8 | 6 (2) | | | | | | 6 (2) | 6-12 | |
| O121 | TN121m1 | | 9 (4) | 7 (2) | 2 (1) | | | 18 (7) | 6-9 | |
| O145 | TN145m1 | | 3 (3) | | | | | 3 (3) | 6 | |
| | TN145m2 | | | | 7 (2) | | | 7 (2) | 7-8 | |
| O115 | TN115m1 | 1 (1) | 1 (1) | | | | | 2 (2) | 8 | |
| O5 | TN5m1 | | | | | | 3 (3) | 3 (3) | 10 | |

圖 1

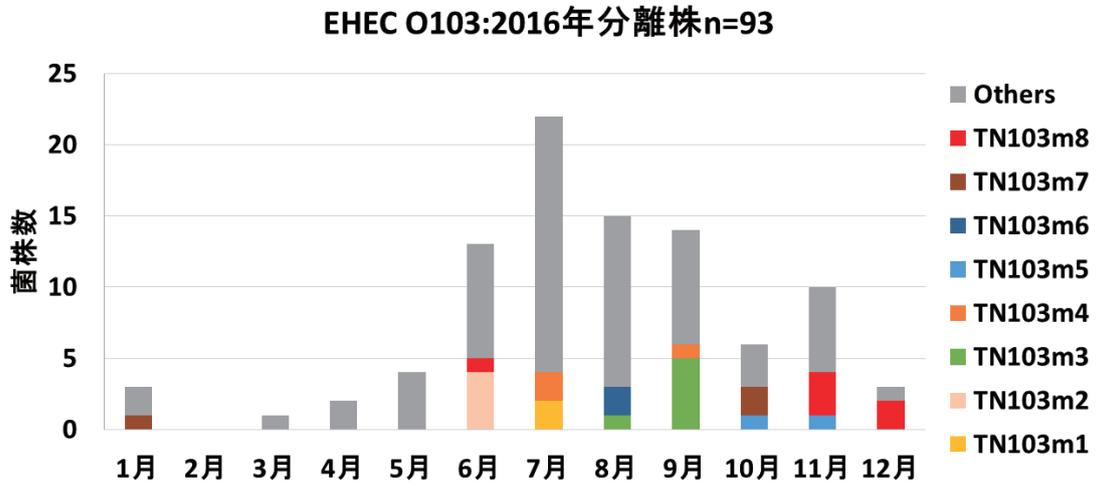


圖 2

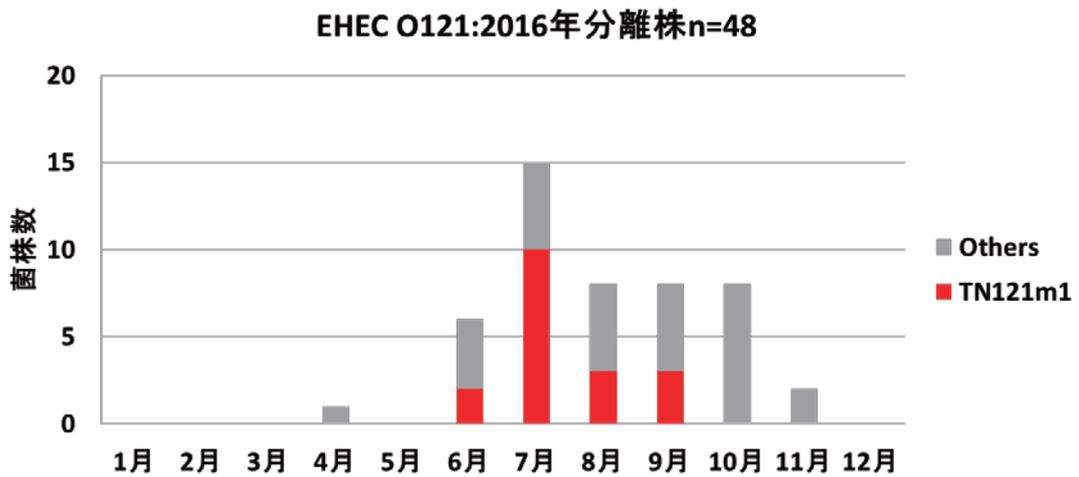


图 3

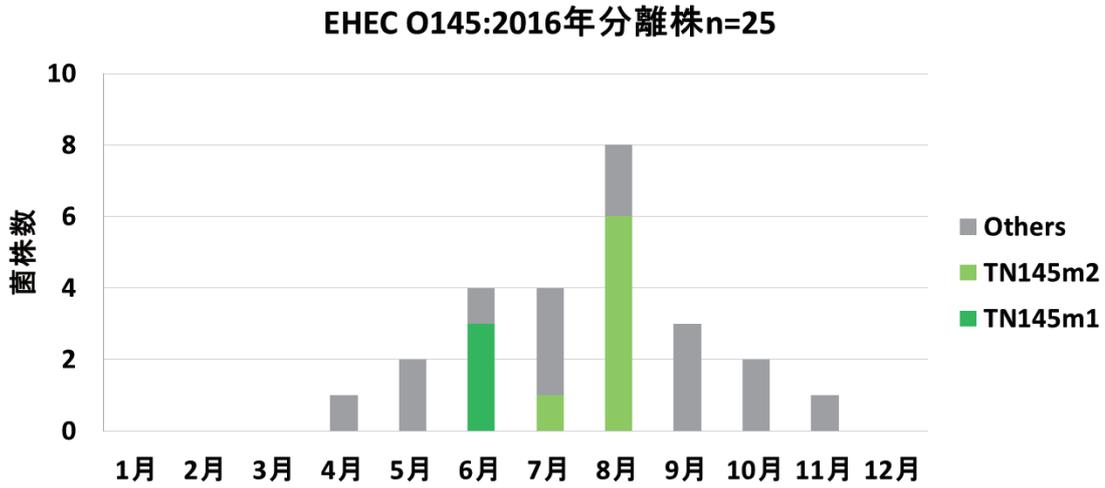


图 4

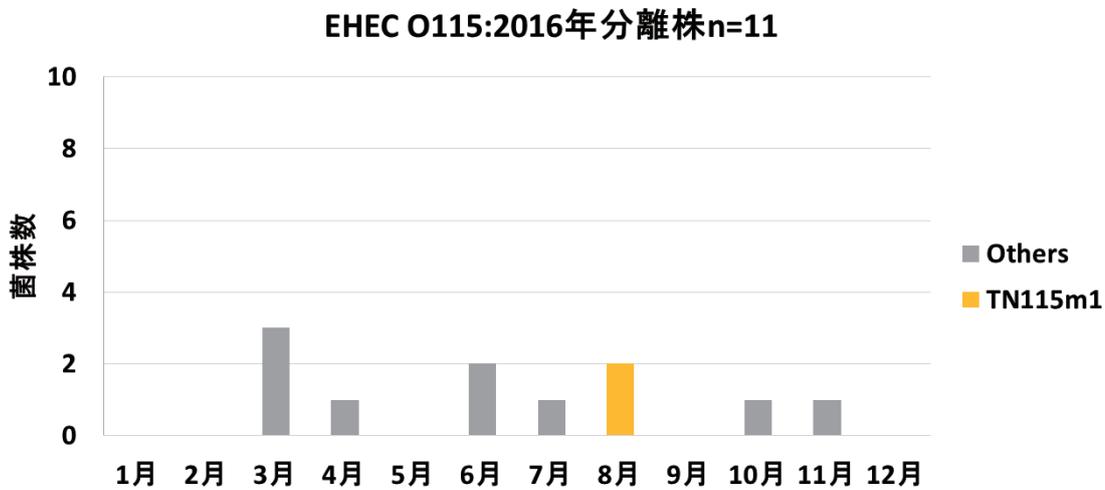


図 5

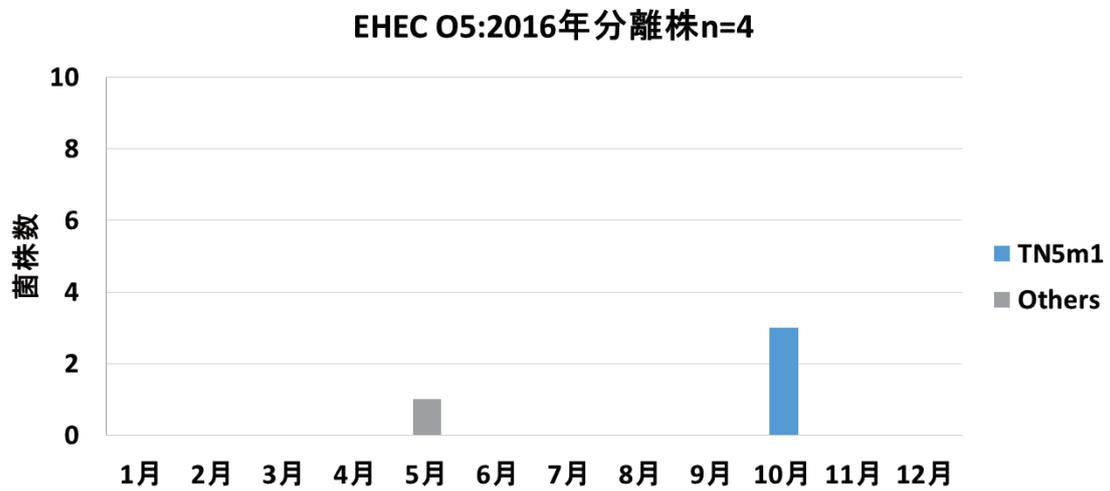
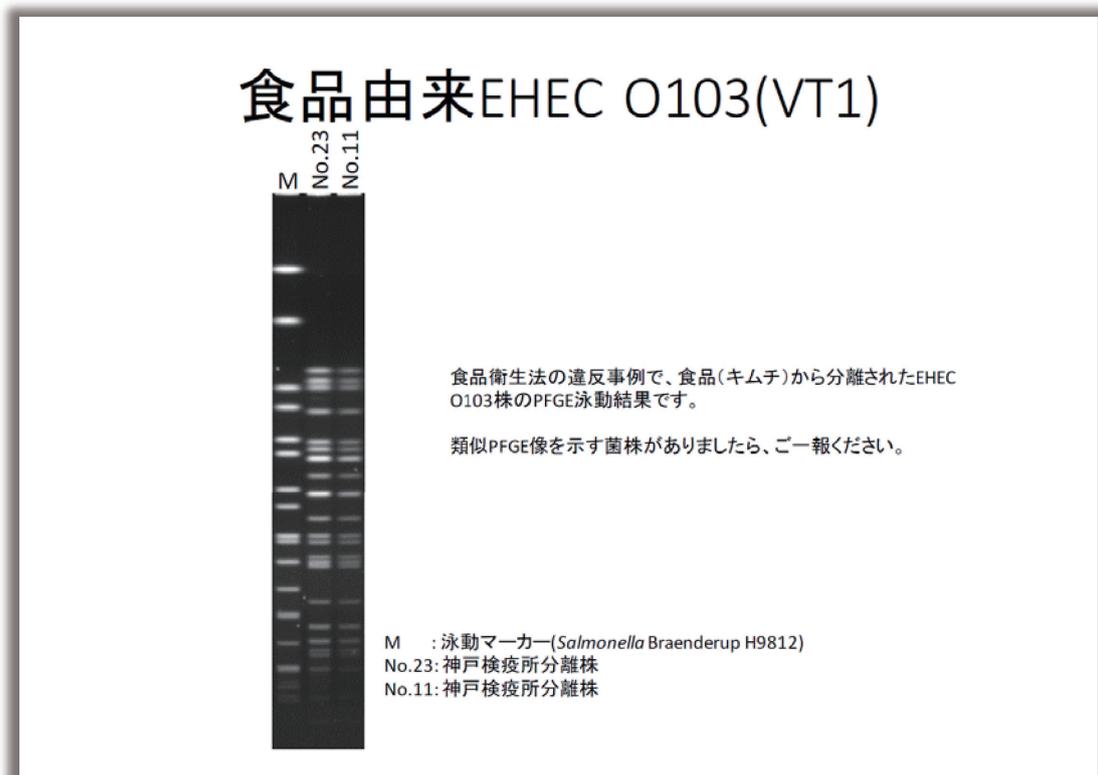


図 6 韓国産白菜キムチ由来株関連情報の提供資料



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28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 |
| | 武沼 浩子 | 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 |
| | 山田 香織 | 仙台市衛生研究所 |
| | 菊地 理慧 | 福島県衛生研究所 |
| | 川瀬 雅雄 | 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・新潟ブロック内の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 IS-Printing System 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。さらに、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、各県で分離された菌株の IS-Printing System のデータを集積し発生パターンを調査した。また、平成 28 年度は冷凍メンチカツを原因食品とする食中毒が広域に発生し、ブロック内でも患者発生が確認された。その際、IS-Printing System による解析が、関係機関との情報共有に有用であったので報告する。

A. 研究目的

近年、広域的に流通する食品による食中毒の発生や全国規模の感染症の流行があり、地方においても感染経路や原因食品の特定のために病原体の検索を迅速に

行う事が求められている。

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。

しかしながら、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・新潟ブロックで IS コードを共有化するシステムを構築するため、各施設の精度管理と IS コードを集積し、実際に広域な患者発生がみられた可能性のあ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

平成 28 年度に秋田県内で分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 菌株 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 溶液を作成し、ブロック内の地方衛生研究所 11 施設（当センターを含む）に配布した。（表 1）

2) IS-Printing System による解析

各施設で付属の取扱説明書に従い実施した（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）。

3) エキストラバンドの確認

1st set 1-12 バンドの確認のため、キット説明書記載の 1-12 用プライマーを用いた single PCR によりバンド検出を行った。酵素は Ex-taq（TaKaRa Bio）を用いた。反応条件は、94°C2 分、94°C30 秒-55°C30 秒-72°C30 秒 30 サイクル、72°C2 分で行った。

2. 広域患者発生菌株の探索

北海道・東北・新潟ブロックの各施設から 5 株程度の 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。

3. 食中毒事例の情報共有

冷凍メンチカツを原因食品とする広域食中毒事例の際、国立感染症研究所と隣県において検査データを共有した。

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。菌株 No. 3 については、1st set 1-12 の判定結果が施設間で異なり、8 施設が（+）、3 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（表 3）によって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。

1-12 付近のバンドが本来想定しているプライマーに由来しているかどうかの確認のため Single PCR を行ったところ、No. 3 の菌株では遺伝子増幅が認められなかった。そのため、菌株 No.3 の解析画像にある 1-12 付近のバンドはエキストラバンドと考えられた。（図 2）

2. 広域患者発生菌株の探索

ブロック内の各施設から計 49 株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 44 株の解析結果を比較した。44 株中 24 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 10 パターンに分類された。(表 4) この内、2 施設一致が 7 パターン、3 施設一致が 2 パターン、4 施設一致が 1 パターンとなった。

3. 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おり、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) による解析を行った。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。その後の疫学的調査から、患者が利用している社会福祉施設において冷凍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た。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ているが、菌株の解析データの共有化は、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。

D. 考察

IS-Printing System の精度管理は、前年度の検討では、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 (+) と判定した。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、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。また、今後の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と思われる。

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の可能性がある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 は有用と考えられた。実際、広域に患者発生した冷凍メンチカツの事例では、IS-Printing System や MLVA の分子疫学解析の情報的一致により、早期に秋田県内の患者が当該事例の患者である可能性を考慮することができた。

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、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 の解析結果は、1-12 付近に出現したエキストラバンドについて判定で分かれた。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

表 1 EHEC O157 供試菌株

| 菌株番号 | 分離年月日 | 由来 | 病原遺伝子 |
|-------------|-----------|---------|-------------------|
| 1. EC 16645 | 2016.6.27 | 散発下痢症患者 | VT 2 <i>eae</i> |
| 2 EC 16670 | 2016.7.28 | 無症状保菌者 | VT 1,2 <i>eae</i> |
| 3 EC 16673 | 2016.8.6 | 無症状保菌者 | VT 2 <i>eae</i> |
| 4 EC 16689 | 2016.8.25 | 無症状保菌者 | VT 1,2 <i>eae</i> |

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

表 3 各施設使用 PCR 装置及び検査条件

| 施設 | 使用機器 | テンプレート | 泳動時間 | 備考 | 1st set 1-12判定 |
|----|-------------------|-----------|--------|---------------------|----------------|
| A | AB Veriti 96-well | 1 μ l | 70分 | 96-well | + |
| B | TaKaRa TP600 | 1 μ l | 27分 | QIAxcel type S | - |
| C | AB Veriti | 1 μ l | 55~60分 | | + |
| D | AB Veriti 200 | 1 μ l | 105分 | 50V5分 100V100分 | - |
| E | AB 9600 | 1 μ l | 80分 | | - |
| F | BioRad MyCycler | 1 μ l | 75分 | 3%NuSieveGTGagarose | + |
| G | AB 2720 | 1 μ l | 120分 | | + |
| H | BioRad PTC-0220 | 1 μ l | 90分 | | + |
| I | BioRad iCycler | 1 μ l | 60分 | | + |
| J | AB Veriti | 1 μ l | 150分 | | + |
| K | AB Veriti 200 | 1 μ l | 85分30秒 | 96-well | + |

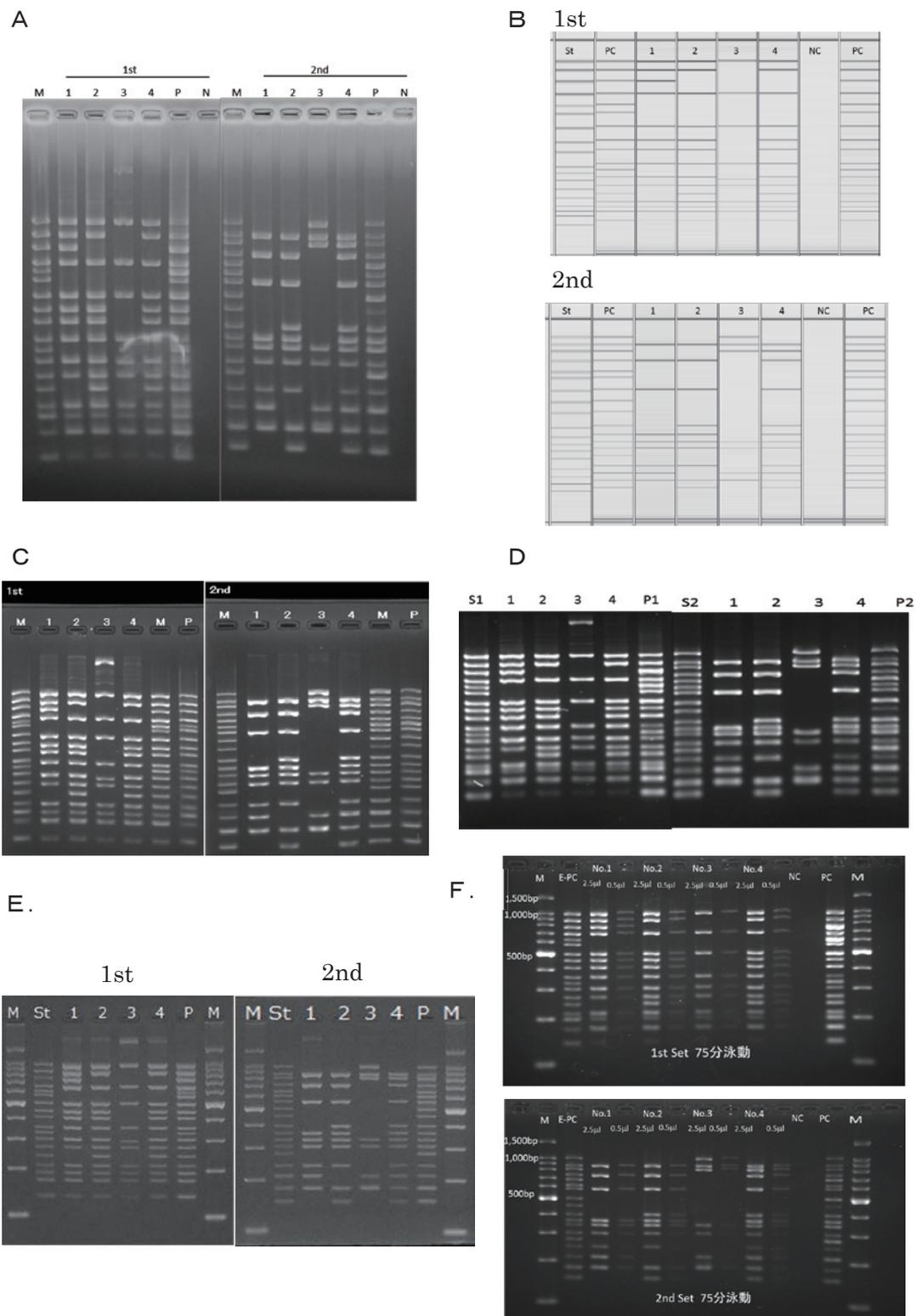


図 1 各施設の IS-Printing System による電気泳動画像

レーン 1 : EC16645, レーン 2 : EC16670, レーン 3 : EC16673, レーン 4 : EC16689.

図1 続き

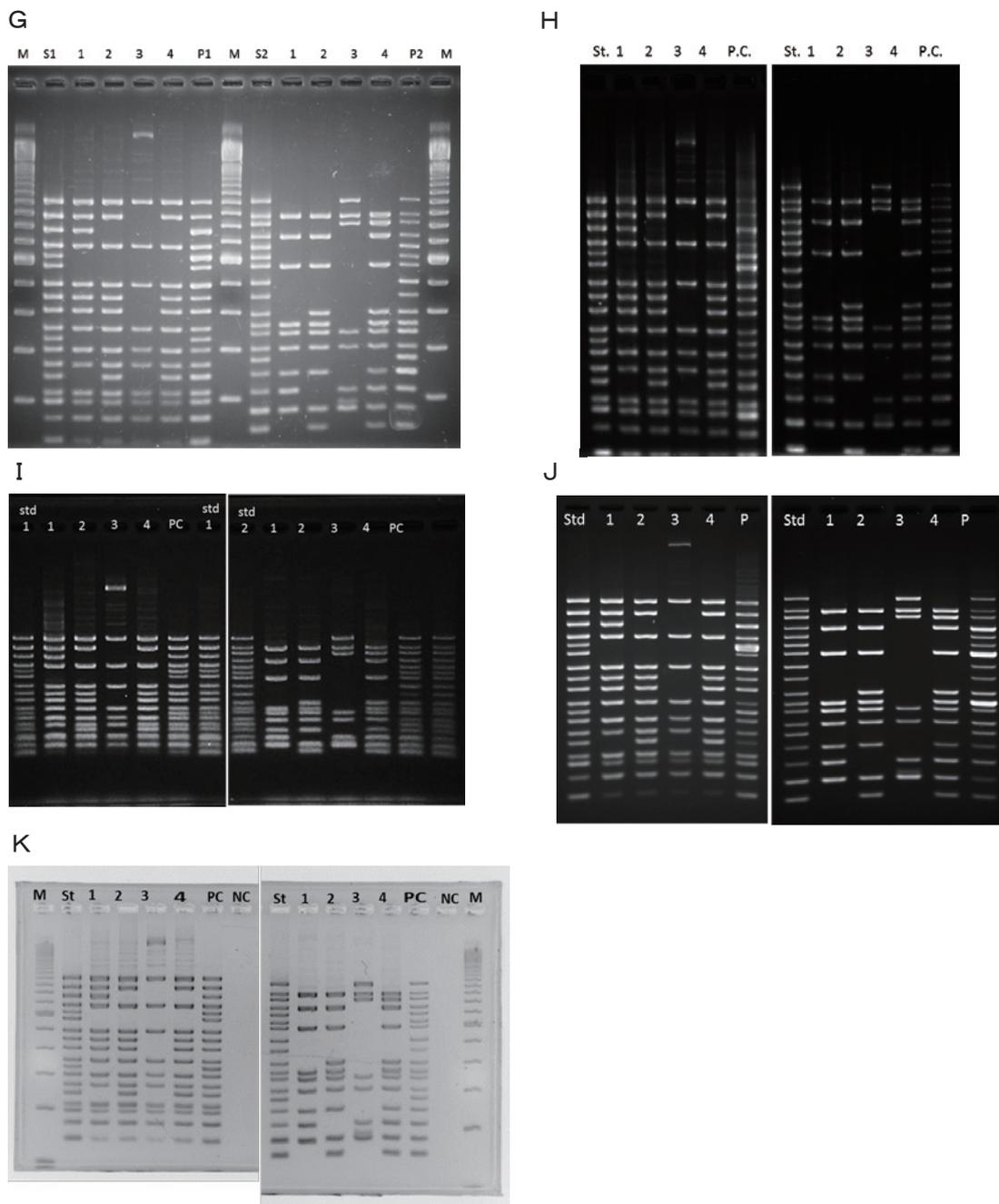


図1 各施設の IS-Printing System による電気泳動画像

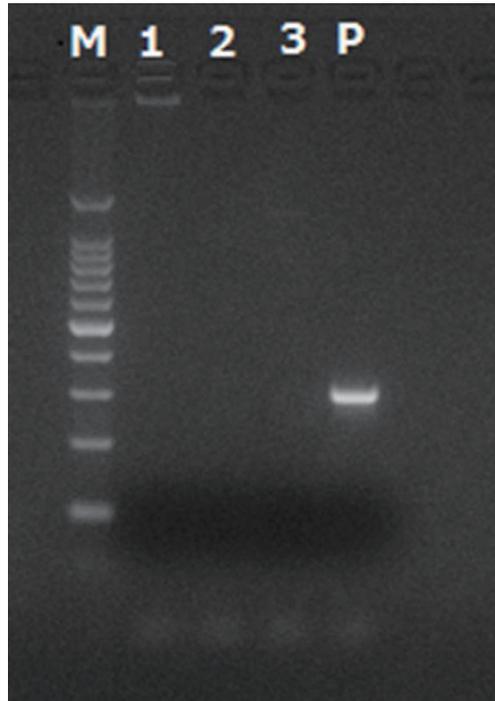


図2 エキストラバンド疑い確認のための single PCR.

レーン1 : 菌株 No.3 配布 DNA, レーン2 : 切り出し精製した No.3 1-12 疑いバンド,
 レーン3 : 菌株 No.3 再調整 DNA, レーンP : 菌株 No.2 配布 DNA.

表4 北海道・東北・新潟ブロック内他県と一致株 10 パターン

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 | eae | 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 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 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 |

厚生労働科学研究（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
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
平成 28 年度分担研究報告書

関東ブロックの食品・ヒト由来腸内細菌の解析及び精度管理に関する研究

| | | |
|-------|---------------|-------------|
| 研究分担者 | 東京都健康安全研究センター | 平井 昭彦 |
| 研究協力者 | 茨城県衛生研究所 | 山本 和則 |
| | 栃木県保健環境センター | 桐谷 礼子 |
| | 群馬県衛生環境研究所 | 小林 美保 |
| | 埼玉県衛生研究所 | 倉園 貴至 |
| | 千葉県衛生研究所 | 平井晋一郎 |
| | 神奈川県衛生研究所 | 古川 一郎 |
| | 横浜市衛生研究所 | 松本 裕子 |
| | 山梨県衛生環境研究所 | 山上 隆也 |
| | 長野県環境保全研究所 | 井川由樹子 |
| | 静岡県環境衛生科学研究所 | 山田 俊博 |
| | 東京都健康安全研究センター | 小西 典子、尾畑 浩魅 |

研究要旨 精度管理は、検査・解析レベルの維持、向上を目的として実施される。平成 28 年度も共通菌株を用いて PFGE 法、IS 法の精度管理を行った結果、いずれも良好な成績であった。しかし、PFGE 法では画像が若干不鮮明なもの、IS 法ではエキストラバンドの報告が無いものがあった。

アンケート調査の結果、各施設では分子疫学解析を行政活用した事例を数多く経験しており、他施設との共同により広域事例を明らかにした事例も多くあることが判明した。

IS 法および MLVA 法の導入と手技の統一を目的として、標準プロトコルの作成について検討を行った。

A. 研究目的

食中毒、食品媒介感染症発生時に重要なことは、原因特定を迅速に行い事件の拡大を防ぐことである。食品の広域流通が行われる現在は、同一食品を原因として散発的に異なる地域で事件が発生することがあり（Diffuse Outbreak）、原因食品、感染経路を

特定するためには、病原体の詳細な解析が必要である。サルモネラや腸管出血性大腸菌（EHEC）による事件は症状も重篤に陥ることがあり、病原体の解析は特に重要となる。

これら病原体の解析は、従来より血清型別試験や薬剤感受性試験が行われているが、

近年は分子疫学解析が多用され、PFGE、MLST、MLVA や EHEC O157 では IS-printing System (IS) も用いられている。

散発事例など広域に亘る事例の場合、異なる検査施設での結果を比較し判定する必要があることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要である。このことから今回、EHEC 共通菌株を使用して PFGE 法と IS 法について各地研の精度管理を実施した。

また、病原体解析に関するアンケートを実施し、解析の現状と方向性について調査した。

さらに、IS 法および MLVA 法の導入と手技の統一を目的として、標準プロトコルの作成について検討を行った。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株を関東ブロックの 11 施設に送付し、PFGE 法および IS 法の精度管理を行った。

1) 供試菌株

2016 年に東京都内で分離された腸管出血性大腸菌 5 株を用いた (表 1)。

2) PFGE 法

各施設で実施しているプロトコルに従って PFGE を行い、撮影した写真を比較することにより解析を行った。

3) IS 法

各施設で実施しているプロトコルに従って IS を行い、想定されるサイズにバンドが認められた場合を「1」、認められない場合を「0」、判定が困難であった場合を「2」と記載し、その他のエキストラバンドが認められた場合には備考欄に記載し、これらのデータを比較することにより解析を行った。

2. アンケート

PFGE 法、IS 法および MLVA 法について、実施の有無と実施状況についてアンケート調査を実施した。同時に、分子疫学解析が食中毒等の解析に活用され、有用であった事例について調査を実施した。

3. IS 法の実践的プロトコルの作成

IS 法は迅速・簡便に解析を実施でき、施設間のデータ共有も容易であるが、泳動距離や染色濃度などマルチプレックス PCR 特有のコツも存在する。そこで、IS 法の実践的プロトコル作成を検討した。

4. MLVA 法導入に関する試み

昨年度のアンケート調査で、MLVA 法を実施している施設が 36.4%と低かったことから、MLVA 法導入と手技の統一に関する検討を行った。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた精度管理結果

1) PFGE 法

関東ブロック 10 施設で、共通菌株について PFGE 解析を実施した結果、各施設ともバンドの分離は良好であった。PFGE は、画像ファイルを用いて各施設の比較を行ったことから、映像が鮮明なものから若干不鮮明なものまで混在した (図 共通菌株の PFGE 像)。

2) IS 法

関東ブロック 11 施設で、共通菌株について IS 解析を実施した結果、Primer set 2 では全ての施設が同一の結果を報告した。これに対し Primer set 1 では、菌株 2 において 1 施設が判定困難を 1 か所報告した。また、

菌株 5 において、2,000bp より上の位置に非特異バンドが認められるが、記載があった施設は 8 か所であった（表 2 共通菌株の IS-Printing System 成績）。

2. アンケート結果

関東ブロック 11 施設を対象に、遺伝子解析法実施状況に関してアンケートを実施した結果、PFGE 法と IS 法は全ての施設が実施していると回答した。MLVA 法は 6 施設が実施していると回答し、未実施の 2 施設も今後導入に向けた検討を行うと回答した。

実施対象の株については、PFGE 法と IS 法は 6 施設が全ての株を実施、残り 4 施設は疫学的関連性を証明する際など必要に応じて一部の株について実施すると回答した。MLVA 法は 1 施設が全ての株を実施、残り 5 施設は疫学的関連性の証明時や、試験的導入等と回答した。

食中毒等の解析に分子疫学解析が活用され、有用であった事例についてアンケートを実施した結果、複数の施設から回答が寄せられた。内容として、他自治体にまたがる事例の解析時に効果があったとする報告が多かった（一部事例を後述する）。

3. IS 法の実践的プロトコルの作成

IS 法を実施している施設にアンケートを行い、操作時の注意点等について情報を収集した。これらを基に、IS 法実践的プロトコルの作成を行った（別添参照）。

4. MLVA 法導入に関する試み

MLVA 法は、感染研で作成されたプロトコルにより実施されている。今回、このプロトコルを基に、MLVA 法実施時に手元において確認しながら操作を実施できるよ

うなハンドブックの作成を検討した。関東ブロックで既に MLVA 法を導入している施設に、執筆および内容の確認を依頼することとし、今年度は作業分担について確認を行った。

D. 考察

病原体の分子疫学解析では、異なる検査施設での結果を比較し、判定する必要も出てくることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることは重要である。そこで、関東ブロック 11 施設全てで実施されている PFGE 法、IS 法について、今年度も共通菌株を用いた精度管理を実施した。菌株は、東京都で 2016 年に分離された O157 株を使用し、IS 法でエキストラバンドが少ない株と、特徴的エキストラバンドが出る株を取り混ぜて配布した。

PFGE 法の結果は、各施設ともバンドの分離は良好であったが、画像ファイルで比較を行うことから、画像の鮮明さでは若干不鮮明なものも認められた。

IS 法の結果、Primer set 1 の No.5 プライマーで、1 施設が判定困難の「2」と報告した（他 10 施設は「0」）。また、菌株 5 において、Primer set 1 では 2,000bp より上の位置にエキストラバンドが認められるが、記載があった施設は 8 か所であり、3 施設は報告が無かった。

アンケート調査の結果、昨年は 4 施設であった MLVA 法実施施設が、今年は 6 施設へと増加しており、未実施の内 2 施設も今後導入を検討すると回答した。IS 法や MLVA 法においては、検査結果が数値で表現可能なことから、別施設での検査結果をそのまま用いて判定することが可能で、PFGE 法の場合必要となる菌株の受け渡し

が不要である。平成 28 年 7 月から 8 月にかけて発生した「サトウキビジュース」による O157 感染事例のように、原因施設と患者が遠く離れている場合の疫学解析などに有用と考えられた。

平成 28 年度は高齢者施設でキュウリのゆかり和えにより、死者 10 名を出す O157 事件が千葉県と東京都で発生した。これら 2 つの事件は、同一の給食業者が同一メニューを提供していたことから同じ事件と推測され、分離菌株の分子疫学解析から同一と証明された。分子疫学解析が行政に活用された事例であるが、両検査施設での解析法が異なり、緊急で菌株の受け渡しが必要となったことから、今後に課題を残すものとなった。

E. 結論

共通菌株を用いた精度管理により、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが判明した。

アンケート調査の結果、各施設では分子疫学解析を行政活用した事例を数多く経験しており、他施設との共同により広域事例を明らかにした事例も多くあることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 平井晋一郎、横山栄二：腸管出血性大腸菌 O157 の subclade 8a 及び 8b における Stx2 産生性の比較、第 20 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成 28 年 11 月、富山県

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

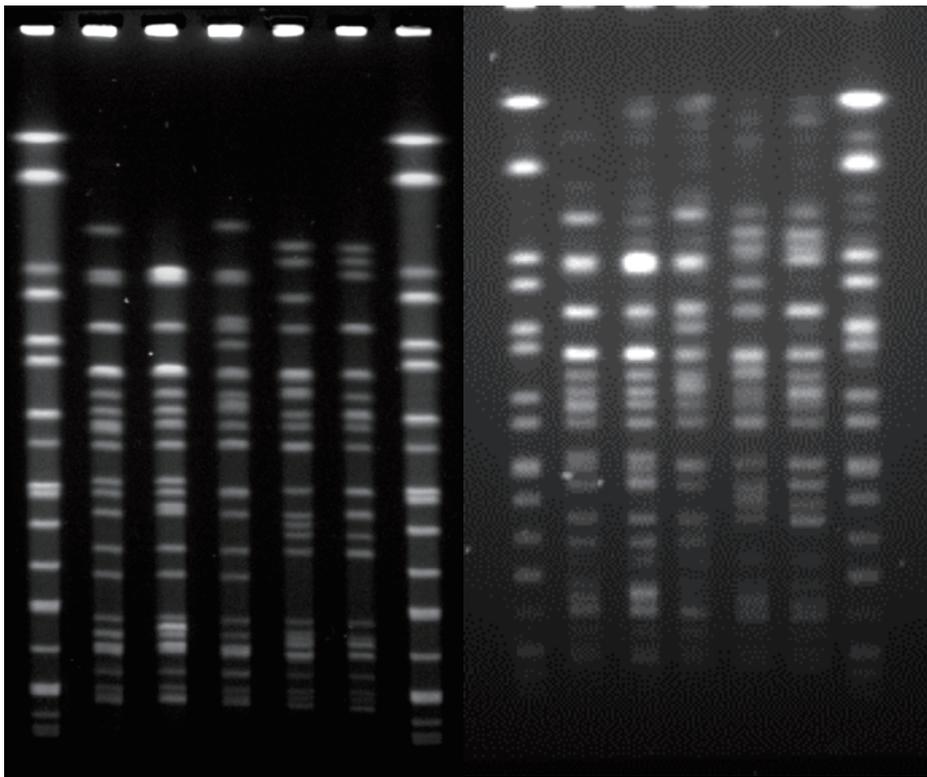
表 1 共通供試菌株 (2016 年分離腸管出血性大腸菌 O157 株)

| No. | 菌株No. | 血清型 | 毒素型 |
|-----|--------|---------|---------|
| 1 | EH5277 | O157:H7 | VT1+VT2 |
| 2 | EH5353 | O157:H7 | VT1+VT2 |
| 3 | EH5487 | O157:H7 | VT1+VT2 |
| 4 | EH5572 | O157:H7 | VT2 |
| 5 | EH5586 | O157:H7 | VT2 |

図 共通菌株の PFGE 像

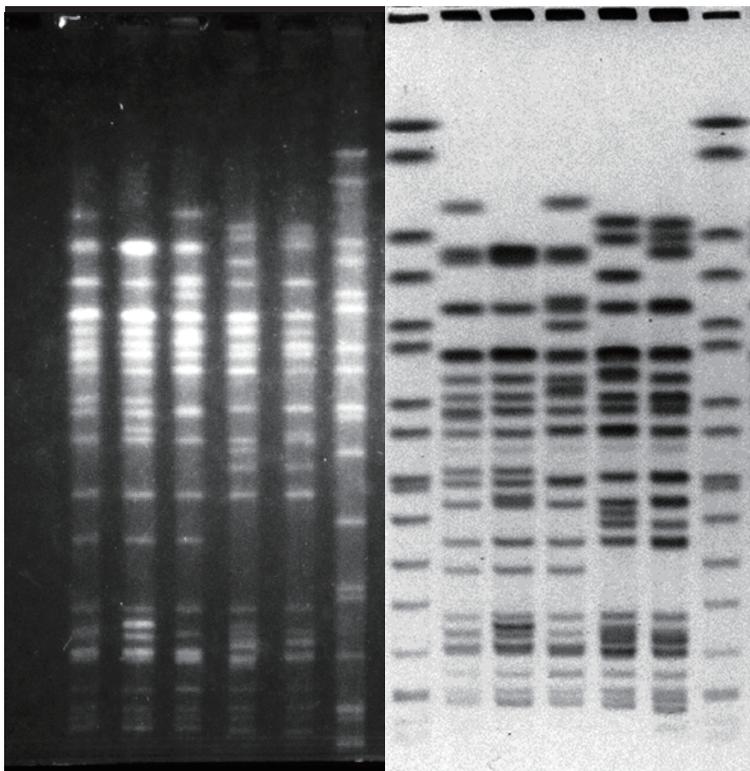
施設 A

施設 B



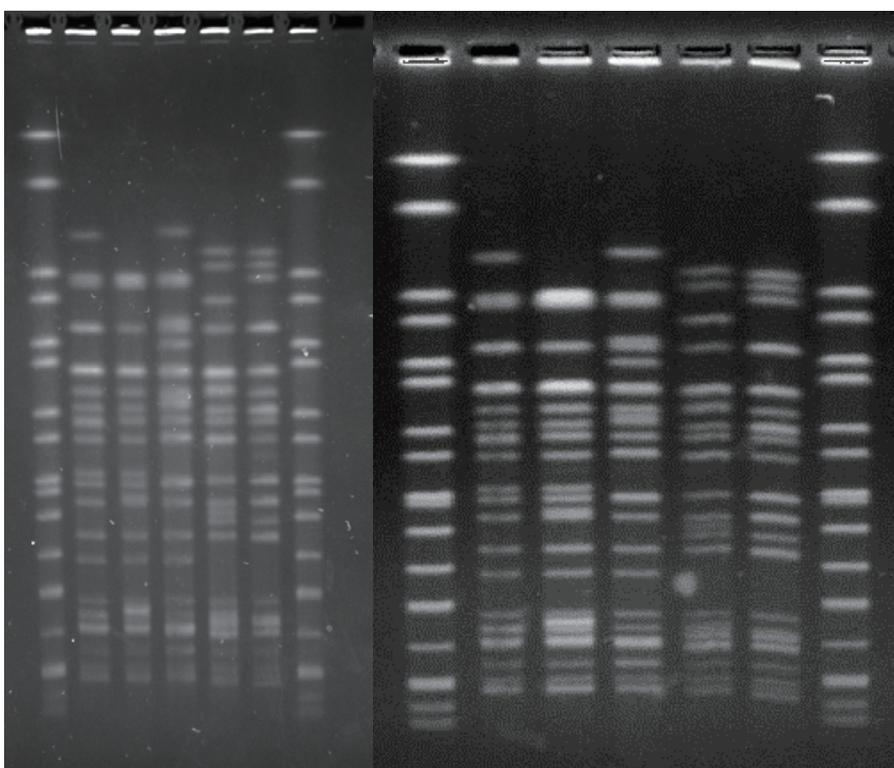
施設 C

施設 D



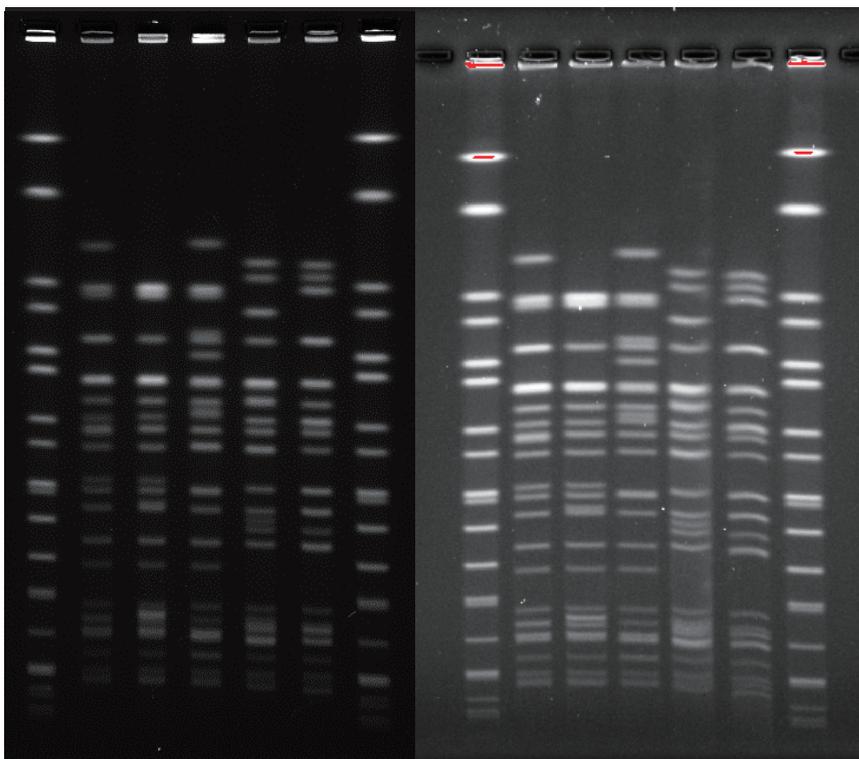
施設 E

施設 F



施設 G

施設 I



施設 J

施設 K

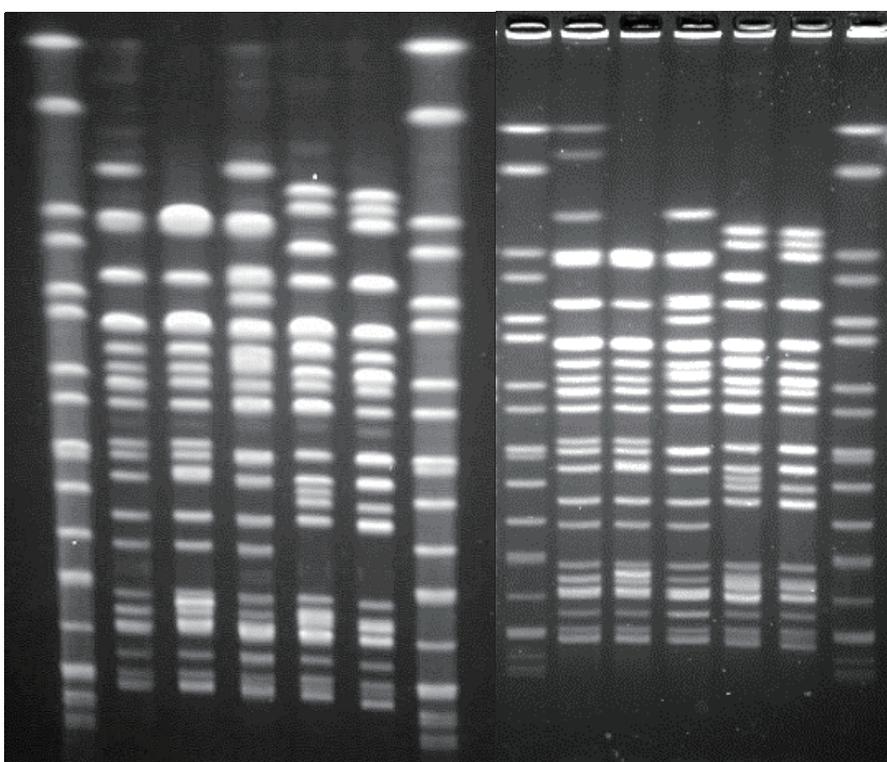


表2 共通菌株の IS-Printing System 成績

Primer set 1

菌株 1 から 3

| 施設 | Primer No. 菌株No. (Accession) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 非特異 バンド | 備考 |
|----|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|----|
| | | 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 | hly 137 | | |
| A | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| E | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| F | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| H | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| I | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| J | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| K | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 施設 | Primer No. 菌株No. (Accession) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 非特異 バンド | 備考 |
| | | 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 | hly 137 | | |
| A | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| C | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| E | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| F | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| H | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| I | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| J | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| K | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 施設 | Primer No. 菌株No. (Accession) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 非特異 バンド | 備考 |
| | | 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 | hly 137 | | |
| A | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| C | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| E | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| F | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| H | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| I | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| J | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| K | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |

Primer set 1

菌株 4 と 5

| 施設 | Primer No. 菌株No. (菌株) | 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 | eae | 1-16 | hly | 非特異 バンド | 備考 |
|----|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|-----|--------------------------|--------|
| | | 974 | 839 | 742 | 645 | 595 | 561 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 185 | 171 | 137 | | |
| A | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| C | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| E | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| F | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| H | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| I | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| J | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| K | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 施設 | Primer No. 菌株No. (菌株) | 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 | eae | 1-16 | hly | 非特異 バンド | 備考 |
| | | 974 | 839 | 742 | 645 | 595 | 561 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 185 | 171 | 137 | | |
| A | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2900bp |
| C | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1-06 無いワ ト →初産(10) | |
| E | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1-01の上 | |
| F | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | >1000bp | |
| H | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1-01の上 | |
| I | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | (>974bp) | |
| J | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1-01の上 | |
| K | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 大 1本 | |

Primer set 2

菌株 1 から 3

| 施設 | Primer No. 菌株No. (菌株) | 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 | 非特異 バンド | 備考 |
|----|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|----|
| | | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 | | |
| A | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| C | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| E | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| F | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| H | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| I | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| J | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| K | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 施設 | Primer No. 菌株No. (菌株) | 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 | 非特異 バンド | 備考 |
| | | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 | | |
| A | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| C | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| E | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| F | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| H | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| I | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| J | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| K | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 施設 | Primer No. 菌株No. (菌株) | 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 | 非特異 バンド | 備考 |
| | | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 | | |
| A | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| B | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| C | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| D | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| E | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| F | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| G | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| H | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| I | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| J | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| K | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |

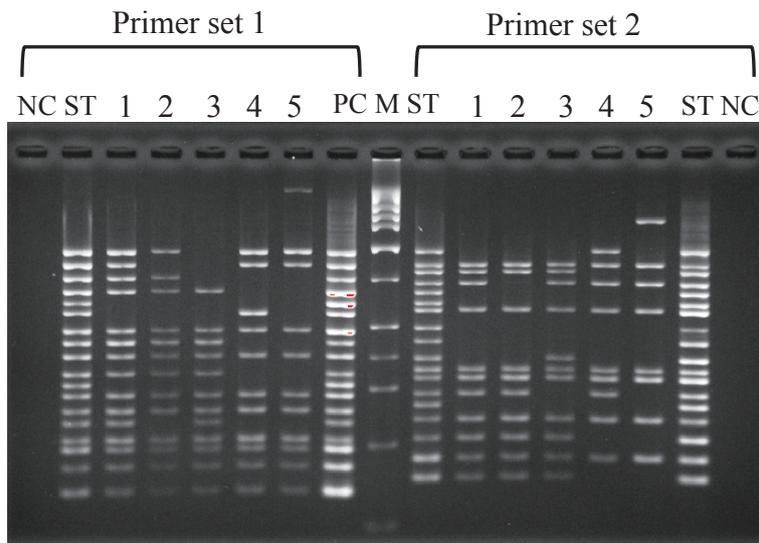
Primer set 2

菌株 4 と 5

| 施設 | Primer No. 菌株No. (菌株) | 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 | 非特異 バンド | 備考 |
|----|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|----|
| A | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| B | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| C | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| D | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| E | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| F | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| G | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| H | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| I | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| J | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |
| K | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | |

| 施設 | Primer No. 菌株No. (菌株) | 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 | 非特異 バンド | 備考 |
|----|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|--------|
| A | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 01の上 にエ キス トラ ン ド あり。 | |
| B | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1370bp |
| C | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | >1000bp にあり | |
| D | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2-01 の上 に あり | |
| E | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2-01の 上 | |
| F | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 有り | |
| G | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | >1000bp | |
| H | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2-01の上 | |
| I | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1(>987) | |
| J | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2-01の上 | |
| K | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 大 1本 | |

図 共通菌株の IS 像



分子疫学解析が有効に活用された事例集

事例 1. 焼肉店で発生した食中毒疑い事例

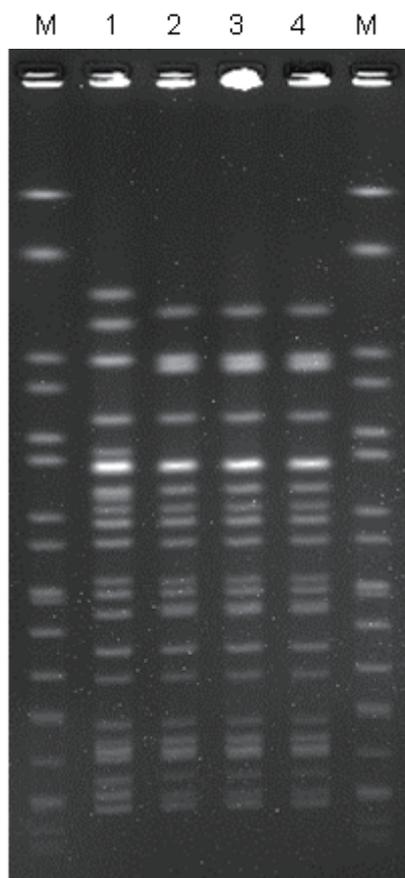
患者① 7月28日 Y市保健所に腸管出血性大腸菌感染症の届出が出された。患者は成人男性で、O157 (VT1&2 産生) が検出されており、血便を呈していた。この患者が市内の焼肉店を7月16日に利用していることが判明した。

患者② 8月3日 他自治体の保健所に腸管出血性大腸菌感染症の届出が出された。患者は小児で、O157 (VT1 産生) が検出されており、溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症していた。この患者が、患者①が利用した焼肉店を7月24日に利用していることが判明した。

この焼肉店について、食品12検体 (カルビ、レバー、ホルモン、ナムル等)、フキトリ14検体、調理従事者等糞便21検体について、腸管出血性大腸菌 O157 の検索を行ったところ、従業員2人から EHEC O157 : H7 (VT1&2 産生) が分離された。

なお、前出の患者菌株2名分について菌株を収集し、血清型及び毒素型を確認したところ、いずれも EHEC O157 : H7 (VT1&2 産生) であることが判明した。

これら4菌株について制限酵素 *Xba* I を用いて PFGE を行ったところ、患者①を除き同一の泳動パターンを示した。



- | | | |
|---|-------|--------|
| 1 | 患者① | (Y市) |
| 2 | 従業員 A | |
| 3 | 従業員 B | |
| 4 | 患者② | (他自治体) |

事例 2-1. 千葉県 I 市内の老人ホームで発生した EHEC O157 による集団食中毒

(平成 28 年 8 月 27 日)

I 市内の老人ホーム職員から管轄保健所に『先月 27 日から複数の入所者が下痢や血便等の症状を呈している。』と連絡あった。管轄保健所は、有症者の共通食が一つの給食施設が提供した食事に限られていたこと、有症者の便から EHEC O157 菌株が分離されたことから、当該給食施設を原因とする食中毒と判断した。

(9 月 1 日)

提供された給食に含まれていたキュウリの紫蘇和えからも EHEC O157 菌株が分離されたことから、この食品が原因だと明らかになった。同日、千葉県衛生研究所に、感染者由来の 9 菌株及びキュウリの紫蘇和え由来の 1 菌株の EHEC O157 が搬入され、これら菌株が Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA 法) で解析された。

(9 月 4 日)

感染者由来の 7 菌株とキュウリの紫蘇和え由来の 1 菌株は、解析した全ての遺伝子座位でリピート数が一致した。感染者由来の 2 菌株は、キュウリの紫蘇和え由来の菌株と 1 つの遺伝子座位のみでリピート数が異なっていた。しかし、同一食中毒由来の菌株であっても、僅かな遺伝子変異が認められる場合があることから、キュウリの紫蘇和えが原因食品であることが裏付けられた。

(9 月 10 日～12 日)

9 月 1 日、東京都が『東京都 H 市の老人ホームでも、当該給食施設が提供したキュウリの紫蘇和えにより EHEC O157 の集団食中毒が起きている。』と報道発表した。9 月 10 日、千葉県衛生研究所は、東京都の老人ホームで感染者及びキュウリの紫蘇和えから分離された EHEC O157 菌株の分与を受けた。9 月 12 日、これら菌株について MLVA 法を行ったところ、千葉県で分離された菌株と同一であることが確認された。なお、本事例における千葉県での最終的な感染者数は 44 名であった。

事例 2-2. 東京都 H 市内の有料老人ホームで発生した O157 食中毒について

2016 年 8 月 28 日、都内高齢者施設から「8 月 27 日から入居者 12 名が下痢、発熱、おう吐等を呈している」との連絡が保健所にあった。

発生年月：2016 年 8 月

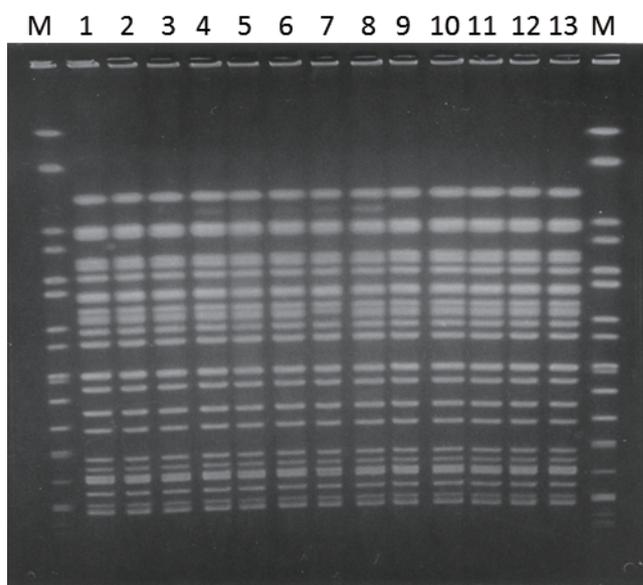
患者数：32 名

死亡者数：5 名

原因施設：高齢者施設

原因食品：きゅうりのゆかり和え（8 月 22 日夕食）

原因菌：腸管出血性大腸菌 O157 : H7（VT1+VT2 産生）



- 1~3 : 患者由来(東京都)
- 4 : きゅうりのゆかり和え由来(東京都)
- 5~7 : 千葉県患者由来
- 8 : きゅうりのゆかり和え由来(千葉県)
- 9~13 : 患者由来(東京都)

IS 法結果

1st set : 000100111101111111

2nd set : 011100100111001111

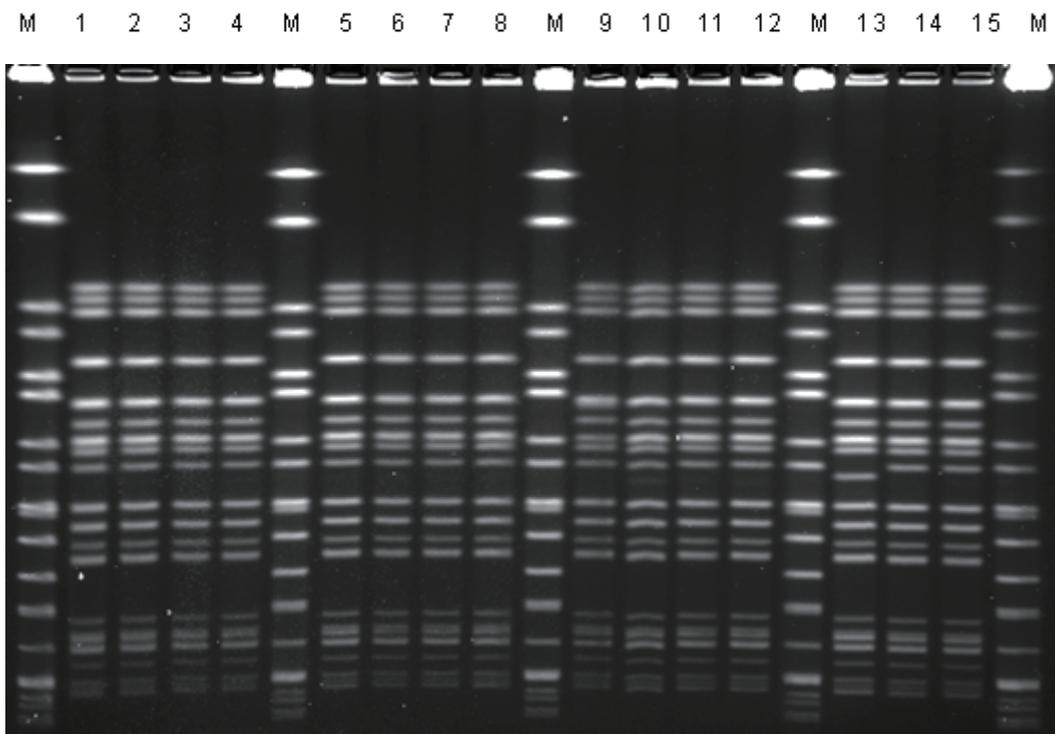
事例3-1. メンチカツを原因とした食中毒事例（横浜市）

10月31日 神奈川県衛生研究所より、県域でメンチカツの喫食歴がある EHEC O157 患者が増加しているとの情報提供があった。VT2 産生株が検出された患者は共通して、特定のメンチカツの喫食歴があるとのことで、IS-printing のコードおよび PFGE 画像を電子メールで提供していただいた。市内にも同一メーカーのメンチカツが販売されていることから10月に分離された EHEC O157（VT2 産生）株について IS-printing を行ったところ1人が同一の IS-printing type であった。この患者はメンチカツを喫食していることが後から判明した。

その後、このメンチカツについて、神奈川県で報道発表を行ったことから市内でも患者が増え、最終的にメンチカツ3検体と患者等12人から EHEC O157（VT2 産生）が検出された。

これら15菌株について制限酵素 *Xba* I を用いて PFGE を行ったところ、メンチカツ1検体は若干バンド位置が異なるものの15株は、ほぼ同一の泳動パターンを示した。

近隣の自治体と日頃から情報提供を行っていることから迅速に IS-printing と、PFGE への対応ができた事例であった。



| | |
|-------|------------------|
| 1～12 | 患者、無症状病原体 保有者 |
| 13～15 | メンチカツ |

事例3-2. メンチカツを原因とした食中毒事例（東京都）

東京都での患者発生状況

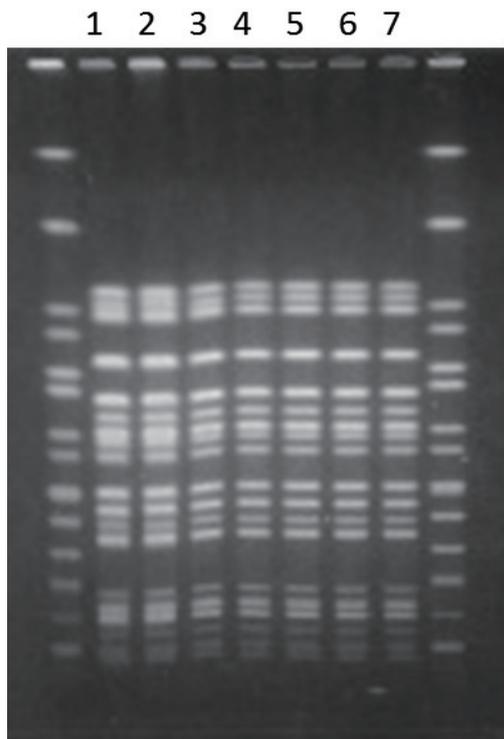
事例1： 患者数2名

藤沢市の実家で冷凍メンチカツを喫食後発症

2名から O157（VT2）を検出

事例2： 患者数1名 10月27日喫食

事例3： 患者数1名 HUS発症 O157に対する血中抗体価の上昇で診断（O157は検出せず）自宅に残されていた冷凍メンチカツから O157 検出



1. 散発患者
2. 散発患者
3. 散発患者
4. メンチカツ関連事例(事例2)
5. 冷凍メンチカツ由来
6. 神奈川県患者由来
7. 神奈川県食品由来

菌株：O157:H7(VT2産生)

事例 3-3. メンチカツを原因とした食中毒事例（千葉県）

平成 28 年 10 月 31 日、神奈川県が『ある製造業者が販売した冷凍メンチカツを調理して喫食した者から EHEC O157 菌株が分離され、分離疫学的解析法によりこれら菌株の遺伝子型が一致した。また、当該冷凍メンチカツの販売店は千葉県にもある。』と報道発表をした。

10 月 18 日、千葉県 I 市で、当該冷凍メンチカツを調理・喫食した者から EHEC O157 菌株が分離された。11 月 7 日に千葉県衛生研究所に当該菌株が搬入され、11 月 8 日に MLVA 法の解析が終了した。同日、国立感染症研究所に、神奈川県内で分離された EHEC O157 菌株の MLVA 法のレポート数を照会したところ、千葉県内で分離された菌株のレポート数と一致した。

以上より、千葉県の事例についても、冷凍メンチカツが感染源であることが明らかとなった。

別添

IS-printing System (TOYOBO) による腸管出血性大腸菌 O157 の解析法の 実用的プロトコル

IS-printing System は Primer, Master mix 等がキット化されており, 添付の取扱い説明書に従って実施すれば解析結果を出すことが可能である。しかし, 判定しやすいきれいな電気泳動像を得るためには, テンプレート DNA の作製方法や泳動方法に関して多少の工夫が必要である。2014 年にパルスネット研究班関東ブロックで実施した「IS-printing System 解析に関するアンケート結果」から各施設で実施している方法を紹介し, 判定しやすい泳動像を得るためのコツをまとめた。

1. PCR 用 Template の調製

1) 推奨法 (取扱説明書) : アルカリ溶解法

- (1) 大きさ 1mm 程度の菌体コロニーを 50 μ L の 25mM NaOH 水溶液に懸濁
- (2) 95°C で 5 分間加熱
- (3) 4 μ L の 1M Tris-HCl (pH7.0~8.0) を加えて中和
- (4) 12,000rpm で 5 分間遠心し, 上清 1 μ L を PCR のテンプレートとする

2) 都健安研法

- (1) TSB で 37°C 18~20 時間培養する
- (2) 菌液を滅菌生理食塩水で 10 倍に希釈する
- (3) 100 μ L を 12,000rpm, 10 分間遠心し, 上清を除く
- (4) 100 μ L の 25mM NaOH 水溶液を加え懸濁
- (5) 100°C 10 分間加熱
- (6) 2/25M Tris-HCl (pH7.0~8.0) を 100 μ L 加えて中和
- (7) 12,000rpm で 5 分間遠心し, 上清 1 μ L を PCR のテンプレートとする

3) その他の DNA 濃度の調製方法

- (1) OD 値を測定
- (2) 滅菌 D.W.100 μ L に 1~2 集落を懸濁

2. PCR 反応液の調製 (取扱説明書のとおり)

1) 1st set

| | |
|----------------------------|--------------|
| 滅菌蒸留水 | 20-x μ L |
| 1 st primer set | 5 μ L |
| 2×Master mix | 25 μ L |

| | |
|----------------------------|--------------|
| Template DNA | x μ L |
| 合計 | 50 μ L |
| 2) 2 nd set | |
| 滅菌蒸留水 | 20-x μ L |
| 2 nd primer set | 5 μ L |
| 2×Master mix | 25 μ L |
| Template DNA | x μ L |
| 合計 | 50 μ L |

3. PCR サイクル条件 (取扱説明書のとおり)

| | | |
|------|-----|-----------|
| 96°C | 2分 | } 20 サイクル |
| 96°C | 20秒 | |
| 64°C | 30秒 | |
| 68°C | 1分 | |

4. 電気泳動

1) 電気泳動用アガロース

(1) 推奨法 (取扱説明書)

NuSieve GTG (2%) + SeaKem GTG (1%)

(2) その他の電気泳動用アガロース

- NuSieve GTG (1%) + SeaKem GTG (1%), 最終濃度 2%
- SeaKem Nusieve3.1 (3%)

2) 電気泳動用アガロースの作製方法

buffer は 0.5×TBE を使用

分離能を良くするために、劣化したアガロースは使用しないほうがよい。基本的には用時調整を推奨するが、やむをえない場合は作製してから数日間以内のものを使用する。

3) 電気泳動装置

泳動距離を長くしたほうが 1kb 付近のバンド間の距離が長くなり判定しやすくなる。通常の PCR 用アガロースゲルより大きいサイズを使用するなどの工夫をするとよい。

- Mupid
- Pico-2
- GelMate2000 など

4) 電気泳動時間

泳動距離を長くするためには、できるだけ長く泳動する。場合によっては泳動途中で電圧を切り変えることによってバンドの間隔をあけることもできる。

- ・ 45分～90分
- ・ 100分（50V50分，100V50分） など

泳動時の buffer の温度や室温によって泳動距離が変化するので，使用する Loading Dye の泳動位置を覚えておき，毎回一定の距離まできたら止めるようにする。

5) 電気泳動時の buffer の温度

あらかじめ冷やした buffer を使用することによってシャープなバンドを得ることができる。また泳動装置のまわりを氷で冷やしながらか泳動を行っても判定しやすいバンドを得ることができる。しかし beffer に温度差が生じてしまい（周辺部は温度が低く，中心部は温度が高くなる），泳動像が歪んでしまう場合もあることから，注意が必要である。

6) 染色液

エチジウム・ブロミドの他，生体に対してより安全な GelRed や GelGreen も使うことができる。

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
等活用状況調査および情報共有に関する研究

研究分担者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所
研究協力者 松本昌門 愛知県衛生研究所
山田和弘 愛知県衛生研究所
木全恵子 富山県衛生研究所
北川恵美子 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
田中保知 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 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 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. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

すべての地研から予定どおりの IS-printing 型が得られた。昨年度多く見られた *hly* の増幅不良は見られなかった。今年度の精度管理サンプルを昨年度使用した IS-printing 試薬のロットで試験したところ、*hly* の増幅が悪く、ロット間差によるものとみられた。

3. 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-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

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 の分子疫学手法として IS-printing system 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 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 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. 分子疫学解析の実施状況調査

各地研に PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況をアンケート調査した。調査項目としては実施の有無および実施頻度とした。

2. IS-printing 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 3 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、電気泳動条件についての調査を行った。なお、送付した 3 検体のうち、検体番号

②については 2-01 の上に非特異バンドが検出される株であった（図 1）。

3. 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-printing 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-printing 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-printing 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. 分子疫学解析の実施状況調査

各地研における分子疫学解析の実施状況を表 1 に示す。PFGE については保健所で検査を実施している一地研を除き、全ての地研が outbreak 発生時のみ実施としていた。IS-printing については一地研を除き全ての地研が全て又は outbreak のみ実施すると回答していた。一方、MLVA は 2 施設が全株を解析していたが、他の 9 施設は実施しないと回答した。

2. IS-printing 精度管理

各地研における IS-printing system の解析結果は表 2 のとおりである。全ての地研が正しい結果であった。昨年度の精度管理で多々見られた *hly(-)* の報告は、今年度は見られなかった。しかし今年度配布した IS-printing サンプルを昨年度と同ロットの試薬で確認したところ、*hly* の増幅が悪かった。

各地研における使用機器を表 2 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。

3. 地域共有データベース

平成 27 年 10 月 1 日から開始したデータベースの運用は平成 28 年 3 月 31 日で一旦停止し、平成 28 年 4 月 22 日から再開した。平成 29 年 2 月 20 日現在、5 つの地研から 125 株（そのうち、75 株が平成 28 年度の分離株）の EHEC O157 の IS-printing 情報が登録されている。データベースに登録された平成 28 年度分離の 75 株は 27 種類の IS-printing 型に分かれた。そのうち、10 種類の IS-printing 型に分類された 41 株において、複数県からの同一 IS-printing 型株の分離が見られた（表 3）。

D. 考察

1. 分子疫学解析の実施状況調査

検査を実施していない地研を除き、全ての地研で PFGE と IS-printing は実施可能であった。しかし、およそ半数は outbreak 発生時のみの検査であった。diffuse outbreak 対応するには日頃からデータを蓄積する必要があることから、各地研の協力が重要となる。また、登録のタイミングが遅い傾向にあり、頻繁にデータ登録を行ってもらうことも今後の課題である。一方 MLVA については、実施している施設は 2 施設のみであり、地域内での情報共有は困難である。MLVA データについては今後も感染症研究所経由での情報共有が続くとみられる。

2. IS-printing 精度管理

今年度の精度管理株は、比較的判定の容易なものを送ったこともあり、良好な結果を得た。また、各施設とも電気泳動の質が向上しており、良好な判定結果につながったと考えられる。*hly* のバンドが薄くなる問題は発生しなかったが、試薬のロット間差による増幅効率の違いが強く示唆された。

3. 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。同一 IS-printing 型の株は頻繁に分離されており、県境をまたいだ感染事例存在の可能性が示唆されたが、原因調査に

は結びつかなかったようである。衛生研究所には実地調査の権限がないことも多く、容易に調査ができない実態があると考えられる。また、同一 IS-printing 型株が比較的多く見られることも問題であり、より菌株識別能力の高い方法による裏付けが必要と考えられる。同一 IS-printing パターンの株が見つかった場合、可能な限り速やかに MLVA を行う体制を構築する必要があると考えられた。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. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

全ての施設で良好な結果が得られた。精度管理を通じて技術水準を保つことが重要である。

3. 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-printing 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

表 1 腸管出血性大腸菌分子疫学解析実施状況

| 施設名 | PFGE | IS-printing | MLVA | 備考 |
|----------|------|-------------|--------|-----------------------|
| 1 | 集団のみ | 集団のみ | 実施せず | |
| 2 | 集団のみ | 全株実施 | 行政依頼のみ | IS-printing は研究班依頼分のみ |
| 3 | 一部実施 | 全株実施 | 実施せず | |
| 愛知県衛生研究所 | 集団のみ | 全株実施 | 実施せず | IS-printing は研究として実施 |
| 4 | 一部実施 | 一部実施 | 実施せず | 今年度は解析実績無し |
| 5 | 集団のみ | 全株実施 | 全株実施 | |
| 6 | 全株実施 | 全株実施 | 実施せず | |
| 7 | 実施せず | 実施せず | 実施せず | |
| 8 | 一部実施 | 一部実施 | 実施せず | IS-printing は研究班依頼分のみ |
| 9 | 一部実施 | 一部実施 | 実施せず | |
| 10 | 実施せず | 実施せず | 実施せず | |

表 2 各施設における PCR 実施環境

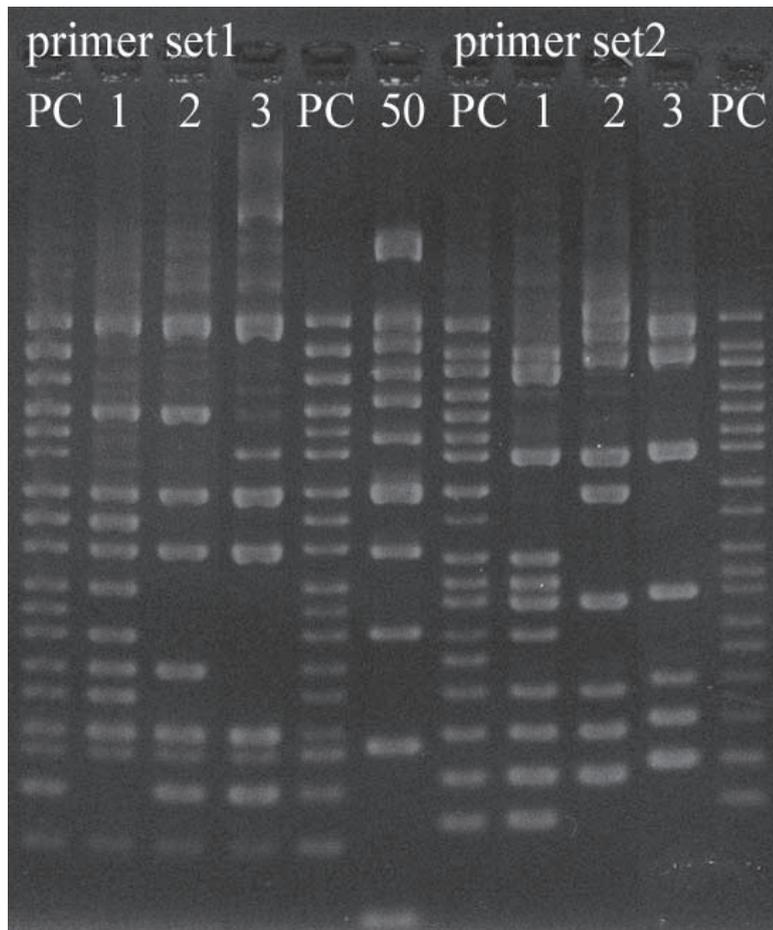
| 施設 | サーマルサイクラー | 電気泳動装置 | 備考 |
|----|---------------|------------------------------|--------------------------|
| 愛知 | 9700/TP650/GA | Mupid exU 100V 70 min | |
| A | TP600/TP650 | Mupid 100V 135 min | テンプレート作成は 5% Chelex 100 |
| B | Veriti | Mupid exU 100V 75 min | テンプレート作成は 5% Chelex 100 |
| C | Takara MP | iMyRUN 135V 110min | |
| D | 2720 | iMyRUN 100V 150min | NuSieve 3:1 Agarose 使用 |
| E | C1000 touch | Mupid 100V 60 min | 3% Agarose HC (関東化学)使用 |
| F | 9700 | BioRad sbcell GT 100V 65 min | NuSieve 3:1 Agarose 使用 |
| G | Veriti | CosmoBio MyRun 100V 110 min | NuSieve 3:1、カラム抽出 DNA 使用 |
| H | Veriti | Mupid exU 100V 60 min | |
| I | Veriti | Mupid 100V 70 min | |
| J | Veriti | Mupid exU 100V 70 min | |

9700 : GeneAmp PCR System 9700、TP600/TP650 :Takara TP600/TP650、GA : ASTEC Gene Atlas 322、
 2720 : Applied Biosystems 2720、MP : TaKaRa PCR Thermal Cycler MP、C1000 touch : BioRad C1000
 touch、Veriti : Applied Biosystems Veriti

表 3 複数県から検出された IS-printing パターン

| IS-printing パターン | 合計 | A | B | C | D | E |
|---------------------------------------|----|---|---|---|---|---|
| 110100111101111111-010100100111101111 | 7 | | | | 5 | 2 |
| 111100111101111101-011100100011101111 | 6 | 4 | 1 | | 1 | |
| 000100111101111111-011100100111001111 | 6 | 1 | | | 4 | 1 |
| 110100111101111101-010100100111101111 | 5 | | | 1 | 4 | |
| 010100101001101111-110100100011101011 | 5 | | 1 | 3 | 1 | |
| 110100111101111111-010100100111101011 | 4 | | 2 | 1 | 1 | |
| 111100111101101101-011100100011101111 | 2 | | 1 | | 1 | |
| 111100111101101111-011100100011101111 | 2 | | 1 | | 1 | |
| 111100111101111111-011100100011101111 | 2 | 1 | 1 | | | |
| 110001001001101101-110100100011101010 | 2 | 1 | 1 | | | |

図1 IS-printing 精度管理用に送付した 3 株の IS-printing パターン



50 : 50 bp ラダーマーカー、PC : ポジティブコントロール、1-3 : 検体

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 28 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 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| 研究協力者 | 梅原成子、坂口初美 | 滋賀県衛生科学センター |
| | 木上照子、大石剛史、藤本直樹 | 京都府保健環境研究所 |
| | 清水麻衣、吉田有希 | 京都市衛生環境研究所 |
| | 齋藤悦子、荻田堅一、秋山由美 | 兵庫県立健康生活科学研究所 |
| | 濱 夏樹、野本竜平 | 神戸市環境保健研究所 |
| | 横田隼一郎 | 姫路市環境衛生研究所 |
| | 村山隆太郎 | 尼崎市衛生研究所 |
| | 中村 寛海 | 大阪市立環境科学研究所 |
| | 福田弘美、下迫純子、木村友美 | 堺市衛生研究所 |
| | 田邊純子、久野翔平、辻本真弓 | 奈良県保健研究センター |
| | 西山貴士、金澤祐子 | 和歌山市衛生研究所 |
| | 中岡加陽子 | 和歌山県環境衛生研究センター |
| | 若林友騎、原田哲也、河原隆二 | 大阪府立公衆衛生研究所 |

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) 法の信頼性確保の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 11 施設中 2 施設で誤判定があり、正確な判定には、18 本の陽性対照バンドが十分な間隔で識別できる電気泳動画像と慎重な判断が必要であることを再認識した。PFGE 法の精度管理については概ね良好な結果であったが、画像によっては解析困難な部分があり、未消化バンドや薄いバンドあるいは極端に太いバンドの解消が課題である。近畿 IS データベースへの登録は昨年より減少したが、7 月には感染研 IS パターン番号 AA024 が急増した。ブロック内の情報交換により、一部の感染者については 7 月 2 日および 7 月 8 日に同一施設を利用しており、感染研 MLVA タイプも一致することが判明した。これまでのデータの蓄積から、IS 法は菌株によってエキストラバンドが増幅されることがわかっており、近畿 IS データベース登録株についてエキストラバンド情報を整理した。判定に影響があると考えられるサイズのエキストラバンドは、セット 1、セット 2 合わせて 22 か所に 643 本が登録されていた。特に運動性陰性株 (O157:HNM) は、セット 1 で約 800bp のエキ

ストラバンドが増幅されることが多く、1-03 との判別に注意が必要であると考えられた。

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必須のものであり、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し、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。また、これまでのデータの蓄積から、IS 法は菌株によってエキストラバンドが増幅されることがわかっている。これが特徴となった集団事例もあったが、誤判定につながる場合もあることから、近畿 IS データベース登録株のエキストラバンド情報を整理し、情報提供資料の作成を目指した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には、2016 年に大阪府内で分離された EHEC O157 5 株を使用し、所定の菌株搬送容器を用いて 13 か所の地衛研に送付した（表 1）。

2. IS 法の精度管理

IS 法は、IS-printing System Version 2（東洋紡）を使用し、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

各地衛研で 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大阪府立公衆衛生研究所（公衛研）に送付し、公衛研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. IS 法のエキストラバンドに関する情報収集

近畿 IS データベースから「エキストラバンド欄」に記載のあるデータを抽出し、サイズごとに、登録菌株数、登録施設、IS コードを整理した。代表的な菌株について登録施設に画像提供を依頼し、「エキストラバンド集」の作成を目指した。

5. 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、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

ドプ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 11 施設が参加し、概ね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 1-02 と 1-03 の間にエキストラバンドが増幅され、施設 2 と施設 13 で「1-02 陽性」と誤判定されていた。施設 13 の電気泳動画像はバンド間隔が狭く判定困難であったが (図 2)、施設 2 の画像では明らかに 1-02 とサイズが異なっていた。施設 2 は菌株 5 のセット 2 でも画像と判定表に不一致が見られたことから、判定のやり直しを、施設 13 には電気泳動の再実施を依頼し、他施設と一致した結果に達した。

菌株 4 は 1-12 に近接したエキストラバンドも増幅され、自動電気泳動装置を使用した 2 施設では 1-12 付近に 2 本のバンドが観察されたが (図 3)、アガロース電気泳動では「1-12 が太い」と観察されるにとどまった (図 1、図 2)。

2. 近畿 IS データベース 2016 年分離株の傾向

2016 年は 12 施設から 266 株が登録された (表 3、2017 年 2 月 8 日現在)。IS 型は 77 タイプに分かれ、11 株以上登録されたタイ

プは 5 タイプであった (表 4)。

感染研 IS パターン番号 AA024 は、過去 4 年間の登録数は 7 株であったが、社員旅行事例や家族事例を含む 32 株が 7 月に分離されていた (表 4、図 4)。ブロック内の情報交換により、一部の感染者については推定原因施設を 7 月 2 日および 7 月 8 日に利用したことが判明した。AA063、AA023 は昨年上位 5 タイプに入っていたが、今年は登録数が減少していた (図 4)。

3. IS 法のエキストラバンドに関する情報収集

2017 年 1 月 8 日までに近畿 IS データベースに登録された 2,914 株のうち、591 株でエキストラバンド欄が入力されていた。このうち誤判定の可能性が考えられるサイズについて、増幅位置ごとに登録株数と IS タイプ数をまとめた (図 5)。セット 1 は 12 か所、セット 2 は 10 か所で合計 648 本のエキストラバンドが増幅されていた。

セット 1 では b と j の位置に増幅される株が多く、このうち 117 株は両方にエキストラバンドがみられた (図 6a)。b の位置は 1-03 との判別に注意が必要であり、185 株中 149 株 (81%) は運動性陰性株であった。

セット 2 では m の位置のエキストラバンドに注意が必要で、特に 2-01 陰性の株では 2-01 陽性株に比べ判定が困難であった (図 6b、図 6c)。また、n の位置にエキストラバンドが増幅される株が多く、その IS タイプは多様であったが、2-01 や 2-02 に比べて明らかに増幅が弱い傾向がみられた (図 6c、

図 6d)。

4. EHEC O157 の PFGE 精度管理

PFGE の精度管理には 11 施設が参加し、このうち 6 施設は、集団事例の発生や行政依頼など精度管理以外にも PFGE を実施していた。送られてきた 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未消化が疑われるバンドがみられ、特に菌株 1 のバンドパターンが他の株に比べ不明瞭であった (図 7)。施設 2 や施設 11 でも、菌株によってバンドが薄い部分がみられた。一方、マーカーの Band 6 より大きいサイズで、バンドが極端に太い、あるいはレーン幅の中央と両端で太さが異なる画像もみられた (図 7)。

画像解析にあたっては、上記の薄いバンドや極端に太いバンドのほか、バックグラウンドの汚れがバンド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、菌株ごとにクラスターを作り、その近似度は 85.9~97.4% であった (図 8)。

D. 考察

近畿ブロックでは、IS 法を EHEC O157 遺伝子型別のスクリーニング法として位置づけ、2009 年から近畿 IS データベースを運用している。2016 年は近畿ブロック内で EHEC O157 による集団事例の発生はなく、近畿 IS データベースへの登録も昨年より減少した (表 3)。その中で 7 月には感染研 IS パターン番号 AA024 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。原因究明には至らなかったが、今後の分離動向が注視される。

本データベースの品質保証のため毎年精度管理を実施しており、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 株を配付した。菌株 4 は 1-02 (839bp) と 1-03 (742bp) の増幅が陰性であったが、800bp よりもやや大きいサイズのエキストラバンドが増幅され、1-02 との判別に注意が必要であった (図 1)。菌株 3 および菌株 5 は 1-02 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、バンド間隔が狭い電気泳動画像で誤判定がみられた。再実施された画像では明瞭に区別できたことから、各施設で泳動条件の最適化が望まれる。また、判定表への記載ミスも散見された。精度管理では電気泳動画像と判定表の提出を求めているため気づいたが、データベースへの登録時には入力後の確認をお願いしたい。昨年度の本研究で、Lot. 5001A の試薬では Template Mix で 2-09 の増幅が弱いことが明らかになったが、Lot. 6201A でも同様の傾向がみられた。IS 法は簡便で迅速性に優れた遺伝子型別法であるが、Multiplex PCR で陽性対照がすべて増幅され、正確に判定できる電気泳動を実施し、慎重に判定することが求められる。

2016 年 8 月には沖縄県旅行者関連の EHEC O157 食中毒が探知され、患者情報とともに IS 型別結果の提供が求められた。精度管理に用いた菌株 4 は当該事例由来株であり、沖縄県が画像付きの解析結果を集約

したことから「1-02 の下にエキストラバンドがあること」「1-12 の下にエキストラバンドがでる場合があること」の 2 点を早期から情報共有できた。

このようなエキストラバンド情報の共有を目指し、近畿 IS データベース登録株について、エキストラバンドの増幅位置ごとにデータを整理した。増幅位置によっては IS タイプが多様で、すべてのタイプについて画像を確認できていないが、特に運動性陰性株 (O157:HNM) は図 5 の b の位置にエキストラバンドが増幅されることが多く、1-03 との判別には注意が必要である (図 6a)。図 5 の n の位置に増幅されるエキストラバンドのように増幅が弱い場合もあるため、できるだけ多くの菌株について画像を確認し、増幅の強弱についてのコメントを掲載した「エキストラバンド集」の作成を目指す。

PFGE 法については、「精度管理株のみ実施」との回答が 5 施設あったものの、概ね良好な結果が得られた。デンドログラムでは、菌株 1 と菌株 5 で近似度の低い画像がみられたが、それ以外は 92%以上と高い近似度を示した。菌株によって (レーンによって) バンドの強さが極端に異なる画像では、自動バンド認識でも目視補正においても、薄いバンドの解析が困難であった。未消化バンドや薄いバンドあるいは極端に太いバンドについて、トラブルシューティングできておらず、今後の課題である。次年度は、プロトコルどおりの実施を求めるとともに、菌株の培養条件やプラグのカットサイズなど、ステップごとに他施設の手法を学べるような方策を検討したい。

E. 結論

IS-printing System (IS) 法の精度管理を実施することにより、正確な判定には 18 本の陽性対照バンドが十分な間隔で識別できる電気泳動画像が必要であることを再認識した。

近畿 IS データベースへの登録は昨年より減少したが、7 月には感染研 IS パターン番号 AA024 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。

IS 法のエキストラバンドについて、近畿 IS データベース登録株の情報を整理した。特に運動性陰性株 (O157:HNM) において、1-03 との判別に注意が必要なエキストラバンドが増幅されていた。

PFGE 法の精度管理については、概ね良好な結果であったが、未消化バンドや薄いバンドあるいは極端に太いバンドの解消が課題である。

F. 研究発表

1. 誌上発表

1) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T: Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2016, 7:765.

2) 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 河原隆二, 久米田裕子, 田邊純子, 福田弘美, 中村寛海, 松原弘明, 泉谷秀昌: 近畿の飲食チェーン店で発生した食中毒が疑われる腸管出血性大腸菌 O157 事例. *病原微生物検出情報* 2016, 37:89-90.

2. 学会発表

- 1) 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 伊豫田淳: Non-O157 STEC の検査法—大阪府公衛研の経験を中心に—. 第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016年11月, 富山)

- 2) 田口真澄, 河原隆二, 原田哲也, 勢戸和子: 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向. 第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016年11月, 富山)

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, VT2) | 2016 | 154127 | 203855 | 16m0032 |
| 2 | EHEC O157:H7 (VT1, VT2) | 2016 | 216959 | 84459 | 16m0094 |
| 3 | EHEC O157:H7 (VT1, VT2) | 2016 | 248701 | 125359 | 16m0152 |
| 4 | EHEC O157:H7 (VT2) | 2016 | 2159 | 114922 | 16m0169 |
| 5 | EHEC O157:H7 (VT2) | 2016 | 84527 | 182790 | 16m0192 |

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 | サブマリン電気泳動装置 (ゲルサイズ 12x12cm) | 100V 180分 |
| 2 | 5001A | Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 | Mupid-2plus | 100V 60分 + 50V 15分 |
| 3 | 5001A | TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-600 | Mupid-2plus | 50V 60分 + 100V 45分 |
| 4 | 6201A | Applied Biosystems Verti Thermal Cycler | Mupid-exU | 100V 60分 + 50V 15分 |
| 5 | 6201A | Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler | QIAxcel (DNA High Resolution Cartridge) | 5kV 35分 |
| 6 | 5001A | Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 | Mupid-2plus | 50V 45分 + 100V 80分 + 50V 50分 |
| 8 | 5001A | TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini | Mupid J | 135V 25分 + 50V 30分 |
| 9 | 5001A | BIOER Life Touch | GelMate2000 | 100V 120分 |
| 10 | 5001A | Applied Biosystems Verti Thermal Cycler | Mupid | 100V 65分 + 50V 30分 |
| 11 | 5001A | TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-600 | MultiNA (DNA-1000) | |
| 13 | 5001A | Agilent SureCycler 8800 | Mupid-2plus | 50V 60分 + 100V 50分 |

表3 近畿ISデータベース登録数(2012年～2016年)

| 施設 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 実施状況 |
|----|------|------|------|------|------|-------------------|
| 1 | 16 | 28 | 26 | 32 | 50 | 全株 |
| 2 | 10 | 6 | 12 | 5 | 4 | 全株 |
| 3 | 26 | 33 | 23 | 21 | 23 | ほぼ全株 ^a |
| 4 | 36 | 56 | 22 | 43 | 22 | 全株 |
| 5 | 13 | 23 | 7 | 12 | 33 | 全株 |
| 6 | 3 | 8 | 25 | 3 | 11 | 全株 |
| 7 | 30 | 47 | 32 | 33 | 34 | (全株) ^b |
| 8 | 9 | 12 | 10 | 50 | 15 | 全株 |
| 9 | 13 | 26 | 19 | 20 | 20 | 全株 |
| 10 | 3 | 7 | 4 | 3 | 1 | 全株 |
| 11 | 54 | 42 | 69 | 94 | 52 | 全株 |
| 13 | 7 | 7 | 5 | 2 | 1 | ほぼ全株 ^c |
| 計 | 220 | 295 | 254 | 318 | 266 | |

a 同一人の服薬後検便で分離された株を除く

b テンプレートを提供し施設11で実施

c 一部の株は収集できていない

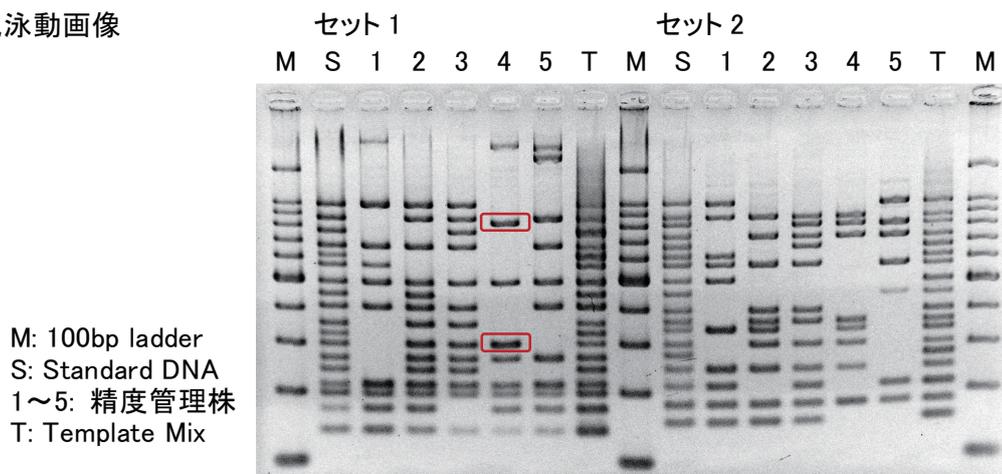
表4 2016年分離株の主なIS型

| 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 |
|----------------------|-----------------------|-----|-------|-----------|-------------------|
| 216943 | 116975 AA024 | 33 | 5 | 5月, 7月 | 社員旅行事例と3つの家族事例を含む |
| 249711 | 116975 AA063 | 19 | 6 | 5～10月 | 2つの家族またはグループ事例を含む |
| 216959 | 84463 AA023 | 14 | 5 | 5～10月 | 3つの家族事例を含む |
| 249727 | 116975 AA018 | 12 | 5 | 6～8月, 10月 | 3つの家族またはグループ事例を含む |
| 137743 | 198734 AA031 | 11 | 4 | 6～10月 | 2つの家族事例を含む |

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

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 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 菌株2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 菌株3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | |
| 菌株4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 820 |
| 菌株5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

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

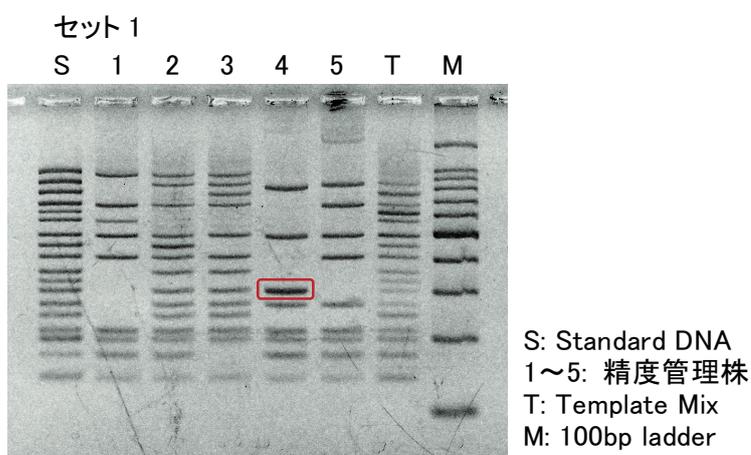


図2 IS-printing System の精度管理実施例(施設13)

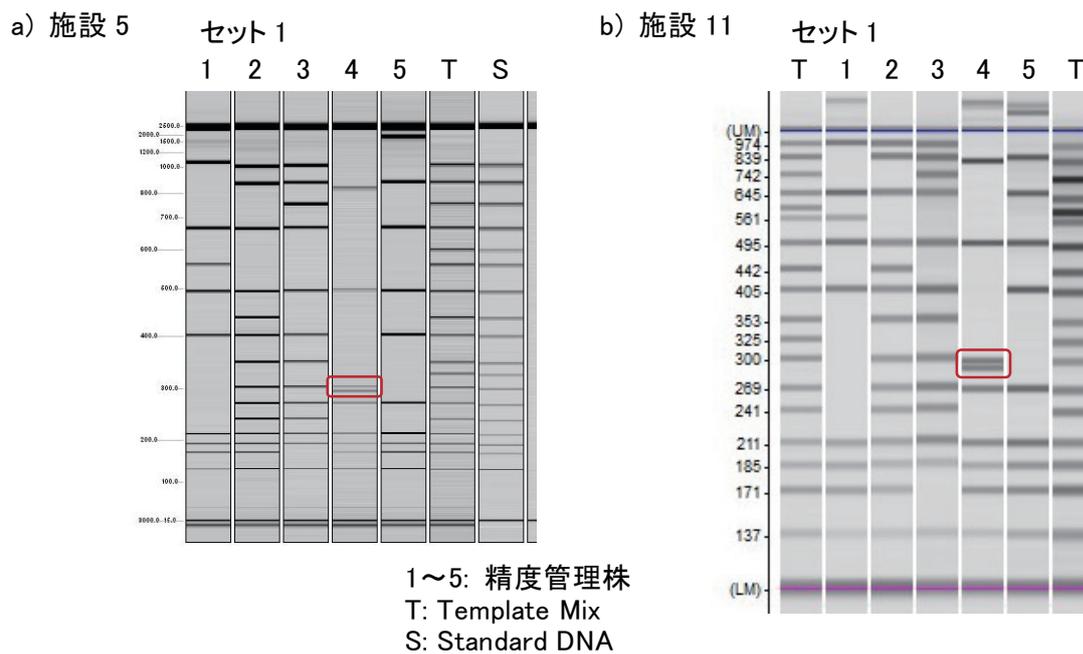


図 3 自動電気泳動装置を用いた IS-printing System 精度管理実施例

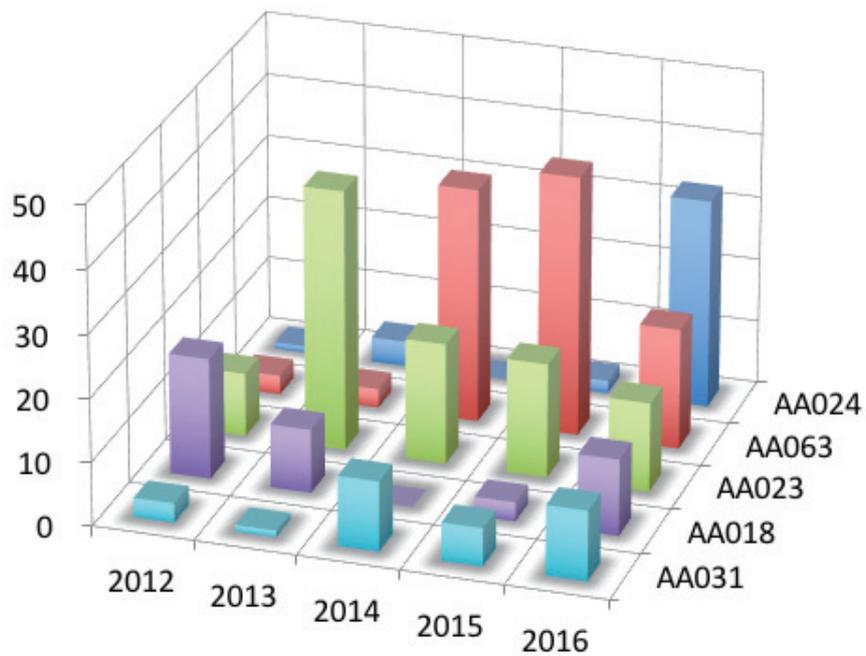
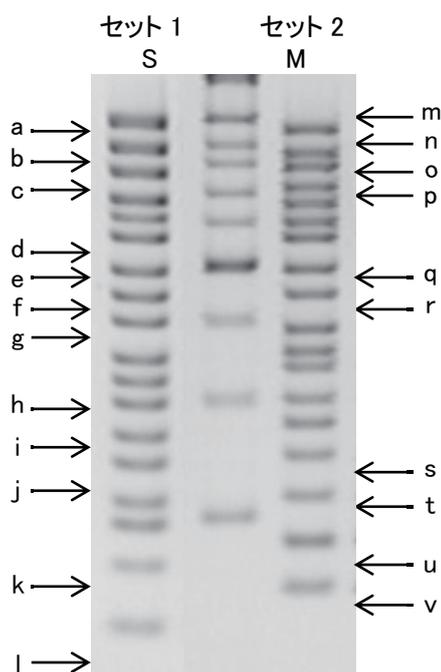


図 4 主な IS 型の分離状況の推移 (2012~2016 年)



| | 増幅位置 | 登録株数 | ISタイプ数 |
|---|-------------|------|--------|
| a | 1-01と1-02の間 | 1 | 1 |
| b | 1-02と1-03の間 | 185 | 19 |
| c | 1-03と1-04の間 | 1 | 1 |
| d | 1-06と1-07の間 | 6 | 3 |
| e | 1-07と1-08の間 | 2 | 1 |
| f | 1-08と1-09の間 | 1 | 1 |
| g | 1-09と1-10の間 | 7 | 4 |
| h | 1-12と1-13の間 | 12 | 7 |
| i | 1-13と1-14の間 | 2 | 1 |
| j | 1-15の上 | 172 | 23 |
| k | 1-16とhlyAの間 | 6 | 5 |
| l | hlyAの下 | 12 | 7 |
| m | 2-01のすぐ上 | 30 | 19 |
| n | 2-01と2-02の間 | 139 | 56 |
| o | 2-03と2-04の間 | 37 | 2 |
| p | 2-04と2-05の間 | 1 | 1 |
| q | 2-08と2-09の間 | 1 | 1 |
| r | 2-09と2-10の間 | 2 | 2 |
| s | 2-15と2-16の間 | 1 | 1 |
| t | 2-16とstx2の間 | 8 | 7 |
| u | stx2とstx1の間 | 2 | 2 |
| v | stx1の下 | 15 | 7 |

図 5 IS-printing System のエキストラバンド増幅位置と近畿 IS データベース登録株数

a) 1-02 と 1-03 の間、1-15 の上

• 泳動像



• 方法

- 使用機器: サブマリン電気泳動装置
- 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE
100V 180分

• 結果

- エキストラバンドの位置
 - 1-02と1-03の間、1-15の上
- 近畿ISコード 68207-215275
- 判定表
 - Set1: 010000101001101111
 - Set2: 110100100011101011

• 実施機関

- 施設1 2013年分離株 E13038

- 備考(コメント・注意点等)
 - 1-03との誤判定に注意

図 6 判定に注意が必要な IS-printing System エキストラバンド

b) 2-01 の上

・ 泳動像



- ・ 方法
 - 使用機器: Mupid ex
 - 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE
50V 40分 + 100V 50分
- ・ 結果
 - エキストラバンドの位置
 - ・ 2-01の上
 - 近畿ISコード 148015-68686
 - 判定表
 - ・ Set1: 100100001000101111
 - ・ Set2: 010000110001001110
- ・ 実施機関
 - 施設11 2012年分離株 PV12-017
- ・ 備考(コメント・注意点等)
 - 2-01との誤判定に注意

c) 2-01 の上、2-01 と 2-02 の間

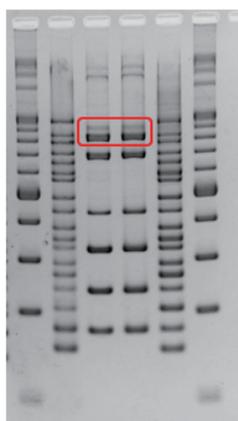
・ 泳動像



- ・ 方法
 - 使用機器: Mupid
 - 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE
100V 60分 + 50V 40分
- ・ 結果
 - エキストラバンドの位置
 - ・ 2-01の上、2-01と2-02の間
 - 近畿ISコード 148015-199758
 - 判定表
 - ・ Set1: 100100001000101111
 - ・ Set2: 110000110001001110
- ・ 実施機関
 - 施設10 2010年分離株 10-049
- ・ 備考(コメント・注意点等)
 - 2-01と2-02の間のバンドは薄い

d) 2-01 と 2-02 の間

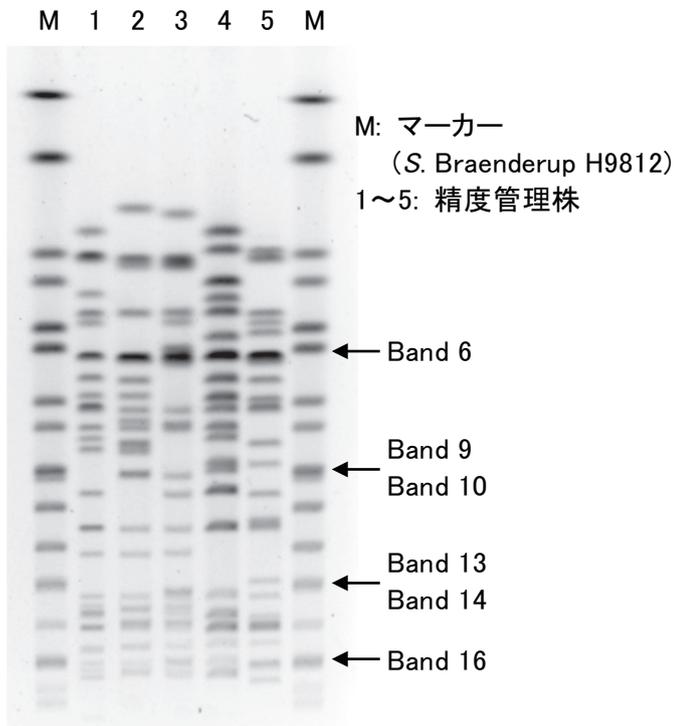
・ 泳動像



- ・ 方法
 - 使用機器: GelMate 2000(東洋紡)
 - 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE
100V 120分
- ・ 結果
 - エキストラバンドの位置
 - ・ 2-01と2-02の間
 - 近畿ISコード 17453-82506
 - 判定表
 - ・ Set1: 010100101001101111
 - ・ Set2: 011000101010001110
- ・ 実施機関
 - 施設9 2014年分離株 H26V21, H26V22
- ・ 備考(コメント・注意点等)
 - 2-02の上の薄いバンド

図 6 判定に注意が必要な IS-printing System エキストラバンド(つづき)

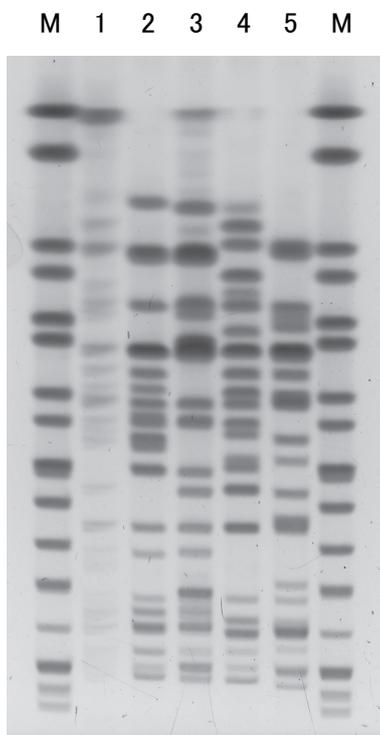
施設 8



施設 1



施設 5



施設 12

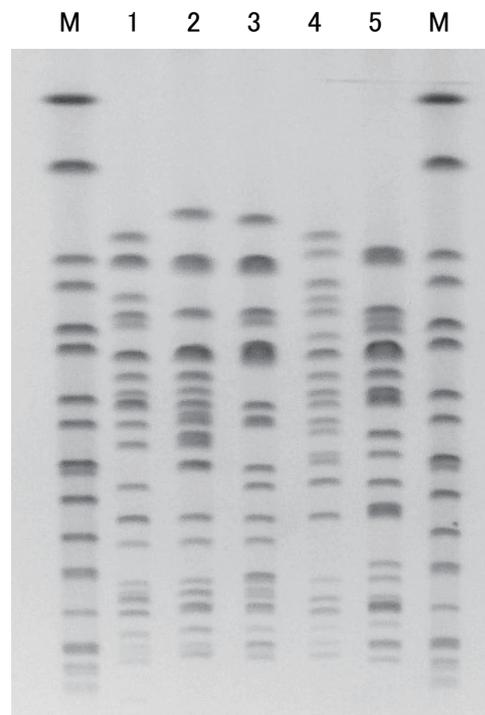


図 7 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像例

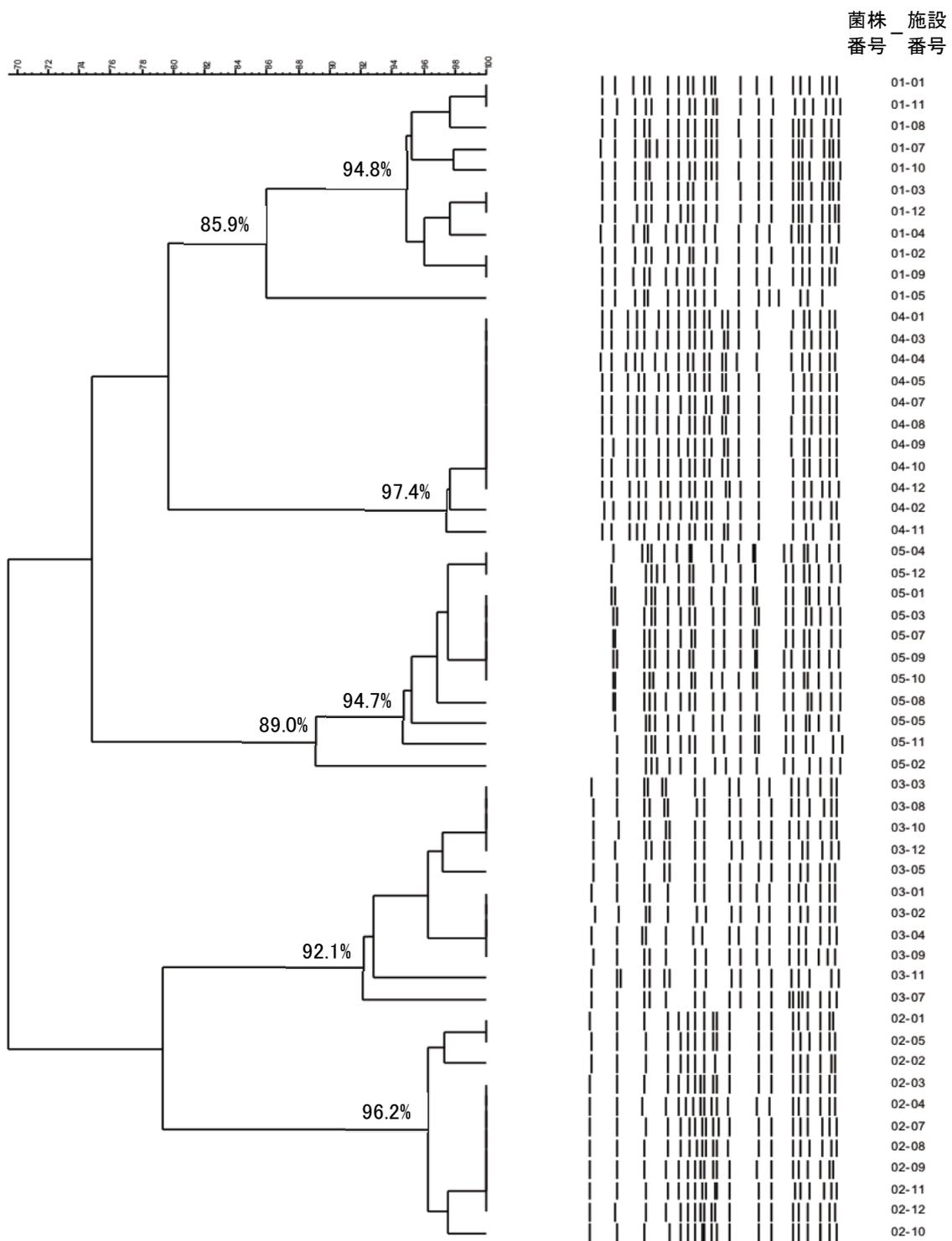


図 8 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

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 28 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 | 中嶋 洋 | 岡山県環境保健センター |
| 研究協力者 | 佐倉 千尋 | 鳥取県衛生環境研究所 |
| | 川上 優太 | 島根県保健環境科学研究所 |
| | 福間 藍子 | 〃 |
| | 河合 央博 | 岡山県環境保健センター |
| | 仲 敦史 | 〃 |
| | 畑 ますみ | 〃 |
| | 秋田 裕子 | 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| | 増田 加奈子 | 〃 |
| | 平塚 貴大 | 〃 |
| | 千神 彩香 | 広島市衛生研究所 |
| | 青田 達明 | 〃 |
| | 栗林 智早 | 〃 |
| | 坂本 綾 | 〃 |
| | 松室 信宏 | 〃 |
| | 石村 勝之 | 〃 |
| | 尾羽根 紀子 | 山口県環境保健センター |
| | 亀山 光博 | 〃 |
| | 大塚 仁 | 〃 |
| | 野村 泰晴 | 〃 |
| | 市原 ふみ | 徳島県立保健製薬環境センター |
| | 内田 順子 | 香川県環境保健研究センター |
| | 岩下 陽子 | 〃 |
| | 関 和美 | 〃 |
| | 福田 千恵美 | 〃 |
| | 仙波 敬子 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
| | 園部 祥代 | 〃 |
| | 高木 春佳 | 高知県衛生研究所 |
| | 高橋 とみよ | 〃 |
| | 戸梶 彰彦 | 〃 |
| | 松本 道明 | 〃 |

研究要旨

食品由来感染症の広域発生事例においては、事例由来株の分子疫学解析結果等を共有・比較する必要がある。このため、中四国地域の各施設における分子疫学解析手法の技術の維持と解析精度の向上や、将来的に解析データや疫学情報を用いたデータベースを構築し利用可能にすることを目的として、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 菌株を用いた IS-printing System、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)及び multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA 法) による精度管理を、実施した。その結果、多くの施設が良好な結果であったが、一部施設では検査法の改良・工夫や技術の習熟が必要と思われた。

平成 28 年度に中四国地域で発生した EHEC による感染事例について、IS-printing system 等による分子疫学解析データや疫学情報を収集し解析した結果、7 種類の IS コードの菌による感染事例の発生が、複数の県で確認された。このうち、疫学的な関連が確認された 2 事例を含めて 5 事例では、MLVA 法による解析結果も一致していた。広域発生事例の疫学解析に重要である分子疫学解析結果等を用いたデータベース構築に向け、今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になるものと思われる。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域事例発生時には、事例由来株の分子疫学解析結果の比較が必要であり、解析技術の維持と解析精度の向上は重要である。このため、全国を 6 ブロックに分けて、各地域で解析手法毎の精度管理を実施している。さらに、事例由来株の分子疫学解析データを共有して相互に利用可能にするため、国立感染症研究所にサーバーを設置し、IS-printing System (以下、IS-PS とする) と菌株情報を用いたデータベースの構築とその利用を試行している。中四国ブロックでは、昨年度に引き続き平成 28 年度も IS-PS、パルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE 法とする) 、さらに multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (以下、MLVA 法とする) について、腸管出血性大腸菌 (以下、EHEC とする) O157 株を用いて精度管理を実施した。また、ブロック内での EHEC 発生事例について疫学情報を収集

し、分子疫学解析結果を比較して、関連性や流行株などを解析した。

B. 研究方法

1. 使用菌株 (表 1)

精度管理：岡山県で平成 28 年度に分離されたヒト由来 EHEC O157 株 (No1940:H7,VT2、No1945:H7,VT2、No1947:H7,VT1,2、No1950:H7,VT1,2、No1951:H7,VT1,2) の 5 株を使用した。

EHEC 感染事例解析：平成 28 年度に中四国地域で発生した事例の患者等由来株 288 株について、中四国地域の 10 施設で分子疫学解析を行った。

2. 分子疫学解析法及び精度管理

(1) IS-PS

IS-printing System (Version2 : TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。本法の各プライマーにより増

幅される産物は、プライマーセット（1st set 及び 2nd set primer）毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット（Api）の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を区分毎に足してコード（IS コード）化し、コードによる解析を行った。

(2) PFGE 法

PFGE 法は感染研ニュープロトコール（集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた）に従って実施し、画像解析ソフト（BioNumerics）を使用して泳動像の解析を行った。

(3) MLVA 法及び型別

MLVA 法は、実施可能な 4 施設で行った。また、MLVA 型別は、すべての施設が菌株を国立感染症研究所に送付して、実施した。

(4) 精度管理

平成 28 年度は 10 施設が参加し、精度管理用の EHEC 菌株 5 株を各施設に送付して、解析を行った。IS-PS は 10 施設（A～J）で、PFGE 法は 9 施設（A,C～J）で、MLVA 法は 4 施設（D～F,I）で実施した。IS-PS は、各 primer set の増幅産物をコード化した IS コードを、PFGE 法は、解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを、それぞれの泳動像とともに回収し、解析した。MLVA 法はターゲットとする遺伝子座のリピート配列数を比較解析した。

3. IS-PS 解析事例の収集

IS-PS 解析集の作成に向けて、IS-PS 解析でエキストラバンドが出現する事例を収集し、解析した。

4. 疫学情報の収集と解析

将来のデータベース構築に向け、中四国

地域で発生した EHEC 感染事例について、患者等由来株の IS-PS や MLVA 法による解析結果を菌株情報とともに収集し、比較・解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) IS-PS による解析

IS-PS の精度管理は、中四国地域の 10 施設が参加して実施した。各施設の IS コードによる解析結果は表 2 に、泳動像は図 1 に示した。多くの施設の解析結果は一致していたが、3 施設（施設 E、H、J）ではいずれも 1st set primer の増幅産物について、IS コードの一部が他の施設と異なっていた。また、1 施設では単一の primer では増幅されるが、set primer では増幅産物の不鮮明化や増幅されないケースが確認された。

(2) PFGE 法による解析

中四国ブロックの 10 施設中 9 施設が参加して実施し、このうち 8 施設でデンドログラム解析を実施した。各施設の泳動像とデンドログラム解析結果は、図 2 に示した。また、結果をまとめて、表 3 に示した。本年度も昨年度に引き続いて、ほとんどの施設が良好な泳動像を示した。デンドログラム解析を実施した 8 施設の結果は、パターンの類似度の最大値が 100%、最小値は 65%で、施設毎の差はほとんど見られなかったが、類似度の順序のパターンは 2 グループに分かれた。No1950 と 1951 は疫学的に関連のある株で、7 施設の解析結果が 100%で一致したが、1 施設は 98%であった。

(3) MLVA 法による解析

MLVA 法は、中四国ブロックの 4 施設で

実施した。3施設は O157 株の 17 遺伝子座を、1 施設は 9 遺伝子座について、リピート数を解析した。その結果を、表 4 に示した。2 施設 (D と E) の解析結果は一致していたが、施設 F は 2 つの、施設 I では 4 つの遺伝子座の解析結果が、施設 D 及び E と異なっていた。これら以外の遺伝子座の解析結果は、各施設とも一致していた。

2. IS-PS 解析事例

IS-PS 解析でエキストラバンドが出現した事例を収集・解析し、表 5 に示した。14 種類の IS コードの株について、15 種類のエキストラバンドが確認された。このうち、5 種類の IS コード株 (C ⑦、C ④、C ③、C ⑨、C ⑤) は複数の県で分離され、2 種類の IS コード株 (H ①、E ④) は同一県内から複数株が分離された。また、1 種類の IS コード株はエキストラバンドの位置が異なる 2 種類の株 (E ③、E ④) が確認された。

3. 中四国地域の EHEC 感染事例発生状況と解析結果

中四国地域で平成 28 年度に発生した EHEC 感染事例について、各県の施設で実施した患者等由来株の IS-PS による解析結果と、MLVA 型等を含む疫学情報を収集した。EHEC O26 株については、同一の MLVA 型 (13m2040) 及び MLVA complex (16c204) の株が、複数県 (B と D) で検出された (表 6-1)。EHEC O157 株については、7 種類の IS コードの株が複数の県から分離された。集団事例あるいは同一施設関連の事例 (表 6-2 ①、⑤) が 2 事例あり、このうちの一部の株では、1st set primer による IS コードの一部や MLVA 型が他の関連株と異なっていた。これら疫学的に関連のある事例由来株を含め、4 種類

の IS コード株による事例 (001457-610652、317577-211757、717557-611657、717577-611657) においては、同一 IS コードに加えて 5 種類の MLVA 型及び 4 種類の MLVA complex が、一致していた。また、家族内感染事例 4 事例のうち 3 事例でも、IS コード、MLVA 型及び MLVA complex が一致していた。

D 考 察

平成 28 年度に実施した IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による EHEC O157 株を用いた精度管理では、多くの施設で解析結果は良好で、一部の施設が他施設と異なった結果を報告した。IS-PS では、3 施設が 1st set primer の増幅産物による IS コードの一部が、他の施設と異なっていた。これは、増幅産物のバンド位置の確認ミスや薄い増幅産物のバンドの見逃しによる読み違い、あるいはコード化のミスなどが原因と思われた。これらの問題解決には、①泳動距離の長いゲルを使用して増幅産物のバンド間の距離を延ばして、バンドの位置確認を正確に行う、②適切な濃度のテンプレートを調製し、増幅産物の薄いバンドや低分子量のバンドの確認ミスを回避する必要がある。また、1 施設で、単一の primer では増幅され、set primer によるマルチプレックス PCR ではバンドが不鮮明なケースや増幅されないケースが確認された。これは、機械的な不具合が原因と推察されたが、各施設においても検査を実施する際に、陽性対照のすべてのバンドについて増幅を確認し、日常の機器の点検を注意して行う必要があると思われた。PFGE 法による解析は、ほとんどの施設が良好な泳動像を示し、デンドログラム解析結果も、施設毎の

差はほとんど見られなかった。デンドログラム解析では実施者による差や泳動像の鮮明さ等により、DNA バンドの位置の指定が異なり、解析結果に影響するため、慎重な解析が必要である。MLVA 法は、実施した 4 施設のうち 2 施設の結果が異なっていた。未だ未導入の施設が多いが、国立感染症研究所では現在主になっている解析方法であるため、既に実施している施設や今後導入を予定している施設も含めて、本解析法の技術的な習熟が必要であり、さらに解析精度の維持・向上が重要と思われた。

IS-PS 解析集の作成に向けて、エクストラバンドの出現事例を収集している。今までの解析データから、14 種類の IS コード株において、15 種類のエクストラバンドが確認された。今後、各ブロックのデータを集積して、膨大なエクストラバンド事例集の作成が予定されており、IS-PS 解析時に役立つものと期待される。

中四国地域で本年度発生した事例の情報を収集し、分子疫学的な解析を行った。その結果、O26 は 1 種類、O157 は 7 種類の IS コードの株が、複数の県から分離された。同一の IS コード株のうち、疫学的な関連性が確認された事例においては、同じ MLVA 型及び MLVA complex を示したが、一部の株では IS-PS の 1 バンドと MLVA 型の 1 遺伝子座の結果が異なっていた。これらはいずれも、人から人への感染の過程での遺伝子変異によるものと思われた。散発事例

では、同一 IS コードで MLVA 型も一致する株があったが、それらの関連は不明である。疫学的な事例解析には、詳細な疫学情報の収集と、それに基づく解析が必要であり、分子疫学解析結果を加えて、関連性を明らかにすることが重要である。

E 結論

1. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 株を用いて、PFGE 法、IS-PS 及び MLVA 法による精度管理を実施した。
2. いずれの方法においても、参加した施設の多くが同じ結果を示したが、一部の施設では結果が異なっていた。
3. PFGE 法及び IS-PS による解析では、鮮明な泳動像を得ることが重要であり、検査技術への習熟と検査法の工夫が必要である。
4. 中四国地域で同一 IS コードの株が複数の県から分離された事例では、疫学的に関連のある株の MLVA 型や MLVA complex は、一致していた。
5. 分子疫学解析においても、疫学情報に基づいた解析が重要である。

F. 研究発表

なし。

表1 精度管理使用 EHEC 菌株

| 菌株No | 血清型 | | 毒素型 | MLVA型(感染研) |
|------|-----|----|-----|----------------|
| | O群 | H型 | | |
| 1940 | 157 | 7 | 1,2 | 16m0095 |
| 1945 | 157 | 7 | 2 | 16m0110 16c027 |
| 1947 | 157 | 7 | 1,2 | 14m0053 16c011 |
| 1950 | 157 | 7 | 1,2 | 16m0228 16c010 |
| 1951 | 157 | 7 | 1,2 | 16m0228 16c010 |

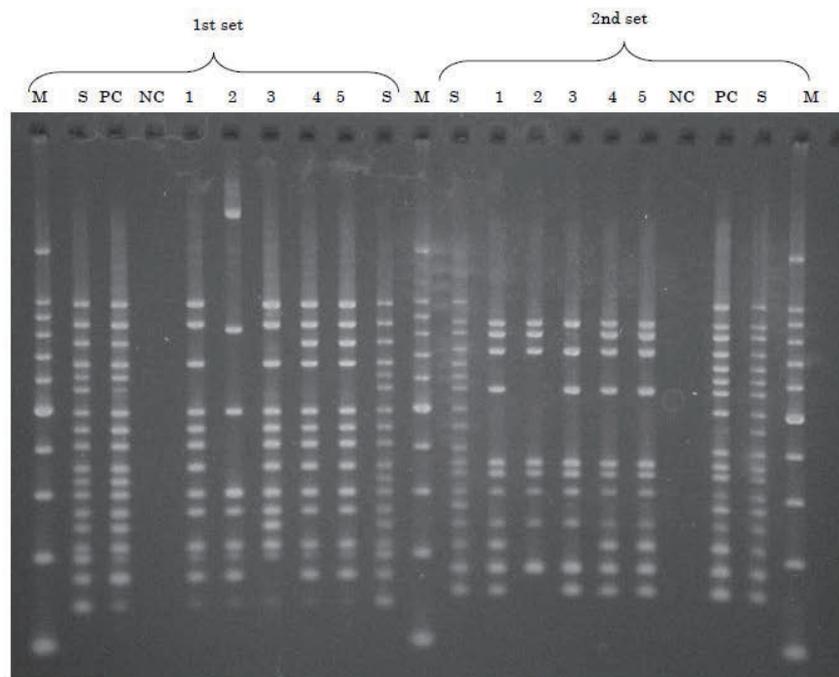
表2 IS-PS による解析結果

| 施設 | 1940 | | 1945 | | 1947 | | 1950 | | 1951 | |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| (A) | 317557 | 611657 | 001457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (B) | 317557 | 611657 | 001457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (C) | 317557 | 611657 | 001457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (D) | 317557 | 611657 | 001457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (E) | 317557 | 611657 | 211457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (F) | 317557 | 611657 | 001457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (G) | 317557 | 611657 | 001457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (H) | 317556 | 611657 | 201457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (I) | 317557 | 611657 | 001457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |
| (J) | 317557 | 611657 | 201457 | 610652 | 317575 | 211656 | 717557 | 611657 | 717557 | 611657 |

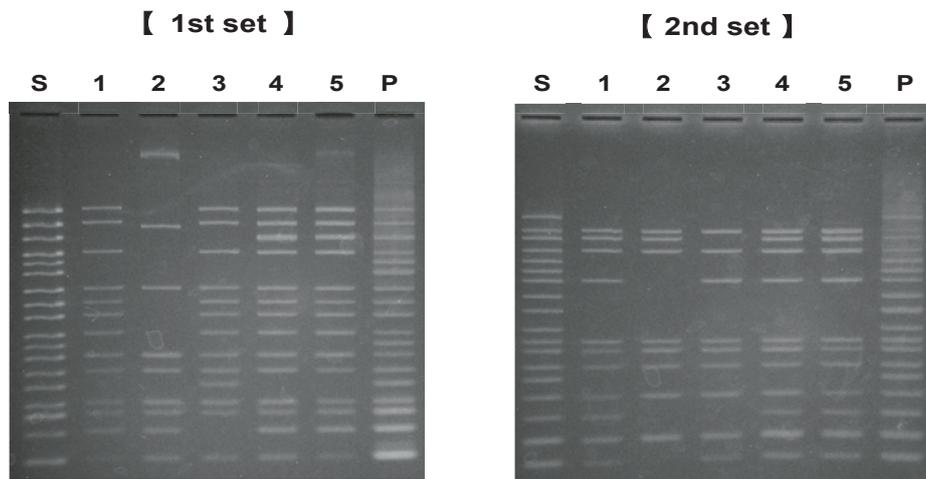
図1 IS-PS 泳動像

(A)

M:100bp ラダーマーカー
 S:スタンダード DNA
 PC:陽性コントロール
 NC:陰性コントロール
 1:1940
 2:1945
 3:1947
 4:1950
 5:1951

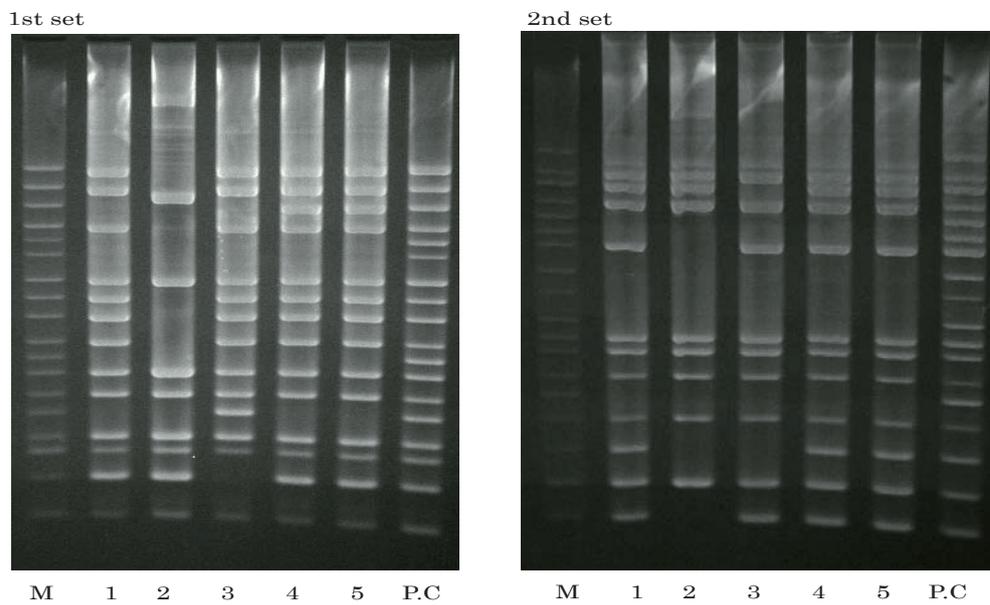


(D)



レ ー ン S : Standard DNA
1 : No.1940
2 : No.1945
3 : No.1947
4 : No.1950
5 : No.1951
P : Positive control

(E)

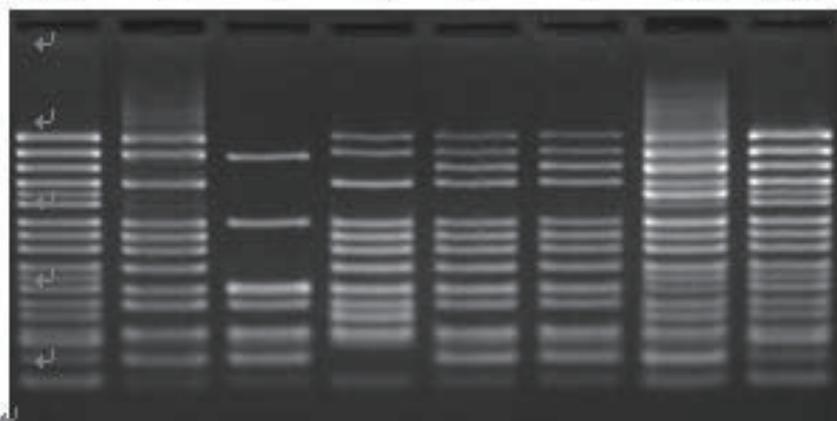


レ ー ン 1 : 1940
2 : 1945
3 : 1947
4 : 1950
5 : 1951

(J)

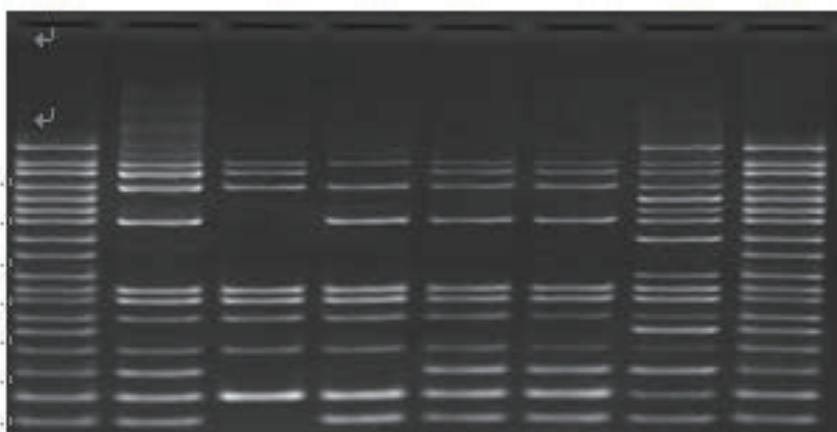
1st set.

St 1 2 3 4 5 PC St



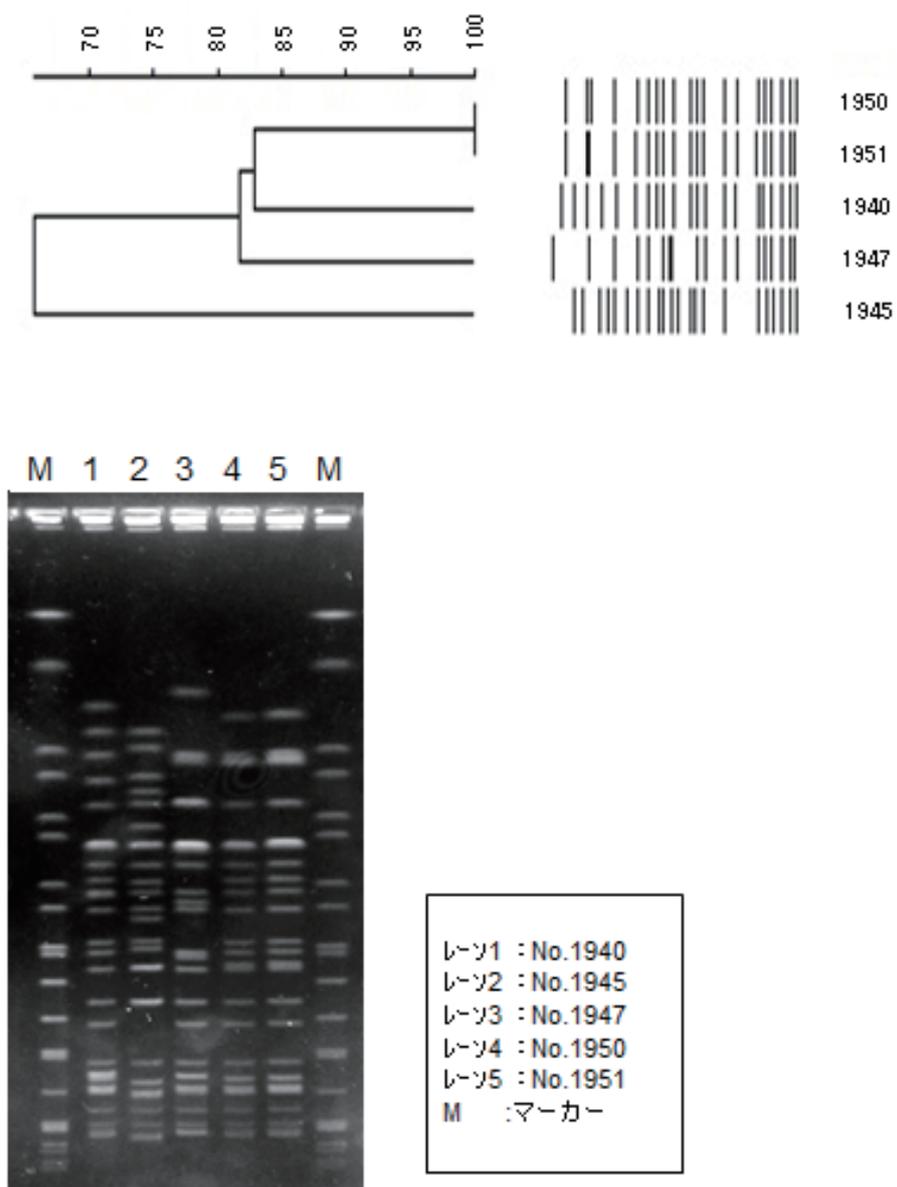
2nd set

St 1 2 3 4 5 PC St

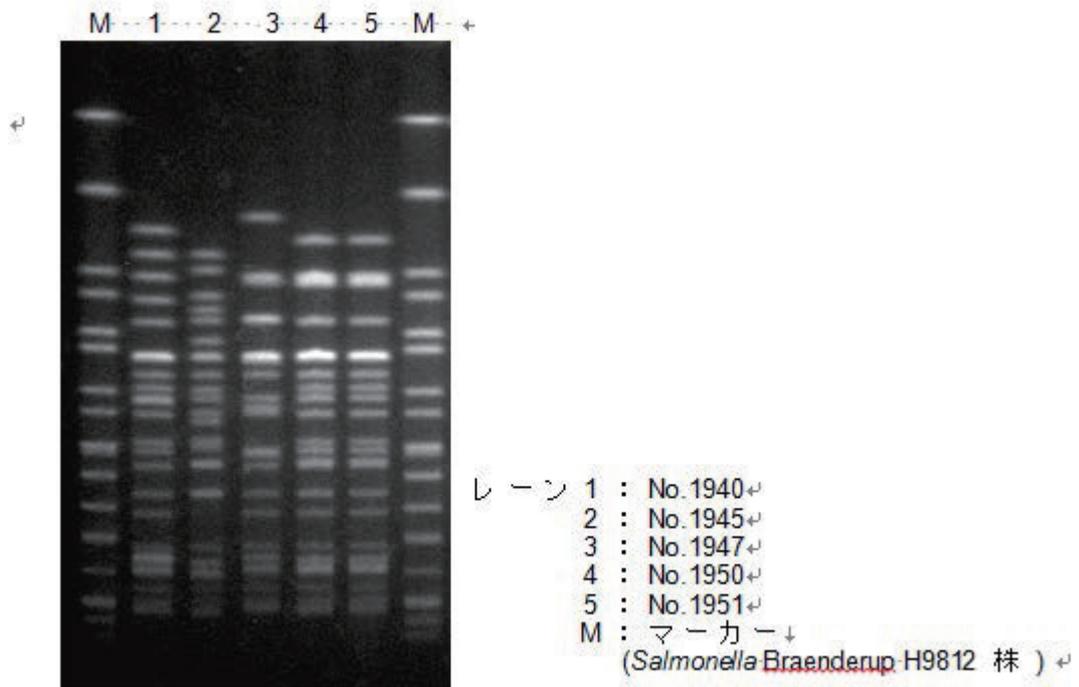
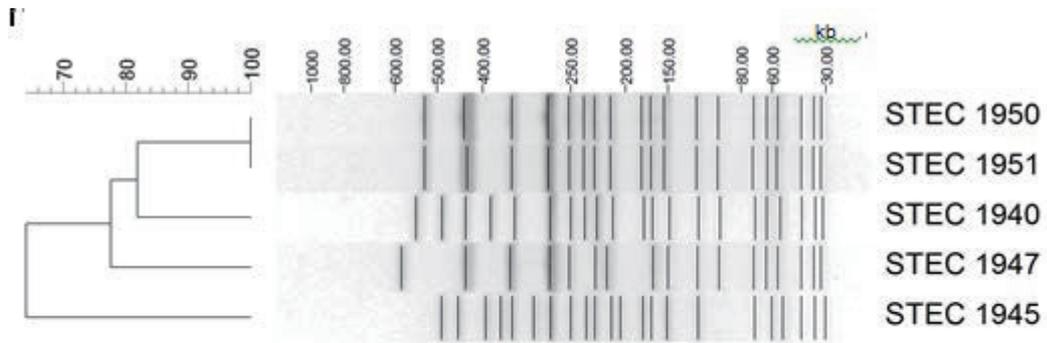


- 1: STEC1940(O157:H7)-----St:スタンダード.
2: STEC1945(O157:H7)-----PC:ポジティブコントロール
3: STEC1947(O157:H7).
4: STEC1950(O157:H7).
5: STEC1951(O157:H7).

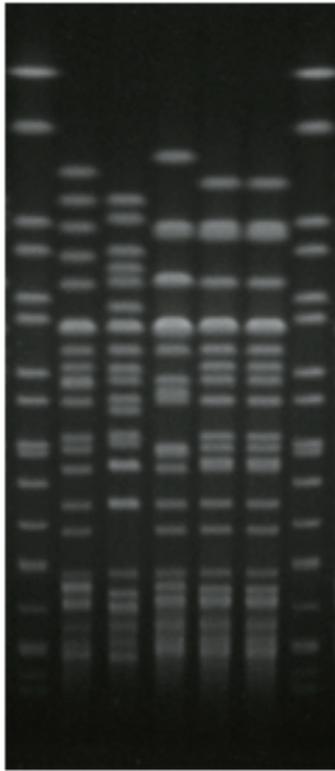
図2 PFGE 法による泳動像とデンドログラム解析結果
(C)



(D)



(E)



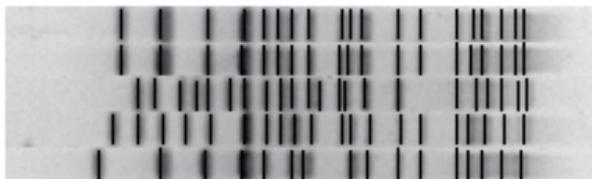
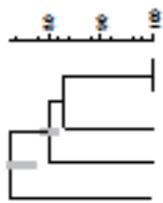
レーン1: 1940.
レーン2: 1945.
レーン3: 1947.
レーン4: 1950.
レーン5: 1951.

M 1 2 3 4 5 M

PFGE 検体写真

PFGE-XbaI

PFGE-XbaI

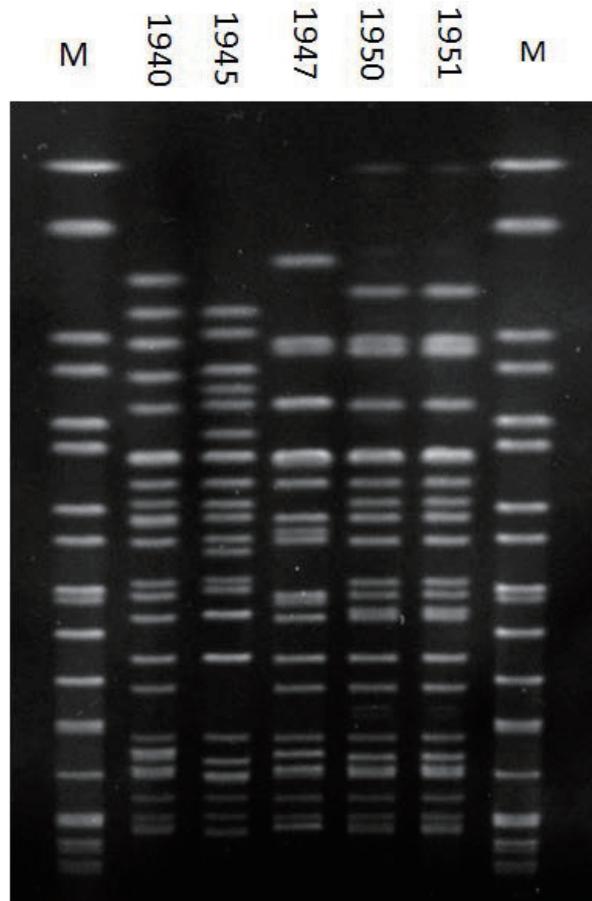


L961.
L969.
L945.
L949.
L947.

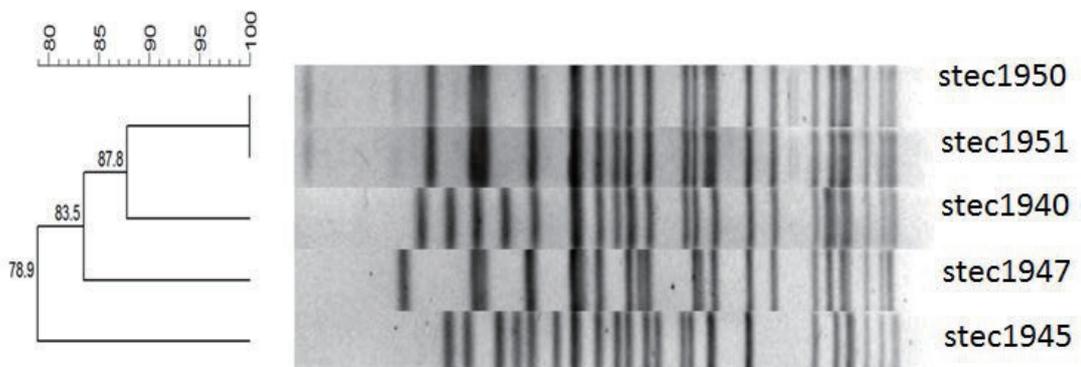
PFGE 検体 dendrogram 解析結果

(F)

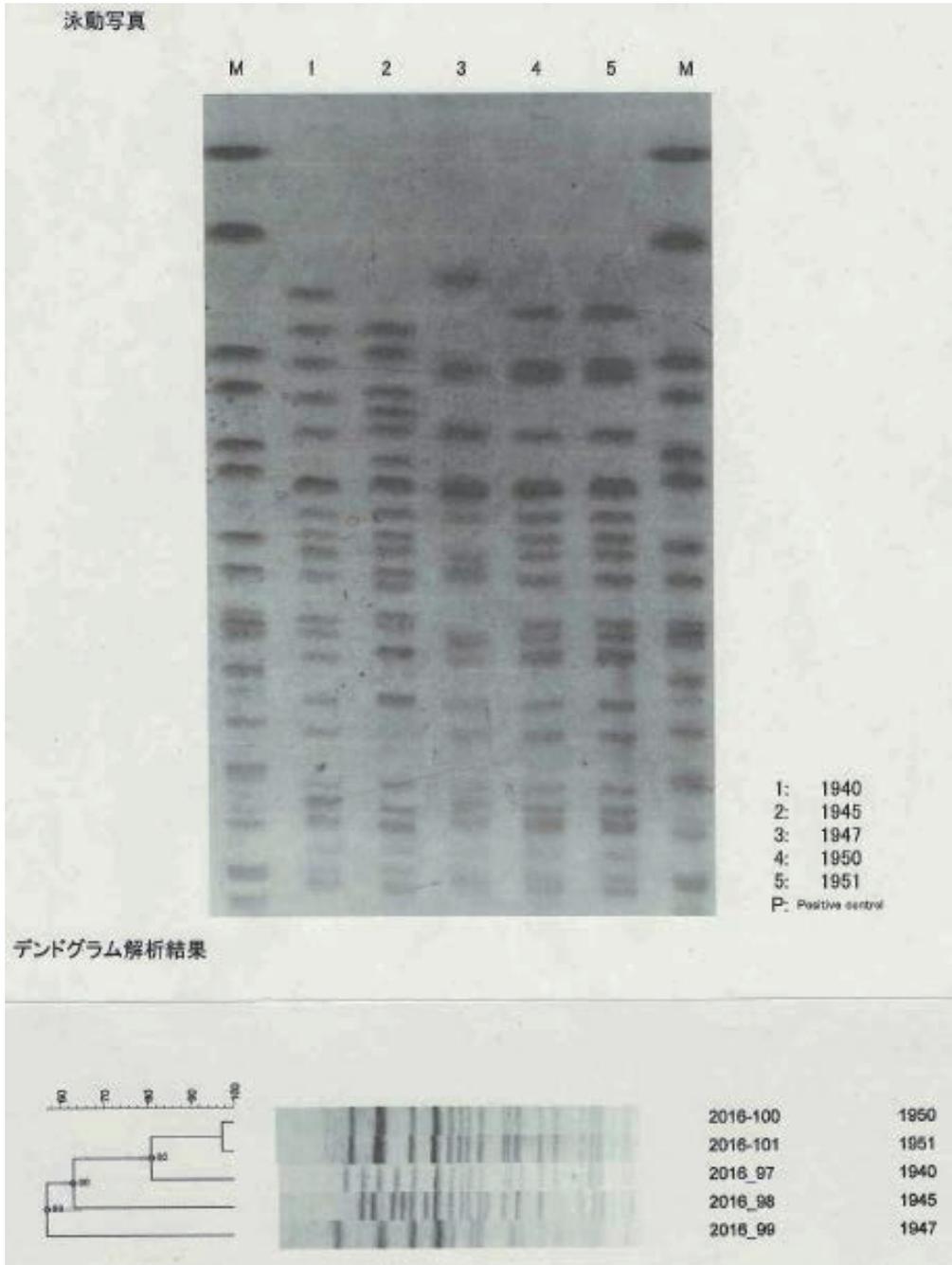
PFGE(Xba1)



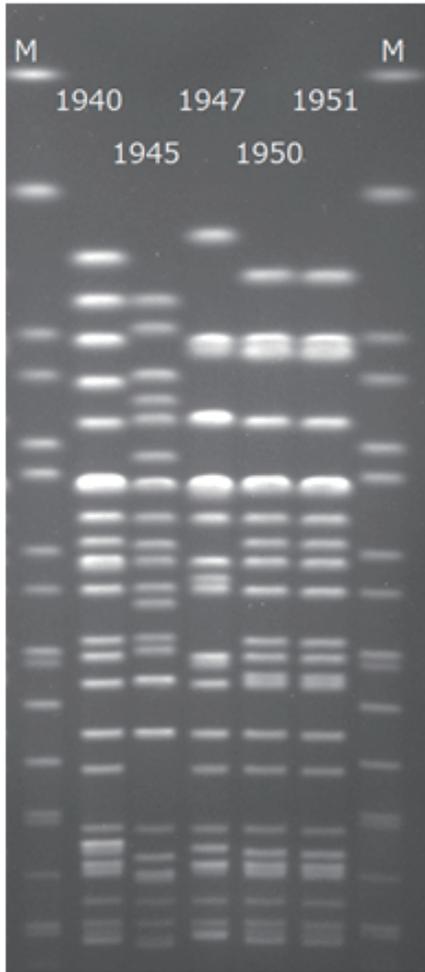
デンドログラム (UPGMA法、係数; Dice)



(G)

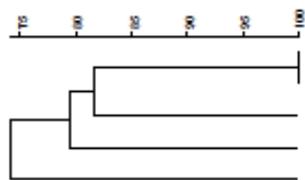


(H)



| | |
|------|-----------------------------------|
| M | : Marker (<i>S. Braenderup</i>) |
| 1940 | : STEC 1940 |
| 1945 | : STEC 1945 |
| 1947 | : STEC 1947 |
| 1950 | : STEC 1950 |
| 1951 | : STEC 1951 |

Dist. [25.1.0% - 10%] [400.0% 530.0%] [2.0% - 100.0%]
EHEC **EHEC**



(I)



M: Marker(S.Vraenderup H9812)

1: No.1940

2: No.1945

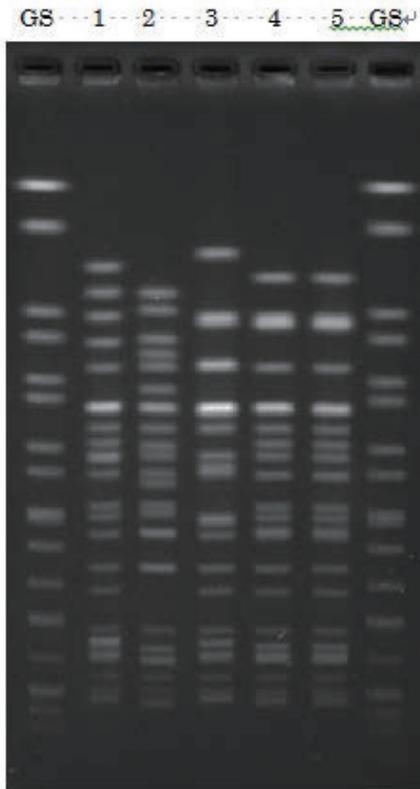
3: No.1947

4: No.1950

5: No.1951

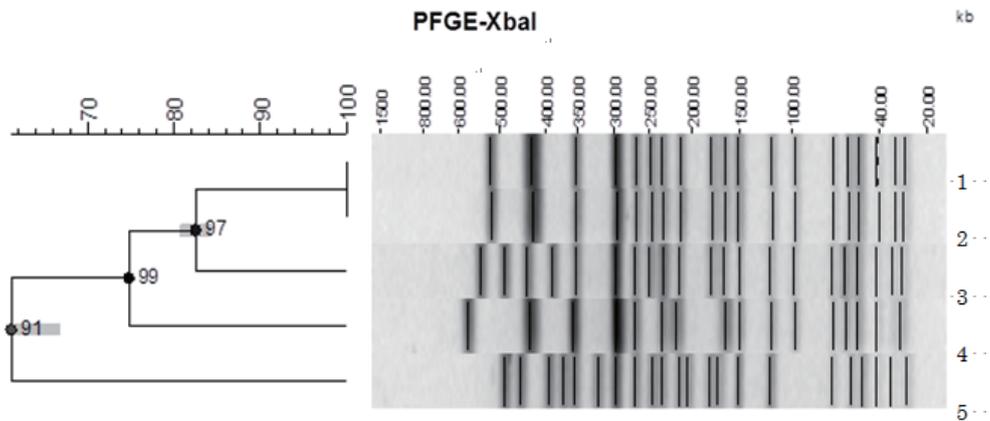


(J)



- 1: STEC 1940 (O157:H7)↵
- 2: STEC 1945 (O157:H7)↵
- 3: STEC 1947 (O157:H7)↵
- 4: STEC 1950 (O157:H7)↵
- 5: STEC 1951 (O157:H7)↵
- GS: Gold Standard↵

PFGE法 (デンドログラム解析結果) ↵



- 1: STEC 1950 (O157:H7)↵
- 2: STEC 1951 (O157:H7)↵
- 3: STEC 1940 (O157:H7)↵
- 4: STEC 1947 (O157:H7)↵
- 5: STEC 1945 (O157:H7)↵

表3 PFGE 法による解析結果

| デンドロビウム結果 | | 施設数 |
|---|--|-----|
| 65~100 (No.1945→1947→1940→1950, 1951) | | 6 |
| 67~100 (No.1947→1940 or 1945→1945 or 1940→1950, 1951) | | 2 |
| 解析せず | | 1 |
| 実施せず | | 1 |

表4 MLVA 法による解析結果

| 施設 | 菌株No | #1 | | | | | | | | |
|-----|------|----------|--------|--------|---------|--------|---------|----------|----------|-----------|
| | | O157-34Y | EHC-1Q | EHC-2C | O157-9M | EHC-5S | O157-3W | O157-25J | EH111-8O | EH157-12N |
| (D) | 1940 | 12 | 5 | 5 | 11 | 2 | 9 | 5 | 1 | 4 |
| | 1945 | 10 | 7 | 4 | 12 | -2 | 7 | 3 | 1 | 7 |
| | 1947 | 12 | 6 | 4 | 8 | -2 | 16 | 5 | 1 | 4 |
| | 1950 | 12 | 6 | 4 | 12 | -2 | 8 | 8 | 1 | 4 |
| | 1951 | 12 | 6 | 4 | 12 | -2 | 8 | 8 | 1 | 4 |
| (E) | 1940 | 10* | | | 11 | | 9 | 5 | | |
| | 1945 | 8* | | | 12 | | 7 | 3 | | |
| | 1947 | 10* | | | 8 | | 16 | 5 | | |
| | 1950 | 10* | | | 12 | | 8 | 8 | | |
| | 1951 | 10* | | | 12 | | 8 | 8 | | |
| (F) | 1940 | 12 | 5 | 5 | 11 | 2&10 | 9 | 5 | -2 | 4 |
| | 1945 | 10 | 7 | 4 | 12 | -2 | 7 | 3 | -2 | 7 |
| | 1947 | 12 | 6 | 4 | 8 | -2 | 16 | 5 | -2 | 4 |
| | 1950 | 12 | 6 | 4 | 12 | -2 | 8 | 8 | -2 | 4 |
| | 1951 | 12 | 6 | 4 | 12 | -2 | 8 | 8 | -2 | 4 |
| (I) | 1940 | 12 | 5 | 5 | 11 | 10 | 9 | 5 | -2 | 4 |
| | 1945 | 10 | 7 | 4 | 12 | -2 | 7 | 3 | -2 | 7 |
| | 1947 | 12 | 6 | 4 | 8 | -2 | 16 | 5 | -2 | 4 |
| | 1950 | -2 | 6 | 4 | 13 | -2 | 8 | 8 | -2 | 4 |
| | 1951 | -2 | 6 | 4 | 12 | -2 | 8 | 8 | -2 | 4 |

*CDC プライマー使用のため、2 つずつ異なっている。

| 施設 | 菌株No | #2 | | | | | | | |
|-----|------|-----------|----------|----------|----------|----------|--------|----------|---------|
| | | EH111-14B | EH111-11 | O157-17Z | O157-36A | O157-19L | EHC-6U | O157-37V | EH26-7D |
| (D) | 1940 | -2 | 2 | 7 | 9 | 6 | 6 | 6 | -2 |
| | 1945 | -2 | 2 | 3 | -2 | 5 | -2 | 8 | -2 |
| | 1947 | -2 | 2 | 7 | 7 | 5 | -2 | 8 | -2 |
| | 1950 | -2 | 2 | 7 | 3 | 6 | -2 | 6 | -2 |
| | 1951 | -2 | 2 | 7 | 3 | 6 | -2 | 6 | -2 |
| (E) | 1940 | | | 7 | 9 | 6 | | 6 | |
| | 1945 | | | 3 | -2 | 5 | | 8 | |
| | 1947 | | | 7 | 7 | 5 | | 8 | |
| | 1950 | | | 7 | 3 | 6 | | 6 | |
| | 1951 | | | 7 | 3 | 6 | | 6 | |
| (F) | 1940 | -2 | 2 | 7 | 9 | 6 | 6 | 6 | -2 |
| | 1945 | -2 | 2 | 3 | -2 | 5 | -2 | 8 | -2 |
| | 1947 | -2 | 2 | 7 | 7 | 5 | -2 | 8 | -2 |
| | 1950 | -2 | 2 | 7 | 3 | 6 | -2 | 6 | -2 |
| | 1951 | -2 | 2 | 7 | 3 | 6 | -2 | 6 | -2 |
| (I) | 1940 | -2 | 2 | 7 | 9 | 6 | 6 | 6 | -2 |
| | 1945 | -2 | 2 | 3 | -2 | 5 | -2 | 8 | -2 |
| | 1947 | -2 | 2 | 7 | 7 | 5 | -2 | 8 | -2 |
| | 1950 | -2 | 2 | 7 | 3 | 6 | -2 | 6 | -2 |
| | 1951 | -2 | 2 | 7 | 3 | 6 | -2 | 6 | -2 |

表5 IS-PS 解析集のエキストラバンド出現位置と IS コード

| 県・事例No | IS-PS | | エキストラバンドの位置 | | |
|--------|--------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|
| | set-1 | set-2 | set-1 | | |
| C ⑦ | 000000100001101111 | 011100000011101010 | 1-01の上 | 1-02と1-03の間 | |
| C ⑥ | 000100001001101101 | 011000101010001110 | 1-01の上 | 1-09と1-10の間 | 1-14と1-15の間 |
| C ⑩ | 010000101001101111 | 010100100010001010 | | | |
| D ④ | 010100101001101111 | 011000101010001110 | 1-14と1-15の間 | | |
| C ② | 010100101001101111 | 110000100011101011 | 1-02と1-03の間 | 1-14と1-15の間 | |
| C ④ | 010100101001101111 | 110100100011101011 | 1-02と1-03の間 | 1-14と1-15の間 | |
| F ① | 010100111101101111 | 100100100001101101 | 1-01の上 | 1-02と1-03の間 | |
| C ① | 100000100000101101 | 110000000011011111 | 1-01の上 | | |
| C ③ | 100100001000101111 | 110000110001001110 | 1-01の上 | | |
| H ① | 100100111101111111 | 011000100111100101 | 1-01の上 | | |
| E ③ | 110000101001101111 | 010100100011001010 | 1-01の上 | | |
| E ④ | 110000101001101111 | 010100100011001010 | 1-01の上 | | |
| D ① | 110001100000101111 | 110100000011101010 | 1-01の上 | 1-12と1-13の間 | |
| C ⑨ | 110100111100111101 | 011100100111101101 | 1-01の上 | | |
| C ⑤ | 111100111101101111 | 011100100011101111 | | | |

IS コードは増幅バンド陽性が「1」、陰性が「0」

| 県・事例No | IS-PS | | エキストラバンドの位置 | 備考 |
|--------|--------------------|--------------------|--------------|-------------------|
| | set-1 | set-2 | set-2 | |
| C ⑦ | 000000100001101111 | 011100000011101010 | | C ⑦とB ①～④は同じ |
| C ⑥ | 000100001001101101 | 011000101010001110 | 2-stx1の下 | |
| C ⑩ | 010000101001101111 | 010100100010001010 | 2-01の上 | |
| D ④ | 010100101001101111 | 011000101010001110 | 2-stx1の下 | |
| C ② | 010100101001101111 | 110000100011101011 | | |
| C ④ | 010100101001101111 | 110100100011101011 | 2-01の上 | C ④, ⑧, ⑩とD ⑤は同じ |
| F ① | 010100111101101111 | 100100100001101101 | | |
| C ① | 100000100000101101 | 110000000011011111 | | |
| C ③ | 100100001000101111 | 110000110001001110 | 2-01の上 | C ③とD ②, ③とF ②は同じ |
| H ① | 100100111101111111 | 011000100111100101 | | H ①～④は同じ |
| E ③ | 110000101001101111 | 010100100011001010 | 2-01の上にバンド2本 | |
| E ④ | 110000101001101111 | 010100100011001010 | 2-01の上 | E ④, ⑤, ⑥, ⑦は同じ |
| D ① | 110001100000101111 | 110100000011101010 | | |
| C ⑨ | 110100111100111101 | 011100100111101101 | | C ⑨とE ①は同じ |
| C ⑤ | 111100111101101111 | 011100100011101111 | 2-01と2-02の間 | C ⑤とE ②は同じ |

表6-1 複数県で発生した EHEC O26 の同一 MLVA 型、MLVA complex 株による事例

| 県名 | 菌株No | 発生日 | O血清群 | H型 | VT型 | MLVA型 | MLVA complex | 備考(疫学的関連など) |
|----|---------|-----|------|----|-----|---------|--------------|-------------|
| B | SE16003 | 4 | 26 | 11 | 1 | 13m2040 | 16c204 | 患者家族 |
| | SE16004 | 4 | 26 | 11 | 1 | 13m2040 | 16c204 | |
| | SE16005 | 4 | 26 | 11 | 1 | 13m2040 | 16c204 | |
| | SE16006 | 4 | 26 | 11 | 1 | 13m2040 | 16c204 | |
| D | EH16-07 | 7 | 26 | 11 | 1 | 13m2040 | 16c204 | |

表6-2 複数県で発生した EHEC O157 の同一 IS コード株による事例

| No | 県名 | 菌株No | 発生日 | O血清群 | H型 | VT型 | ISコード(1st) | ISコード(2nd) | MLVA型 | MLVA complex | 備考(疫学的関連など) | |
|------|---------|---------|-----|------|-----|--------|------------|------------|---------|-----------------------------|--------------------|---------------------------|
| ① | C | 1945 | 8 | 157 | 7 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | 沖縄サトウキビジュース集発関連株 | |
| | | SE16009 | 8 | 157 | 7 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | | |
| | B | SE16010 | 8 | 157 | 7 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | | 沖縄サトウキビジュース集発関連株 (No9の家族) |
| | | SE16011 | 8 | 157 | 7 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | | |
| | | SE16012 | 8 | 157 | 7 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | | |
| D | EH16-12 | 8 | 157 | 7 | 2 | 201457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | 沖縄サトウキビジュース集発関連株 (16-11の家族) | | |
| | EH16-11 | 8 | 157 | 7 | 2 | 201457 | 610652 | 16m0384 | 16c027 | | | |
| ② | D | EH16-08 | 7 | 157 | 7 | 2 | 305457 | 211642 | 14m0056 | 16c021 | | |
| | E | 16027 | 11 | 157 | 7 | 2 | 305457 | 211642 | 15m0278 | 16c059 | | |
| | H | EH16-12 | 7 | 157 | 7 | 2 | 305457 | 211642 | 16m0142 | 16c025 | | |
| | J | 162085 | 6 | 157 | 7 | 2 | 305457 | 211642 | 16m0321 | 16c025 | | |
| ③ | I | 4 | 9 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211756 | 13m0625 | 16c026 | | |
| | C | 1984 | 11 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211756 | 16m0093 | 16c070 | | |
| | | 1975 | 10 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211756 | 16m0094 | 16c026 | | |
| ④ | D | EH16-16 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 15m0434 | 16c036 | 16Y04の家族 | |
| | | 16008 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 15m0434 | 16c036 | | |
| | 16012 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 15m0434 | 16c036 | | | |
| | F | 16Y04 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 15m0434 | 16c036 | | |
| | | 16Y05 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 15m0434 | 16c036 | | |
| | | 16Y07 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 15m0434 | 16c036 | | |
| | C | 1970 | 10 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 16m0389 | | | |
| 1988 | | 10 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 16m0389 | | | | |
| 1978 | | 10 | 157 | 7 | 1.2 | 317577 | 211757 | 16m0389 | | | | |
| ⑤ | C | 1949 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 13m0694 | 16c010 | Gの同一店舗で喫食歴有り。原因不明。 | |
| | | 16Y08 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 15m0099 | 16c010 | | |
| | | 16Y09 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 15m0099 | 16c010 | | |
| | E | 1934 | 4 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0079 | 16c078 | | |
| | | 16011 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0134 | | | |
| | C | 1950 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0228 | 16c010 | | |
| | | 1951 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0228 | 16c010 | | |
| | | 1963 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0228 | 16c010 | | |
| | D | EH16-14 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0228 | 16c010 | | |
| | | EH16-17 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0228 | 16c010 | | |
| | G | 12 | 9 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0261 | | | |
| | C | 1958 | 9 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0317 | 16c010 | | |
| | | 1968 | 9 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0319 | | | |
| D | 1979 | 9 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0419 | 16c078 | | | |
| D | EH16-27 | 9 | 157 | 7 | 1.2 | 717557 | 611657 | 16m0419 | 16c078 | 推定感染地域:C | | |
| ⑥ | C | 1936 | 5 | 157 | 7 | 1.2 | 717577 | 611657 | 16m0080 | | 患者No162086の家族 | |
| | | 162086 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 717577 | 611657 | 16m0089 | 16c055 | | |
| | 162087 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 717577 | 611657 | 16m0089 | 16c055 | | | |
| | 162088 | 7 | 157 | 7 | 1.2 | 717577 | 611657 | 16m0089 | 16c055 | | | |
| | H | EH16-13 | 8 | 157 | 7 | 1.2 | 717577 | 611657 | 16m0132 | | | |
| C | 1966 | 9 | 157 | 7 | 1.2 | 717577 | 611657 | 16m0132 | | | | |
| ⑦ | E | 16004 | 6 | 157 | - | 1 | 317175 | 611755 | 16m0131 | | | |
| | | 1980 | 10 | 157 | - | 1 | 317175 | 611755 | 16m0390 | | | |
| | C | 1987 | 10 | 157 | - | 1 | 317175 | 611755 | 16m0390 | | | |

: IS コード、MLVA 型、MLVA complex が一致

鳥取県における IS-printing System の検討

研究協力者 佐倉 千尋 鳥取県衛生環境研究所

研究要旨

平成28年度に研究班で実施の IS-printing System (以下「IS」という。) 精度管理において陽性コントロールの一部のバンドが不鮮明化もしくは欠損する現象が生じた。Tm 値の低い一部のプライマーにおける PCR 反応性の低下が考えられることにより、マルチプレックス PCR の条件検討 (テンプレートの高濃度化) や不鮮明化および欠損するバンドを検出するためのシングル PCR 等を実施した。マルチプレックス PCR の条件検討では不鮮明化および欠損するバンドは改善されなかったが、シングル PCR との組合せで、IS を分子疫学に関する遺伝子解析手法として用いることは可能と考えられた。

A. 研究目的

IS の精度管理において陽性コントロールの一部のバンドの不鮮明化や欠損が認められ、試験不成立となったことより、当所において IS を行政検査や精度管理に使用する可能性を検証するため、マルチプレックス PCR の条件変更やシングル PCR での検出を試みた。

B. 研究方法

1. 使用菌株

平成28年度中国四国ブロック精度管理事業で提供された O157:H7 菌株 5 株を用いた。

2. 検討条件

(1) IS のマルチプレックス PCR 条件の検討

東洋紡株式会社敦賀バイオ研究所の助言により、相対的なテンプレート量を増やし反応性を上げる目的で、IS のキット (TOYOBO QCIS-001) に記載の反応液の液量を半量である 25 μ L にし、テンプレート量およびその他の条件は変更せずにマルチプレックス PCR を実施した。

サーマルサイクラーは、Bio-Rad 社 S1000 であり、Ramp rate (温度変化率)

の設定が可能であり IS キットの PCR 条件に合わせ 2°C/sec に設定し、試験を実施した。

(2) シングル PCR

陽性コントロールの PCR 産物において不鮮明なバンド (1st set の 561bp(1-06)、137bp(*hlyA*)、2nd set の 449bp(2-09)、301bp(2-13)、240bp(2-15)) に対応するプライマーセットを用い、陽性コントロール及び供試菌株抽出 DNA のシングル PCR を実施した。試薬はプライマーを除き IS キットのものを用い、プライマーの終濃度は 0.5 μ M、アニーリング温度は 50°C で実施した。

(3) 陽性コントロールの追加

不鮮明なバンド ((2)に記載) に対応する各々の陽性コントロール (DNA 濃度約 250ng/ μ l、東洋紡 (株) より提供) を Template mix (DNA 濃度約 2ng/ μ l、IS キットに含む) に 1:110(2nd は 120)、1:2、1:1 の割合で追加し、マルチプレックス PCR を実施した。なお、反応液の液量は 25 μ L とした。

C. 研究結果

1. IS の PCR 条件の検討

反応液の液量を 50 μ L から 25 μ L へ変更したところ、不鮮明化した陽性コントロールのバンドの濃度でいくらかの改善が認められたが、2nd set の 449bp におけるバンドの欠損に変化は認められなかった (図 1-a,1-b)。

2. シングル PCR

1st set の 561bp(1-06)、137bp(*hlyA*)、2nd set の 449bp(2-09)、301bp(2-13)、240bp(2-15)についてシングル PCR を実施したところ、図 2-a,2-b のとおり、すべての陽性コントロール、および供試菌株の一部において結果判定に十分な増幅産物を得ることができた。

3. 陽性コントロールの追加

不鮮明なバンドに対応する各々の陽性コントロールを Template mix 追加したところ、追加割合 1:110(2nd では 120)では改善は認められず、1:2 もしくは 1:1 で改善が認められた (図 3)。

D 考 察

当所で不鮮明化もしくは欠損した陽性コントロールのバンドに対応するプライマー (inside primer を除く。) はいずれも Tm 値が 50°C 以下 (IS inside for 1st,2nd set primer を除く。) と低く、IS キットのマルチプレックス PCR サイクル条件のアニーリング温度である 64°C では十分にテンプレートにアニールできていない可能性が考えられた。上記プライマー以外のキットに含有されるプライマー (IS inside for 1st,2nd set primer を除く。) の平均 Tm 値は 68.6°C であり、Tm 値の違いが PCR の増幅効率に影響を及ぼしていると推察された。

陽性コントロールが不鮮明もしくは欠損

したバンドサイズにおける供試菌株の判定はシングル PCR により可能であり、当所で IS を行政検査における分子疫学解析に使用するには、キットによるマルチプレックス PCR と 5 種のシングル PCR の組み合わせが必要であることが明らかになった。

不明瞭なバンドに対応する各々の陽性コントロールの Template mix (IS キットに含む) への追加は陽性コントロールのマルチプレックス PCR における増幅産物の泳動像を改善させ、IS キットの試験成立条件を満たすことに繋がったが、不鮮明もしくは欠損であったバンドサイズ部分の供試菌株における増幅効率を保証するものではない。したがって陽性コントロールを Template mix に追加したマルチプレックス PCR のみを用いて行政検査や精度管理を実施するにはさらなる検討が必要である。

今後は、マルチプレックス PCR のアニーリング温度を IS キットに記載の条件である 64°C から下げることや、サイクル数を上げることが検討したい。またプライマーの Tm 値を上げる方法として LNA (Locked Nucleic acid) 修飾も検討し改善に繋げたい。

E 結 論

1. 反応液量を 1/2 に減らして実施したものの、IS キットでは 1st set 及び 2nd set の陽性コントロールにおける 18 本のバンドパターンのうち、Tm 値の低いプライマーが対応するバンドが不鮮明化もしくは欠損することがある。

2. IS キットとシングル PCR との組合せにより、Tm 値の低いプライマーに対応するバンドパターンについても判定することが可能である。

3. IS キットに添付の Template mix への

陽性コントロールの追加は、同じバンドサイズにおける供試菌株の増幅効率を保証するものではなく、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

なし

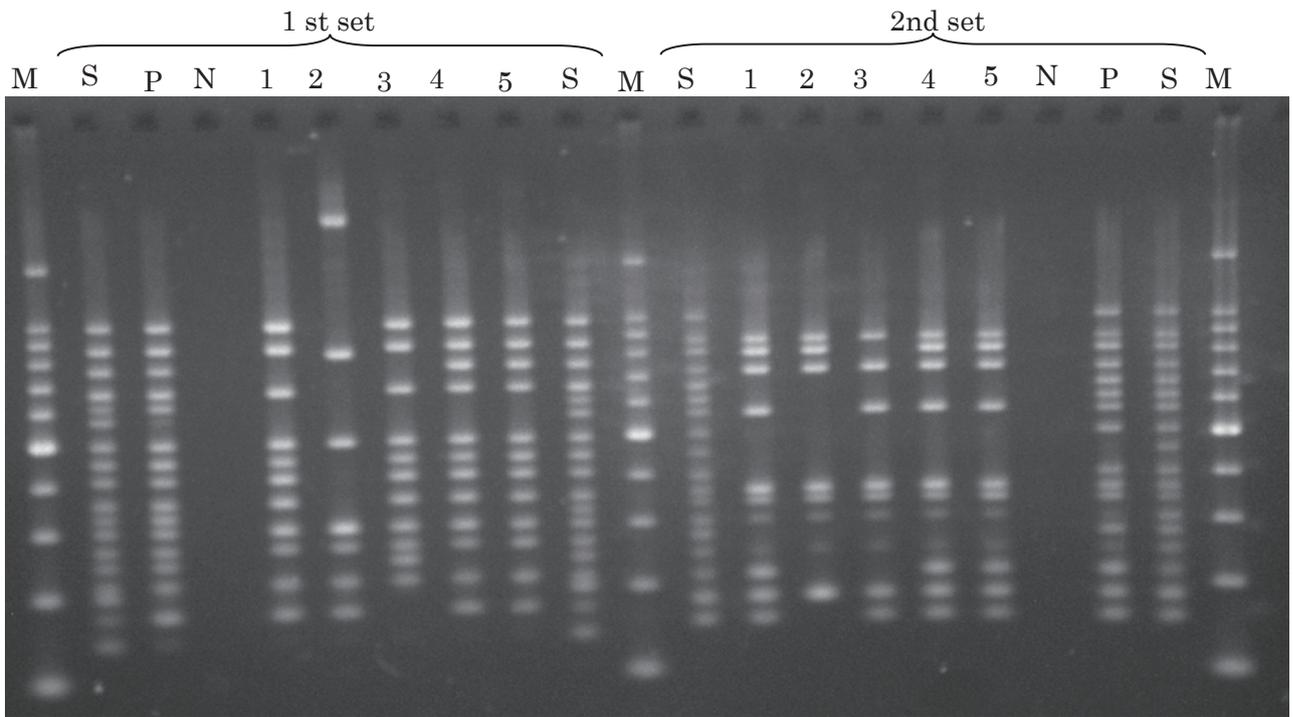


図 1-a 50 μ l 系での IS キットによるマルチプレックス PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

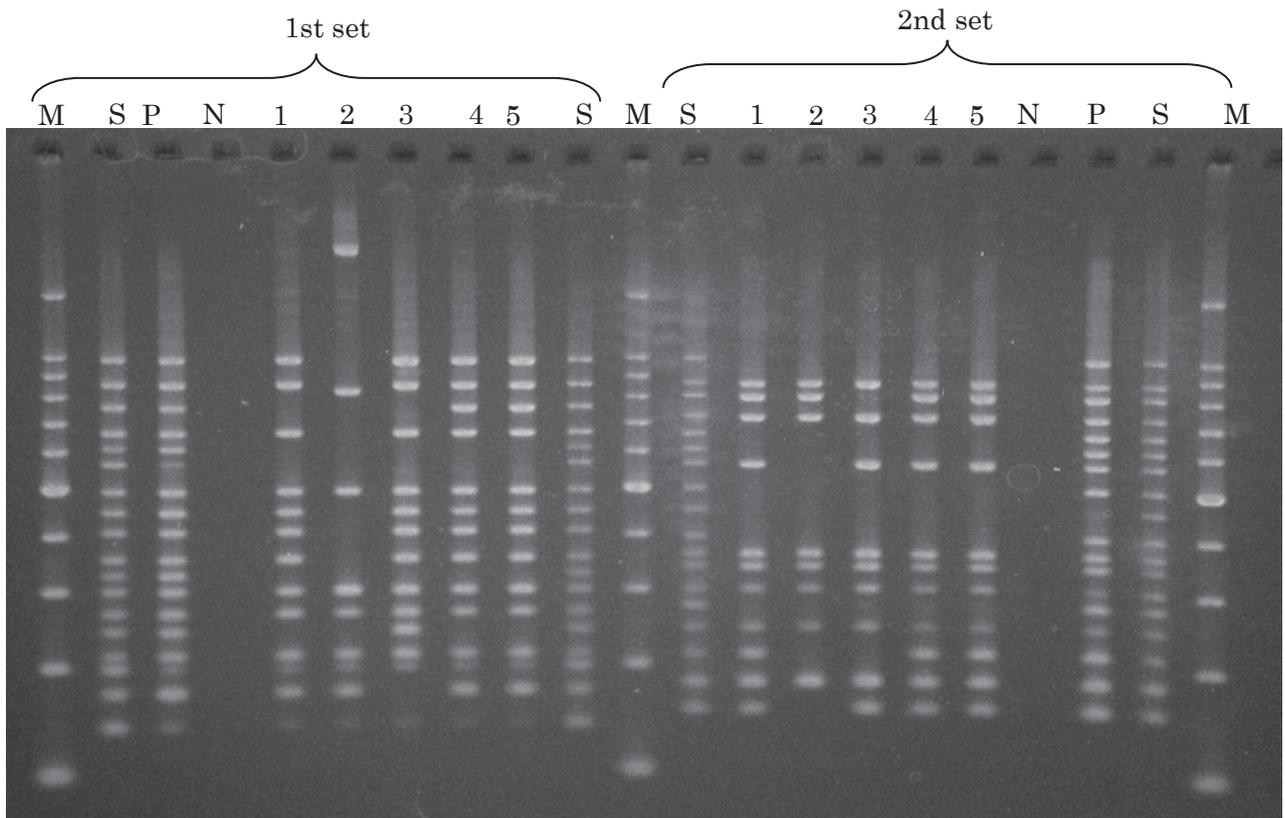


図 1-b 25 μ l 系での IS キットによるマルチプレックス PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

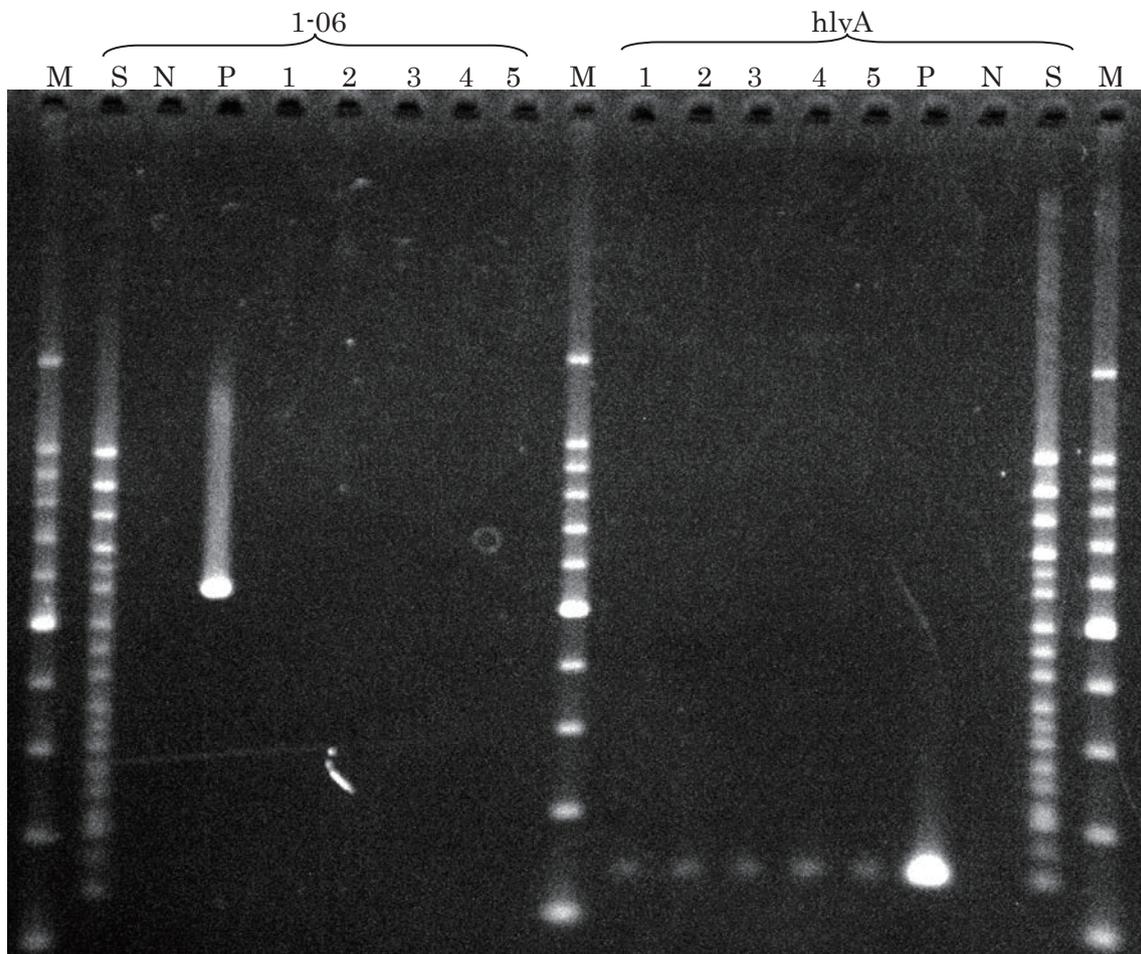


図 2-a 1st set の 561bp(1-06)、137bp(*hlyA*)シングル PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

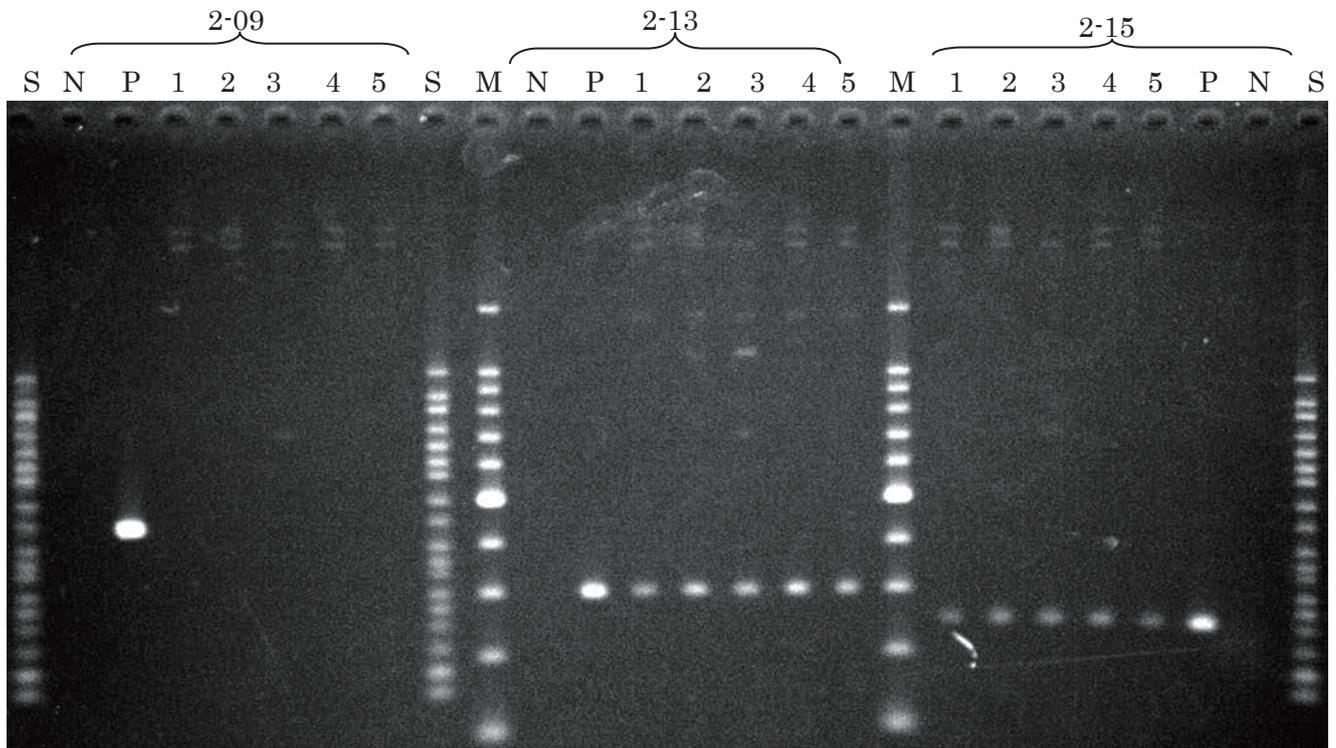


図 2-b 2nd set の 449bp(2-09)、301bp(2-13)、240bp(2-15)シングル PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

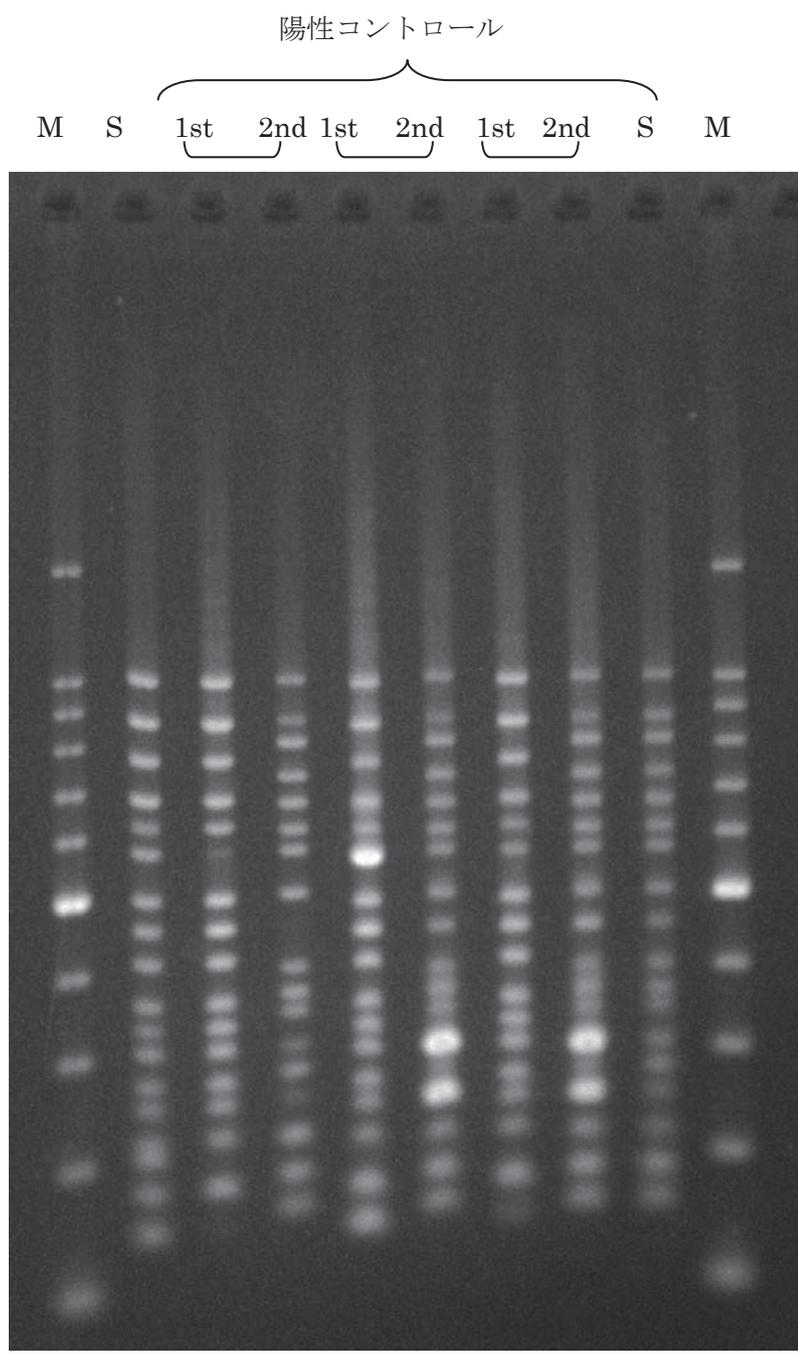


図3 陽性コントロール (DNA 濃度約 250ng/ μ l) を Template mix に追加したマルチプレックス PCR (左から追加の割合 1:110(2nd set は 120)、1:2、1:1 の順)

島根県における IS printing 法による腸管出血性大腸菌 O157 の 分子疫学解析の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所

川上優太 福間藍子

研究要旨

2016年度(平成28年度)に島根県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157(以下 O157)感染症事例 2 件 5 株について IS printing 法(以下 IS 法)を実施し、事例間での疫学的関連性について検討した。

IS 法による解析結果は MLVA 法による結果と一致し、事例内では同一の IS コードが得られた。疫学関連のある菌株について同じ IS パターンを示したことから、IS 法は迅速、簡便に実施できる有用なサブタイピング法であると考えられた。

IS 法の解析結果はデジタルデータであるためデータの比較が容易であり、広域での発生の有無を比較的迅速に探知できるシステムを構築する上でも有用であると思われる。

A. 研究目的

O157 感染症の発生時に IS printing 法を用いた分子疫学解析を行い、解析のツールとして有用であるか検討することを目的とした(表 1)。

B. 研究方法

1. 供試菌株 (表 2)

平成 28 年度中に届出のあった O157 感染症 2 事例 5 株を用いた。

2. 方法

(1)O157 の IS printing 法

IS printing System (東洋紡) の説明書に記載された方法に準じて実施した。

結果は、各プライマーセットごとにスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化 (IS コー

ド) した (表 1)。

(2) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法

国立感染症研究所 (感染研) に菌株を送付し解析を依頼した。

C. 研究結果 (表 2、図 1)

島根県における平成 28 年度の O157 感染症の発生は 7 月 15 日届出から 8 月 17 日届出までの 5 件 (2 事例、事例 A、B) であった。

当所における IS 法による解析では、事例 A と B の IS コードは異なっていた。また、事例 B では事例内で複数の患者等があったが、IS コードは同一であり、疫学情報と一致した。ただし、事例 B では primer set 1-02 と 1-03 の間に明瞭なエキストラバンドが発生しており、注意深く陽性コントロールと比較する必要性が感じられた。

感染研の MLVA 法による解析でも、事

例 A、B の MLVA type は事例ごとに同一の MLVA type が得られ、IS 法の結果と一致した。

D 考察

平成 28 年度の島根県で発生した O157 2 事例の IS 法と MLVA 法の結果が一致しており、IS コード、MLVA type は事例ごとに異なり、事例内では同一であった。

事例 B は平成 28 年 7 月下旬から沖縄県で発生した O157 感染症事例の関連株であったが、IS 法を用いることにより解析結果を関係自治体に迅速に情報提供することができた。一般的に IS 法の型別能力は MLVA 法より低いとされるが、疫学的関連のある菌株は同じ IS コードを示しており、バンドの若干の違いについて相同性の評価ができれば、迅速、簡便に実施できるため、有用なサブタイピング法であると思われる。

IS 法による解析結果はデジタルなデータであり、データのやりとりやデータベース化は比較的容易である。解析結果を

集約し、広域での発生の有無を比較的迅速に探知できるシステムを構築する場合でも IS printing 法は有用であると思われる。

E 結論

1. 疫学的関連のある菌株は、同じ IS コードを示しており、IS printing 法は O157 の分子疫学解析ツールとして有用である。
2. IS printing 法による解析結果は、デジタルなデータのためデータベース化は比較的容易であり、広域での発生の有無を比較的迅速に探知できるシステムを構築する場合にも有用である。

F. 研究発表

なし

表 1 IS printing の増幅バンドサイズ及び判定のコード変換

| 1st set primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|------|-------------|
| primer 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 | <i>eae</i> | 1-16 | <i>hlyA</i> |
| size (bp) | 974 | 839 | 742 | 645 | 595 | 561 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 185 | 171 | 139 |
| 判定例 (菌株No.1) | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 加算 | 7 | | | 1 | | | 7 | | | 5 | | | 5 | | | 5 | | |

| 2nd set primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|
| primer 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 | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> |
| size (bp) | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 |
| 判定例 (菌株No.1) | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 加算 | 2 | | | 1 | | | 1 | | | 6 | | | 5 | | | 7 | | |

表2 供試菌株及び IS printing、MLVA の結果

| 事例 | No. | 届出年月日 | VT | ISコード | | MLVA(感染研) | | 備考 |
|----|-----|------------|-----|---------|---------|-----------|---------|--------|
| | | | | 1st set | 2nd set | type | complex | |
| A | 1 | 2016/07/15 | 1&2 | 717555 | 211657 | 16m0199 | | |
| | 2 | 2016/08/12 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | |
| B | 3 | 2016/08/15 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | No.2~5 |
| | 4 | 2016/08/16 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | は家族 |
| | 5 | 2016/08/17 | 2 | 001457 | 610652 | 16m0110 | 16c027 | |

広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析

研究協力者 広島県立総合技術研究所保健環境センター
秋田 裕子 増田 加奈子 平塚 貴大

研究要旨

2016年に広島県で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 18株について、PFGE法、IS法、MLVA法による解析を行った。その結果、家族事例(4例8株)では、すべて、PFGE法では1バンド以内の相違、IS法では同一のISコード、MLVA法では1遺伝子座以内の相違を示し、分子疫学的にも関連があるという結果が得られた。今回の結果からは、3法は同等の解析能力を有していると考えられた。一方、疫学情報からは関連が認められない菌株間でも、3法いずれにおいても、関連があると解釈される例が複数存在したことから、疫学情報を考慮した結果の解釈が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) の分子疫学的解析法として、近年、迅速性・簡便性に優れた IS-printing System (IS) 法、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の有用性が報告されており、2014年度より、国立感染症研究所における DNA 型別解析は、EHEC O157, O26, O111 に対しては、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法から MLVA 法に変更され、本県でも MLVA 法を導入している。本年は、EHEC O157 による感染症事例が多く発生したため、PFGE 法、IS 法、MLVA 法により解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

広島県内で分離され、2016年に当センターへ搬入された EHEC O157 18株を用いた。各菌株および患者の概要を表 1 に示した。

2. 方法

(1) PFGE 法

国立感染症研究所の方法¹⁾に準拠した。制限酵素は *Xba* I (TaKaRa) を用い、電気泳動は BIO-RAD CHEF MAPPER (BioRad) を用いて 6V/cm、パルスタイム 2.16-63.8 秒、14°C の条件で 18 時間行った。PFGE パターンは、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用い、Dice および UPGMA によりクラスター解析を行った。バンドパターンの相違数が 3 以内を同一クラスターとして分類した。

(2) IS 法

IS-printing System (東洋紡) を用い、取扱説明書に従って実施した。判定は、2 種類のプライマーセット (1st set, 2nd set) ごとに、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」とし、増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに「1」、「2」、「4」の係数を乗じた数値を加算して、1st set, 2nd set の順に並べ、12桁の IS コードとした。

(3) MLVA 法

Izumiya ら²⁾の方法に従い、O157-10を除いた17ヶ所のLocusについて解析した。QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて各検体2セットのPCR反応を実施し、3500 Genetic Analyzer (Applied biosystems) および Gene Mapper Software 5 (Applied biosystems) を用いてフラグメント解析を行った。Fragment size marker は GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0 (Applied biosystems) を使用した。また、代表的なフラグメントについて、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いてシーケンスを行い、各Locusのリピート数を確認した。リピート数の相違が1遺伝子座以内[Single locus variant (SLV)] を同一グループとして分類した。なお、フラグメント解析によりピークが認められない場合は、リピート数を「-2」とした。また、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用い、Minimum Spanning Tree 解析を行った。

C. 研究結果

1. PFGE 法

EHEC O157 18株は、PFGE法により12のパターンに分類された(図1)。家族事例では、PFGEパターンが16-09/-13は1バンド違い(クラスターc)、16-11/-12 (b)、16-18/-19 (c)、16-23/-24 (a)は完全に一致し、それぞれ同一クラスターに分類された。その他、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、16-23/-24と-08、16-18/-19と16-09/-13、さらに-01、-14、-17、-20、-26が3バンド以内の相違で同一クラスターに分類された。

2. IS 法

EHEC O157 18株は、IS法により8パターンのコードを示した(表1)。家族間では、すべて同一のISコードを示した。(16-09/-13、16-11/-12、16-18/-19、16-23/-24)。一方、疫学情報では関連のない菌株間では、16-18/-19と-01、-03、-20、-26、また、16-14、17、27のISコードが一致した。

3. MLVA 法

EHEC O157 18株をMLVA法により解析した結果を、表1および図2に示した。家族事例では、16-09/-13 (complex A)、16-18/-19 (A)、16-23/-24 (D)は、それぞれリピート数が完全に一致、16-11/-12 (B)は1遺伝子座違い(SLV)で同一complexに分類された。また、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、16-09/-13と16-18/-19、さらに-01、-03、-20、-26 (A)、16-14/-17 (C)が1遺伝子座以内の相違で同一complexに分類された。

D. 考 察

2016年に広島県内で分離されたEHEC O157 18株について、PFGE法、IS法およびMLVA法により解析した。

国立感染症研究所の示した分類では、PFGE法においては、バンドの相違数が0の場合は一致、2-3は密接に関係、4-6は関係する可能性がある、7以上は不一致と解釈し³⁾、MLVA法においては、相違する部位数が0の場合は一致、1(SLV)は密接に関係、2(DLV)は関係する可能性がある、3以上は不一致と解釈する。

今回解析した18株は、家族事例が4例8株(16-09/-13、16-11/-12、16-18/-19、

16-23/ -24) 存在したが、これらはすべて、PFGE 法では 1 バンド以内の相違、IS 法では同一の IS コード、MLVA 法では 1 遺伝子座以内の相違を示し、関連があるという結果が得られた。

一方、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、関連があると解釈される株が複数認められた。16-14 と-17 は、PFGE 法では 1 バンド違い、IS 法および MLVA 法で一致し、届出日も近いことから、地域は異なるが、関連を有する可能性があると考えられた。また、16-20 は、16-18/ -19 の家族と PFGE 法、IS 法、MLVA 法のすべてで完全に一致し、届出日、地域も一致していることから、疫学的関連は不明であるが、関連を有する可能性が示唆された。

16-09/ -13 の家族事例と 16-18/ -19 の家族事例は、PFGE 法で同一クラスター (c)、MLVA 法では SLV、IS 法でも 1 バンド違いという結果が得られ、地域は異なるが時期も近いため、関連している可能性もある。次に、16-01、-03、-26 は、MLVA では、これらの家族事例を含む 5 株とともに SLV の同一 complex に分類され、IS コードも一致したが、PFGE 法では、-01 と-26 は同一クラスター、-01 と-03 は 3 バンド違い、-03 と-26 は 6 バンドの相違で関係する可能性があるという結果であった。また、16-08 は、PFGE 法では 16-23/ -24 と 1 バンド違いで同一クラスターに分類されたが、MLVA 法では 3 遺伝子座、IS 法では 1 バンドの相違がみられた。また、16-27 と 16-14/ -17 は IS 法ではコードが一致したが、PFGE 法および MLVA 法では関連は認められなかった。解析法により結果の解釈が異なる場合、これらの関連性を明らかにする

には、詳細な疫学情報が必要であると考えられる。

3 法を比較すると、疫学情報から関連が認められる菌株間では、いずれの方法でも分子疫学的にも関連があると解釈される結果が得られており、同等の解析能力を有していると考えられた。

一方、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、関連があると解釈される例も複数存在した。このような結果が得られた場合、必要に応じて、詳細な疫学調査を行い、分子疫学的解析の結果と併せて解釈を考慮することが重要であると考えられる。また、IS 法と MLVA 法は、PFGE 法に比べ、短時間で結果が得られ、操作も簡便であることから、それぞれ、O157、主要 3 血清群だけでなく、その他の血清群への応用が期待される。

E. 結論

2016 年に広島県内で分離された EHEC O157 18 株について、PFGE 法、IS 法、MLVA 法により解析した。3 法とも、家族事例では、分子疫学的にも関連があるという結果が得られた。一方、いずれの方法でも、疫学情報からは関連が認められない菌株間でも、関連を示唆する結果となった例も存在したことから、結果の解釈には、疫学情報を考慮することが重要であると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 寺嶋淳 他(2004): 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 平成 15 年度総括・分担研究

報告書, 10-21.

2) Izumiya H. et al. (2010): Microbiol Immunol, 54: 569- 577.

3) Tenover FC. et al. (1995): J Clin Microbiol, 33(9): 2233-2239.

表 1 腸管出血性大腸菌 O157 の菌株の概要と MLVA 法および IS-Printing System 法による解析結果

| 菌株番号 | 届出日 | 地域 | 年齢 | 性別 | 血清型 | 毒素型 | 疫学情報 | 各遺伝子座のリポーター数 | | | | | | | | | | | | | | ISコード | | | | | |
|-------|------|----|----|----|---------|-------|----------|--------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|--------------|--------------|-----------------|-----|-----|--------|--------|--------|
| | | | | | | | | O157 -3 | O157 -9 | O157 -25 | O157 -34 | EH157 -12 | EH111 -11 | EH111 -8 | EHC-1 -17 | EHC-2 -19 | EHC-5 -36 | O157 -7 | EH26 -7 | EH111 -14 | EHC-6 -14 | MLVA complex | 1st | 2nd | | | |
| 16-01 | 5/16 | A | 38 | 女 | O157:H7 | VT1,2 | | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2* | 7 | 6 | 3 | 7 | -2 | -2 | -2 | -2 | 317577 | 611657 |
| 16-03 | 5/11 | B | 77 | 男 | O157:H7 | VT1,2 | | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 7 | -2 | -2 | -2 | -2 | 317577 | 611657 |
| 16-09 | 8/3 | C | 6 | 女 | O157:H7 | VT1,2 | | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 7 | -2 | -2 | -2 | -2 | 317575 | 611657 |
| 16-13 | 8/12 | A | 67 | 女 | O157:H7 | VT1,2 | 16-09の家族 | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 7 | -2 | -2 | -2 | -2 | 317575 | 611657 |
| 16-18 | 8/23 | B | 77 | 男 | O157:H7 | VT1,2 | | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 8** | -2 | -2 | -2 | -2 | 317577 | 611657 |
| 16-19 | 8/26 | B | 72 | 女 | O157:H7 | VT1,2 | 16-18の家族 | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 8 | -2 | -2 | -2 | -2 | 317577 | 611657 |
| 16-20 | 8/26 | B | 67 | 女 | O157:H7 | VT1,2 | | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 8 | -2 | -2 | -2 | -2 | 317577 | 611657 |
| 16-26 | 9/20 | A | 22 | 男 | O157:H7 | VT1,2 | | 10 | 13 | 8 | 12 | 4 | 3 | 1 | 5 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 7 | -2 | -2 | 12 | 317577 | 611657 | |
| 16-11 | 8/6 | B | 40 | 男 | O157:H7 | VT2 | | 9 | 12 | 3 | 10 | 7 | 2 | 1 | 7 | 4 | -2 | 3 | 5 | -2 | 8 | -2 | -2 | -2 | 201457 | 610652 | |
| 16-12 | 8/6 | B | 39 | 女 | O157:H7 | VT2 | 16-11の家族 | 7 | 12 | 3 | 10 | 7 | 2 | 1 | 7 | 4 | -2 | 3 | 5 | -2 | 8 | -2 | -2 | -2 | 201457 | 610652 | |
| 16-14 | 8/20 | D | 13 | 男 | O157:H7 | VT1,2 | | 8 | 12 | 8 | 12 | 4 | 2 | 1 | 6 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 6 | -2 | -2 | -2 | 717557 | 611657 | |
| 16-17 | 8/21 | B | 13 | 男 | O157:H7 | VT1,2 | | 8 | 12 | 8 | 12 | 4 | 2 | 1 | 6 | 4 | -2 | 7 | 6 | 3 | 6 | -2 | -2 | -2 | 717557 | 611657 | |
| 16-23 | 9/7 | B | 94 | 女 | O157:H7 | VT2 | | 8 | 12 | 5 | 9 | 6 | 2 | 1 | 9 | 5 | -2 | 4 | 7 | 10 | 6 | -2 | -2 | -2 | 205457 | 211642 | |
| 16-24 | 9/10 | B | 70 | 男 | O157:H7 | VT2 | 16-23の家族 | 8 | 12 | 5 | 9 | 6 | 2 | 1 | 9 | 5 | -2 | 4 | 7 | 10 | 6 | -2 | -2 | -2 | 205457 | 211642 | |
| 16-08 | 7/13 | B | 35 | 女 | O157:H7 | VT2 | | 11 | 12 | 5 | 9 | 6 | 2 | 1 | 11 | 5 | -2 | 4 | 7 | 9 | 6 | -2 | -2 | -2 | 305457 | 211642 | |
| 16-16 | 8/17 | B | 87 | 男 | O157:H7 | VT1,2 | | 8 | -2 | 5 | -2 | -2 | -2 | 1 | 6 | 4 | -2 | 7 | -2 | 6 | 6 | -2 | -2 | -2 | 317577 | 211757 | |
| 16-21 | 8/23 | B | 34 | 女 | O157:H7 | VT2 | | 9 | 11 | 5 | 9 | 4 | 2 | 1 | 5 | 5 | 2 | 3 | 6 | 5 | 12 | -2 | -2 | -2 | 215457 | 605247 | |
| 16-27 | 9/28 | B | 78 | 女 | O157:H7 | VT1,2 | | 10 | 14 | 8 | 12 | 4 | 2 | 1 | 5 | 5 | -2 | 7 | 6 | 3 | 5 | -2 | -2 | -2 | 717557 | 611657 | |

*.2: 増幅なし

**太字: Single locus variant

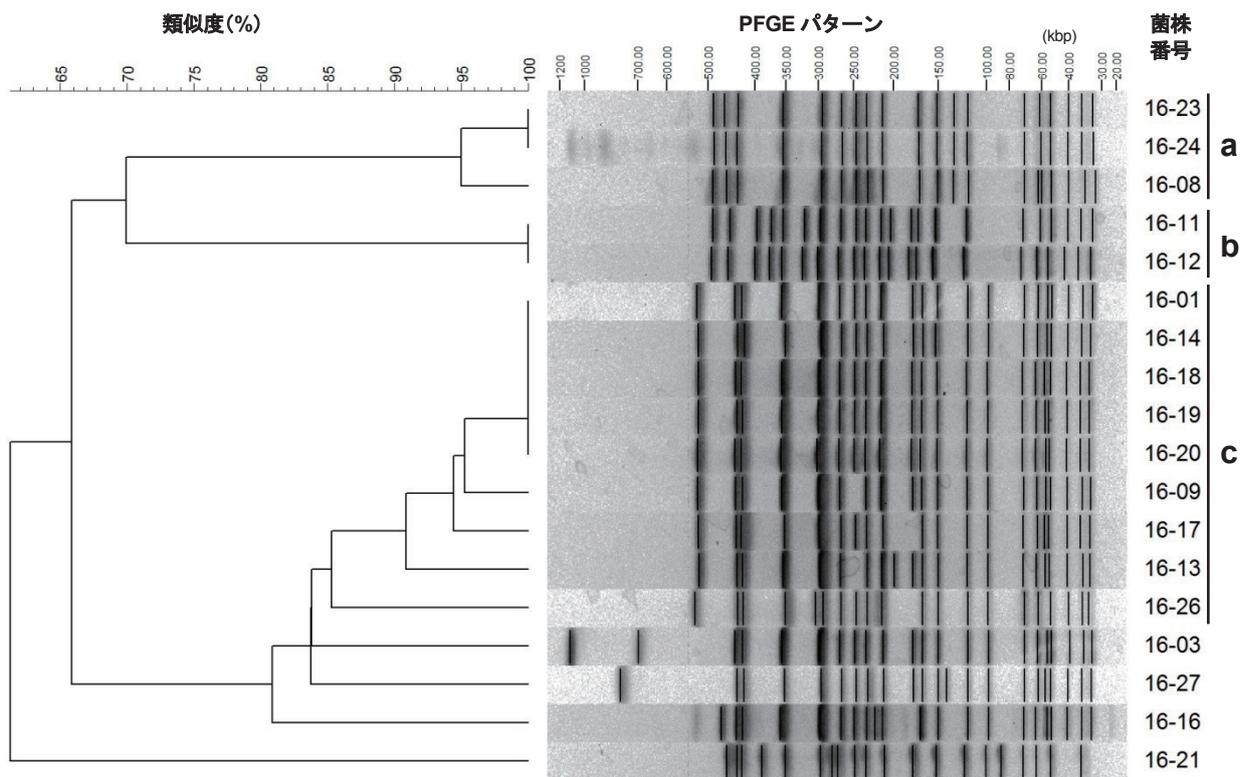


図1 腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE 法による解析結果

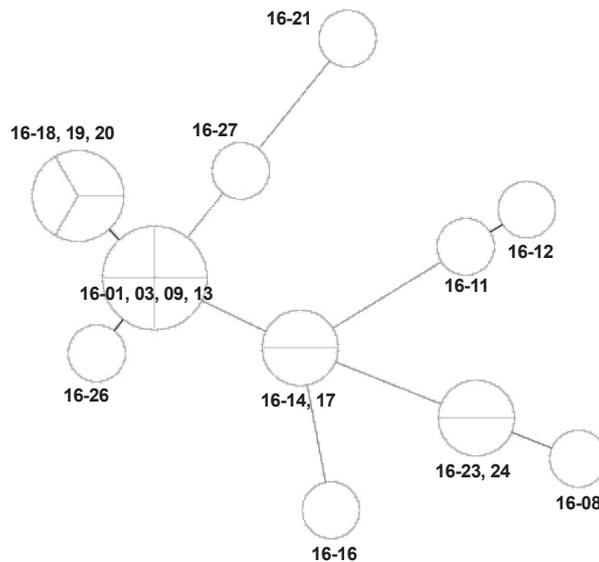


図2 腸管出血性大腸菌 O157 の MLVA Minimum Spanning Tree

2016年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株の分子疫学的解析

研究協力者 広島市衛生研究所

千神 彩香 青田 達明 栗林 智早 坂本 綾 松室 信宏 石村 勝之

研究要旨

2016年に広島市で発生した散発7事例及び広域食中毒1事例の患者便及び食品から分離された腸管出血性大腸菌 O157 12株について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法、IS-printing system® (IS)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(9 座位)(MLVA)法で解析した。疫学調査で関連が不明であった散発事例由来7株のうち4株は3法とも明確に区別されたが、残りの3事例由来3株中2株は3法で一致し区別されなかった。残り1株は PFGE 法で高い類似度を示し、IS 法でも1か所のコードの違いであったが、MLVA 法では5座位が異なった。一方、広域食中毒事例の患者由来1株と食品由来4株の解析では、PFGE 法及び IS 法では一致した結果であったが、MLVA 法では食品由来の1株に1座位のみに1リピート異なる SLV を認めた。

今回の解析結果からは、迅速性、簡便性に優れる IS 法であるが、解析能力がやや低いことが認められ、特に疫学調査で関連性が不明な事例間の異同の解釈は、MLVA 法の解析結果を加えて総合的に判断することの必要性が認められた。

A. 研究目的

分子疫学的解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法、IS-printing system®(IS)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)法の3法を用いて、2016年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株を解析し、感染事例間での疫学的関連性を検討するとともに3法間の型別能について検証した。

B. 研究方法

1. 材料

2016年に広島市内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 12株を用いた。内訳は、散発事例患者由来6株、散発事例無症状病原体保有者由来1株、広域食中毒事例患者由来1株、広域食中毒事例食品由来4株である。事例と株の関係は表1に示した。

2. 方法

(1) PFGE 法

制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I を用いて、国立感染症研究所(感染研)で示された方法に準拠し実施した。なお、電気泳動はスミアバンド発生を防止するためチオ尿素を加えた 0.5 × TBE で行った。系統樹は、Fingerprinting II (Bio-Rad)を用いて解析を行い、Dice 法(最適化:0.0%、トレランス:1.0%)による相似係数を算出し、平均距離法(UPGMA)により作成した。

(2) IS 法

IS-printing system®(東洋紡)を使用し、添付のプロトコールに従い実施した。結果は、プライマーごとに増幅ありを「1」、なしを「0」と判定し、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に3バンドごとに割り当てた「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、1st set、2nd set の順に並べて12桁で表わして IS コードとした。

(3) MLVA 法

MLVA 解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) 及び Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用い、Hyytia-Trees⁴⁾らの 9 カ所の VNTR 領域について解析を行った。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Ver. 2.0 (Applied Biosystems 社) を使用した。プライマーと蛍光標識については表 2 のように設定したものをを用いた。

C. 研究結果

1. 2016 年分離菌株の解析結果

2016 年に分離された菌株 12 株の MLVA リピート数 (MLVA RN)、IS コード及び PFGE バンドパターンの一致の有無を表 3 に、類似度 95% 以上を示したものを同一 PFGE クラスタ (点線内) とし、制限酵素 *Xba* I で処理したものを図 1 に、*Bln* I で処理したものを図 2 に示した。

(1) 散発事例

事例 3(16008) 及び事例 5(16012) において、MLVA RN、IS コード及び PFGE バンドパターンが全て一致した。事例 2(16007) は事例 3 及び事例 5 と IS コードが類似し、PFGE でも類似度 97% の同一クラスタを示したが、MLVA 法では 5 座位が異なった。他の事例は 3 法とも互いに異なった。

(2) 広域食中毒事例

事例 8 の患者由来菌株 (16027)、食品由来菌株 (16028、16029、16030 及び 16031) において、IS コード及び PFGE バンドパターンは一致した。MLVA では、5 株とも 8 領域で一致したが、食品由来株 (16028) が 1 座位 (K10) で他の 4 株と RN が 1 違った (single Locus Variant, 以下 SLV)。

2. 3 法間の型別能の比較^{1),2),3)}

(1) PFGE 法

Xba I 処理では、散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) でバンドパターンが 100% 一致した。事例 2(16007) はこの事例 3 及び事例 5 と類似度 97% の同一クラスタに区別された。広域食中毒事例 8 の 5 株は 100% 一致した。

Bln I 処理でも散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) はバンドパターンが 100% 一致し、事例 2(16007) の類似度が 97% と高かった。なお、事例 7(16020) は *Bln* I では切断されなかった。広域食中毒事例 8 の 5 株は 100% 一致した。

(2) IS 法

散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) は IS コードが一致した。これらと PFGE 法で類似度の高かった事例 2(16007) は、IS 法では 12 桁中 1 か所のコードが異なった。

広域食中毒事例 8 由来の 5 株は同一コードを示した。

(3) MLVA 法

散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) では MLVA RN が 9 座位全て一致した。これらと前述の 2 法で類似度の高い事例 2(16007) は、MLVA RN が K3、K34、K19、K36 及び K10 の 5 領域で異なっていた (Multi Locus Variant)。

広域食中毒事例 8 の 5 株は、9 領域中 8 領域で一致したが、食品由来 16028 の RN が K10 の RN で 1 リピート異なった。

D. 考 察

今回、2016 年の散発事例及び全国的な広域食中毒事例の一つとして広島市で発生した患者及び原因施設で保管されていた食品 (そうざい半製品) から分離された腸管出血性大腸菌 O157 菌株について分子疫学的解析を行った。

散発事例由来株においては、事例 3 の

16008 株及び事例 5 の 16012 株において、PFGE 法、IS 法及び MLVA 法の 3 法全てで一致した。この解析結果からは、この菌株同士が遺伝子学的に同じか近縁である可能性が高いことが考えられる。一方で、疫学的に関連性のない事例間で偶然パターンの一致した株が検出された可能性も考えられるが、今回の事例の疫学調査からは事例間の関連性は認められなかった。

広域食中毒事例 8 の分離株 5 株においては、PFGE 法及び IS 法の 2 法ではパターンが完全に一致したが、MLVA では食品由来 1 株(16028)の 1 座位(K10)で RN が 1 違う SLV であった。感染研が作成した 14 座位における MLVA 解析結果の基準では、SLV は「ほぼ確実に集団発生の一部である」と解釈できるとされている。当所が検討実施している MLVA 法は、現在のところ 9 座位のみの解析方法であるため、感染研での 14 座位における解析能との同等性は保証されないが、今回の解析において、これら 5 株は疫学情報から考慮しても全て同一食中毒事例の患者及び食品から分離された菌株であり、1 株のみが MLVA RN の一部違う SLV であることから、5 株とも関連性が高いことが推察される。

3 法のうち、IS 法の識別能力は比較的低いと言われており、当所の今回を含めたこれまでの検討結果からも言えるが、特に関連性の不明な散発事例株での使用と結果の解釈には他の 2 手法との総合的な判断が必要である。MLVA 法は今回の適応例からも有用性が認められたことから、MLVA も合わせて実施することで異なる遺伝子型であることを再確認できる場合があると考えられた。以上より、疫学情報を照らし合わせながら使用する手法を総合的に選択することが重要である。

E 結論

1. 散発事例 3 の 16008 及び事例 5 の 16012 において、3 法全てにおいて一致した。このような事例については疫学調査手法の検討が必要である。

2. 広域食中毒事例株においては PFGE 法及び IS 法の 2 法でパターンが一致したが、MLVA 法では 1 領域で RN が 1 違う株(SLV)がみられた。5 株は一部変異が認められるが関連性の高いことが推察された。

3. 関連性の低い散発事例の株間では、PFGE 法及び IS 法において高い類似度を示しても、MLVA 法では SLV 以上の異なるパターンを示す場合もあるため、疫学情報も照らし合わせながら総合的に手法を判断することが重要である。

F. 研究発表

なし。

G. 参考文献

- 1) 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成 21 年度 総括・分担研究報告書
- 2) 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成 22 年度 総括・分担研究報告書
- 3) 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成 23 年度総括・平成 21～23 年度総合研究報告書
- 4) Hyytia Trees E.,Smole S.C.,Fields P.A.,et al.(2006):Second generation subtyping:a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157(STEC O157). Foodborne Pathog. Dis.3:118-131

表1 2016年腸管出血性大腸菌 O157 型分離菌株の事例概要

| 事例番号 | 事例区分 | 菌株番号 | 診断の種類 | 発症年月日 | 血清型 | VT 型 |
|------|------|-------|-----------|--------------|----------|--------|
| 1 | 散発 | 16004 | 無症状病原体保有者 | 20160621*1 | O157:HNM | VT1 |
| 2 | 散発 | 16007 | 患者 | 20160709 | O157:H7 | VT1VT2 |
| 3 | 散発 | 16008 | 患者 | 201607(日は不明) | O157:H7 | VT1VT2 |
| 4 | 散発 | 16011 | 患者 | 20160718 | O157:H7 | VT1VT2 |
| 5 | 散発 | 16012 | 患者 | 20160730 | O157:H7 | VT1VT2 |
| 6 | 散発 | 16019 | 患者 | 20161002 | O157:H7 | VT1VT2 |
| 7 | 散発 | 16020 | 患者 | 20161008 | O157:H7 | VT2 |
| 8 | 食中毒 | 16027 | 患者 | 20161027 | O157:H7 | VT2 |
| | | 16028 | 食品*2 | | O157:H7 | VT2 |
| | | 16029 | 食品*2 | | O157:H7 | VT2 |
| | | 16030 | 食品*2 | | O157:H7 | VT2 |
| | | 16031 | 食品*2 | | O157:H7 | VT2 |

*1：無症状病原体保有者のため、発症年月日ではなく届出報告年月日を記載

*2：原因施設で保管されていた食品(そうざい半製品)

表2 使用した MLVA primer と Dye set

| PCR | locus | | Dye | primer (5'-3') |
|-------|---------|---------|---|--|
| Mix 1 | K-3 | Forward | VIC | GG CGG TAA GGA CAA CGG GGT GTT TGA ATT G |
| | | Reverse | | GAA CAA CCT AAA ACC CGC CTC GCC ATC G |
| | K-9 | Forward | NED | GC GCT GGT TTA GCC ATC GCC TTC TTC C |
| | | Reverse | | GTG TCA GGT GAG CTA CAG CCC GCT TAC GCT C |
| K-25 | Forward | PET | GC CGG AGG AGG GTG ATG AGC GGT TAT ATT TAG TG | |
| | Reverse | | GCG CTG AAA AGA CAT TCT CTG TTT GGT TTA CAC GAC | |
| K-34 | Forward | VIC | GA CAA GGT TCT GGC GTG TTA CCA ACG G | |
| | Reverse | | GTT ACA ACT CAC CTG CGA ATT TTT TAA GTC CC | |
| Mix 2 | K-17 | Forward | FAM | GC AGT TGC TCG GTT TTA ACA TTG CAG TGA TGA |
| | | Reverse | | GGA AAT GGT TTA CAT GAG TTT GAC GAT GGC GAT C |
| | K-19 | Forward | PET | GC AGT GAT CAT TAT TAG CAC CGC TTT CTG GAT GTT C |
| | | Reverse | | GGG GCA GGG AAT AAG GCC ACC TGT TAA GC |
| | K-36 | Forward | VIC | GG CGT CCT TCA TCG GCC TGT CCG TTA AAC |
| | | Reverse | | GCC GCT GAA AGC CCA CAC CAT GC |
| K-37 | Forward | NED | GC CGC CCC TTA CAT TAC GCG GAC ATT C | |
| | Reverse | | GCA GGA GAA CAA CAA AAC AGA CAG TAA TCA GAG CAG C | |
| Mix3 | K-10 | Forward | FAM | CAGCCTCCTGCAAACCTTTACTGTTCATTTCTACAGTCTC |
| | | Reverse | | GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCATTTTC |

表3 2016年分離菌株のMLVA RN、ISコード及びPFGEバンドパターン一致の有無

| 菌株番号 | 事例番号 | 血清型 | VT型 | MLVA RN | | | | | | | | | ISコード | PFGEバンドパターン一致の有無 |
|-------|------|----------|--------|---------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|------------------|
| | | | | K25 | K3 | K34 | K9 | K17 | K19 | K36 | K37 | K10 | | |
| 16004 | 1 | O157:HNM | VT1 | 5 | 10 | 11 | 11 | 7 | 6 | 6 | 6 | 38 | 317175 611755 | 無 |
| 16007 | 2 | O157:H7 | VT1VT2 | 5 | 13 | 8 | 10 | 7 | 4 | 7 | 6 | 35 | 317577 611757 | 無 |
| 16008 | 3 | O157:H7 | VT1VT2 | 5 | 8 | 10 | 10 | 7 | 6 | 6 | 6 | 46 | 317577 211757 | 16012と一致 |
| 16011 | 4 | O157:H7 | VT1VT2 | 4 | 12 | 10 | 9 | 7 | 6 | 10 | 6 | 15 | 717557 611657 | 無 |
| 16012 | 5 | O157:H7 | VT1VT2 | 5 | 8 | 10 | 10 | 7 | 6 | 6 | 6 | 46 | 317577 211757 | 16008と一致 |
| 16019 | 6 | O157:H7 | VT1VT2 | 4 | 10 | 9 | 8 | 8 | 6 | 8 | 5 | 18 | 106555 211457 | 無 |
| 16020 | 7 | O157:H7 | VT2 | 3 | 4 | 7 | -* | 5 | 7 | 6 | 5 | -* | 012057 214442 | 無 |
| 16027 | 8 | O157:H7 | VT2 | 5 | 8 | 7 | 12 | 4 | 7 | 10 | 6 | 18 | 305457 211642 | 16027、16028、 |
| 16028 | | O157:H7 | VT2 | 5 | 8 | 7 | 12 | 4 | 7 | 10 | 6 | 19 | 305457 211642 | |
| 16029 | | O157:H7 | VT2 | 5 | 8 | 7 | 12 | 4 | 7 | 10 | 6 | 18 | 305457 211642 | 16029、16030、 |
| 16030 | | O157:H7 | VT2 | 5 | 8 | 7 | 12 | 4 | 7 | 10 | 6 | 18 | 305457 211642 | 16031は一致 |
| 16031 | | O157:H7 | VT2 | 5 | 8 | 7 | 12 | 4 | 7 | 10 | 6 | 18 | 305457 211642 | |

*：“-”はPCR産物なし

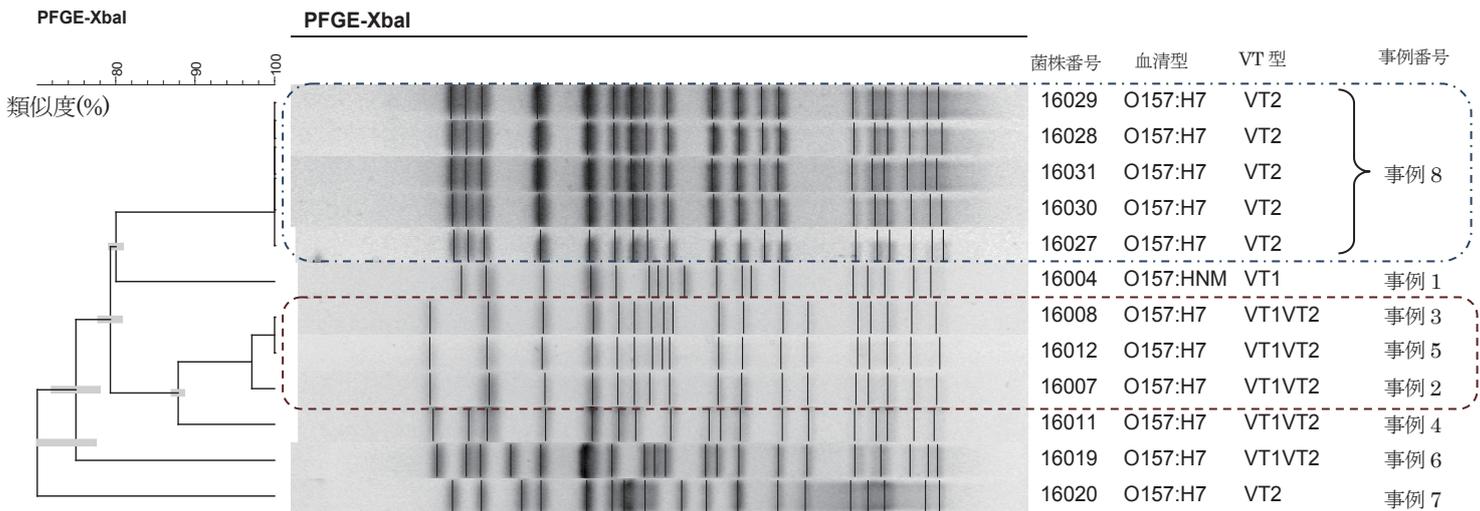
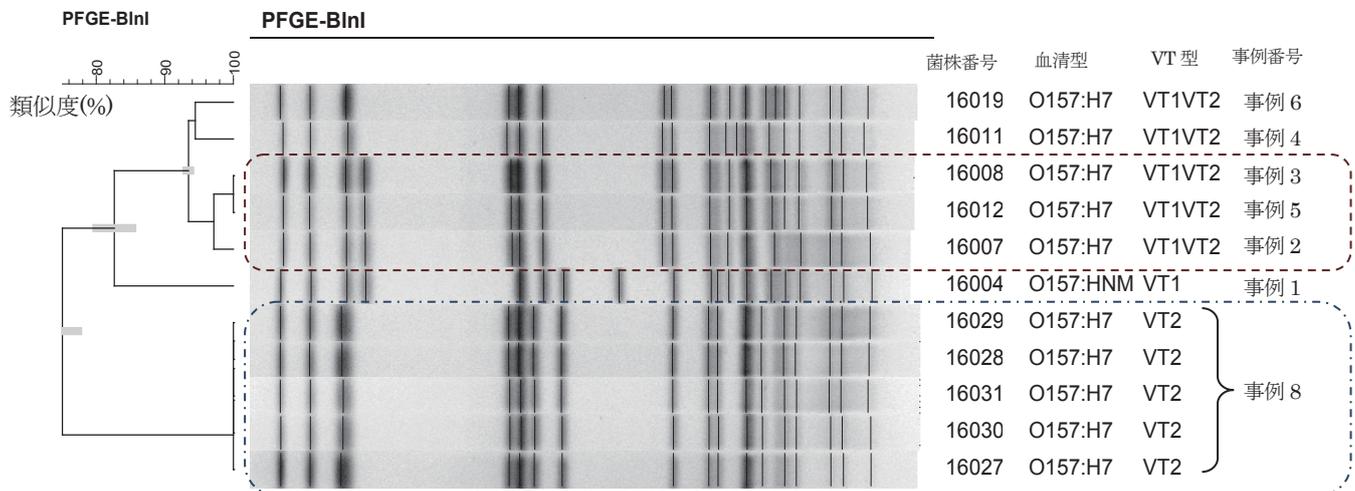


図1 2016年分離菌株のXbaI処理によるPFGEクラスター



※16020はBln Iで切断されなかった。

図2 2016年分離菌株のBlnI処理によるPFGEクラスター

2016年に山口県内で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染症の分子疫学的解析

研究協力者 山口県環境保健センター

尾羽根紀子 亀山光博 大塚 仁 野村泰晴

研究要旨

2016年に山口県で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染症は 18 例であった。

これら 18 株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と、昨年より導入した Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)法で解析を行った。

発生状況は、集団事例が 2 件、散発事例が 4 件であった。

2 法による解析の結果、6 事例中 4 事例由来の菌株は同一、あるいは極めて類似しており、さらにもう 1 事例とも由来が近似していた。

また、MLVA 法のリピート数を昨年の菌株と比較すると、同じリピート数の菌株による感染症が発生していたことを探知し、PFGE 法の解析の結果バンドパターンも一致した。

よって、2016年に山口県内で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染症は、昨年より続く近縁株による diffuse outbreak の可能性がうかがえた。

MLVA 法は PFGE 法に比べ簡便性、迅速性に優れ、異なる施設間のデータ比較が可能なため導入が進んでいる。

これらの結果から、広域散発的に発生した事例の探知が可能であると考えられた。

A. 研究目的

山口県では、腸管出血性大腸菌 (EHEC)の分子疫学的解析法としてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と、国立感染症研究所が 2014 年より腸管出血性大腸菌 O157 O26 O111 の DNA 型別解析として行っている、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)法を昨年より導入し、2 種類の方法で分離菌株の遺伝的関連を明らかにしている。

2016 年 1 月～12 月までに山口県内で 36 例の腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症が発生した。そのうち、O26 感染症は 18 例で全て O26:H11 VT1 であった。(以下 O26)。

これら分離株の遺伝的関連を明らかにするため、2 法による解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2016 年 6 月～9 月に山口県内で発生した O26 感染症例由来 18 株を供試した。

2. 解析方法

(1) DNA 抽出

O26 菌株をトリプトソイ寒天培地(日水製薬)上で純培養後、QIAamp DNA blood mini kit(QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。

(2) PFGE 法

厚生労働科学研究補助金 新興・再興感染症研究事業「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」平成 17 年度総括・総合研究報告書(主任研究者 寺島淳)に記載されている九州ブロックマニュアル¹⁾に従って実施した。制限酵素は *Xba* I (Roche)を用い、

泳動装置 CHEF-Mapper(Bio-Rad)を使用した。

得られた PFGE パターンは

BioNumerics ver.7.1(Applied Maths)により解析し、UPGMA 法によりデンドログラムを作成した。バンドの相違が3バンド以内を、同一クラスターとした。

(3) MLVA 法

Izumiya らの方法²⁾に従い実施した。18 領域のうち、locusO157-10 を除く領域について解析した。QIAGEN multiplex PCR kit plus(QIAGEN)を使用した PCR 反応後、3500 genetic analyzer (Applied Biosystems)及び Gene Mapper software ver.4.1 を使用してフラグメント解析を行った。size maker は、Genescan 600LIZ size standard (Applied Biosystems)を用いた。

なお、フラグメント解析により、増幅産物が認められなかった場合は「-2」と表記した。また、リピート数の相違が1遺伝子座[Single locus variant(SLV)]の場合を、同一コンプレックスとした。

(4) MLVA リピート数による 2015 年分離株との比較

2016 年の O26 菌株と、2015 年に分離された O26 菌株(3 事例由来 8 株)の MLVA のリピート数を比較した。MLVA タイプが一致、あるいは類似した株について PFGE 法による解析を実施した。

C. 研究結果

1. 事例概要

2016 年の山口県内の O26 感染症の概要を表 1 に示す。

集団事例は 2 件(G-1、G-2)、散発事例

は 4 件(S-1~S-4)であった。

発生は夏季に集中していた。

2. PFGE 解析結果

図 1 に示すとおり 6 パターンに型別された。

集団事例 G-1 の 2 株の PFGE パターンは一致(B)した。G-2 の 12 株の内 11 株の PFGE パターンは一致し、残る 1 株は 2 バンド異なっていた。

散発事例 S-1 は、G-2 の主パターンと一致し、S-2 はそれらと 2 バンド、S-4 は 3 バンド異なり、4 事例(G-2、S-1、S-2、及び S-4)由来 15 株は同一クラスター(A)に含まれた。

G-1 は G-2 等と 4 バンド異なっていた。

S-3 は、他の株と 7 バンド以上異なる PFGE パターンであった。

3. MLVA 解析結果

表 2 に示すとおり、7 つに型別された。

集団事例 G-1 の 2 株のリピート数は一致

した。G-2 は 3 タイプに型別され、12 株の内 10 株は同一タイプを示し、残る 2 株は locusO157-9、locusEHC-6 のリピート数がそれぞれ異なる SLV であった。

散発事例 S-1 と S-2 のリピート数は一致

した。S-1・S-2 は G-2 の主タイプと locusEHC-2 のリピート数が異なる SLV で、さらに散発事例 S-4 とは、locusEHC-1 のリピート数が異なる SLV であった。この 4 事例 (G-2、S-1、S-2、及び S-4) 由来 15 株は同一コンプレックス(a)を形成した。

集団事例 G-1 は S-1・S-2、S-4、及び G-2 の内 1 株とリピート数が 2 ヶ所異なっていた。

S-3は他の株とリピート数が3か所以上異なっていた。

4. MLVA リピート数による 2015 年分離株との比較

2015年11月に発症した家族内感染1事例由来3株がG-2の主タイプと一致した。

PFGEパターンも図2のように、完全に一致した。

D. 考察

2016年に山口県内で分離されたO26感染症は6事例18株あり、発症時期は夏季に集中していたことからPFGE法、MLVA法を用いて解析³⁾した。

疫学的情報から関連のある集団事例G-1、G-2について、事例ごとにPFGEパターンは一致、または2バンドの相違であった。MLVAは同一またはSLVで、分子疫学的解析からも分離株は事例ごとに密接に関係しているとわかった。

また、散发事例のS-1とS-2は、PFGEパターンが2バンドの相違、MLVA法は一致する結果となった。よって、散发事例と思われた2つの事例は、発症時期が近いことから近縁株による感染と推察された。

2法による解析の結果、4事例(G-2、S-1、S-2及びS-4)由来15株は、PFGE解析で同一クラスターに属し、MLVA解析でも同一クラスターに属す結果となった。

また、別の集団感染G-2由来2株も、これらと類似したPFGEパターン、MLVAタイプを示した。

よって、集団事例G-2、散发事例S-1、S-2、及びS-4の4事例については、事例間の疫学的関連性は不明なものの、発症

時期が近いことや分離菌株の解析結果から密接な関係があり、遺伝的に近縁な菌株による感染が連続したものと推察された。

また、集団事例G-1もこれらと発症時期が重なっており、関係する可能性があること示唆された。

さらに、2015年11月に発生した家族内感染事例由来3株のMLVAタイプがG-2の主タイプと一致し、PFGEパターンも一致した。このことから遺伝的に近縁な株による感染が、年をまたいで継続し発生していたと推察された。

S-3については、PFGE、MLVAの結果が全ての事例の菌株と異なっていた。疫学情報から海外での感染が疑われる事例であることから、他の5事例とは全く異なる菌株による感染と推察した。

E. 結論

2016年に山口県で分離された腸管出血性大腸菌O26感染症は、2015年末から遺伝的に近縁な株による感染が、継続し拡散した可能性がうかがえた。

このような状況が継続する場合、diffuse outbreakであるかどうかの証明するためには、より詳細な疫学情報の収集が必要である。

本研究において、PFGE法、MLVA法による解析の結果は概ね一致しており、型別能は同等であると考えられた。

MLVA法は、迅速性に優れているだけでなく、菌株の比較が容易なため、広域散発的に発生した事例の探知にも優れていることがわかった。

F. 研究発表

なし

strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111.

Microbiol.Immunol,54,569-577(2010)

G. 参考文献

1)寺島 淳：食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究(課題番号：H15-新興-1)平成17年度総括・分担研究報告書,168-185(2006)

3)国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌の分子型別,病原微生物検出情報,35,129-130 (2014)

2)Izumiya H, et al : New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic Escherichia coli

4)山田裕子,増田加奈子,高尾信一：腸管出血性大腸菌 O157、O26 および O111 の分子疫学的解析法の比較,広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告,23,7-14(2015)

表1 2016年に山口県で発生したEHECO26感染症事例の概要

| 事例No. | 発生時期 | 感染者数 | 内 訳 | | 菌株No. | 備考 |
|-------|------|------|-----|--------|----------|---------|
| | | | 患者数 | 無症状保菌者 | | |
| S-1 | 6月 | 1 | 1 | | 16Y02 | |
| S-2 | 7月 | 1 | 1 | | 16Y03 | |
| G-1 | 8月 | 2 | 2 | | 16Y13、14 | 家族内感染 |
| S-3 | 8月 | 1 | 1 | | 16Y16 | 海外渡航歴あり |
| G-2 | 8~9月 | 12 | 6 | 6 | 16Y19~30 | 保育園 |
| S-4 | 9月 | 1 | 1 | | 16Y31 | |

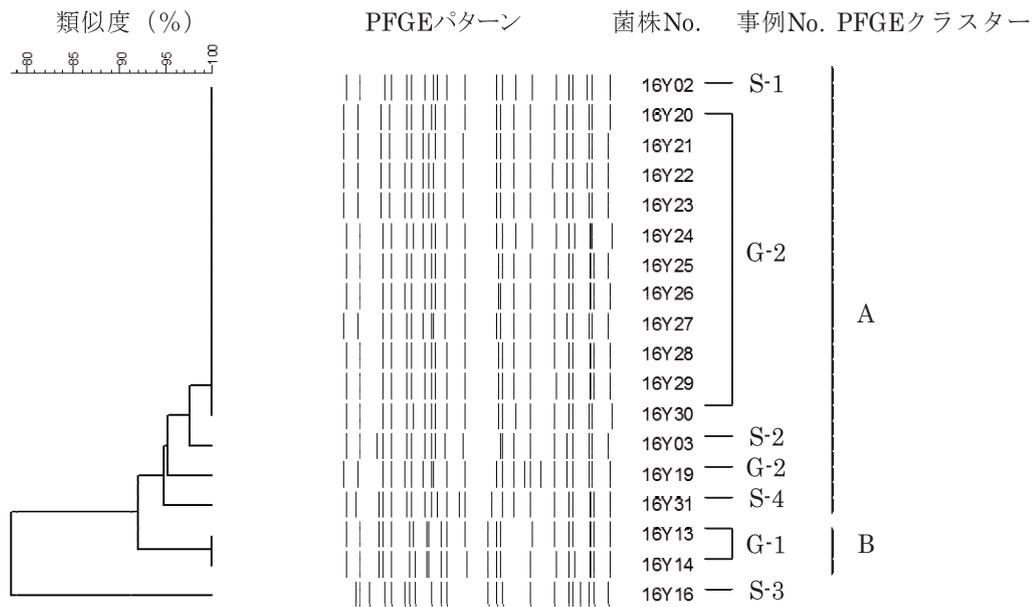


図1 EHEC O26のPFGEのデンドログラム

表2 EHEC O26のMLVAおよびPFGEの解析結果

| 事例No. | 株数 | 0157-34 | EHC-1 | EHC-2 | 0157-9 | EHC-5 | 0157-3 | 0157-25 | EH111-8 | EH157-12 | EH111-14 | EH111-11 | 0157-17 | 0157-36 | 0157-19 | EHC-6 | 0157-37 | EH26-7 | MLVA complex | PFGE クラスタ |
|-------|----|---------|-------------|-------------|-----------|-------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-----------|---------|--------|--------------|-----------|
| S-1 | 1 | 1 | 12 | 15* | 8 | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | a | A |
| S-2 | 1 | 1 | 12 | 15* | 8 | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | a | A |
| G-1 | 2 | 1 | 7 | 15 | 9 | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | . | B |
| S-3 | 1 | 1 | 11 | 12 | 8 | 2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 4 | . | . |
| | 10 | 1 | 12 | 14** | 8 | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | | |
| G-2 | 1 | 1 | 12 | 14 | 9* | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | a | A |
| | 1 | 1 | 12 | 14 | 8 | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | 8* | -2 | 3 | | |
| S-4 | 1 | 1 | 13** | 15 | 8 | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | a | A |

*太字はG-2主リビート数とのsingle locus variantを示す

**太字はS-1, S-2とのsingle locus variantを示す

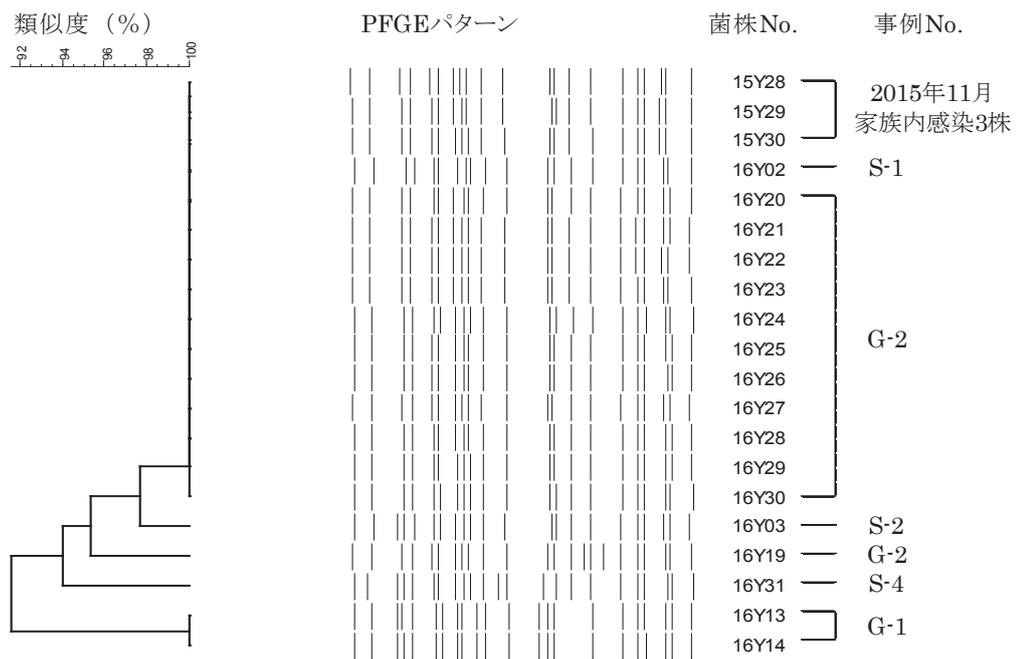


図2 2015年11月の家族内感染3株とのPFGEのデンドログラム

中四国ブロックにおける香川県内で発生したカンピロバクター食中毒事例

研究協力者 香川県環境保健研究センター

内田順子 岩下陽子 関 和美 福田千恵美

研究要旨

2015、2016年に香川県内飲食店において *Campylobacter jejuni* (以下 *C.jejuni*) による食中毒が4件発生した。そこで4事例より分離された *C.jejuni* の血清型と PFGE による遺伝子解析を行った。Penner による血清型は全て型不明となったが、PFGE による遺伝子解析により4件の事例の由来がそれぞれ異なることが示された。市販されている Penner 法の型別率が低いという欠点により血清型による疫学的解釈の助言は難しく、PFGE による疫学解析が重要である。

A. 研究目的

2015、2016年に香川県内飲食店において *C.jejuni* による食中毒が4件発生した。そこで4事例より分離された *C.jejuni* の血清型と PFGE による遺伝子解析を行い、関連性を調査した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2016年に起きた事例Aより分離された3株、事例Bより分離された8株、2015年に起きた事例Cより分離された4株、事例Dより分離された2株、合計17株を対象とした(表1)。

2. 方法

1) 血清型

デンカ生研の感作血球調整試薬およびカンピロバクター免疫血清を用いて間接赤血球凝集反応によるPenner型別¹⁾を行った。

2) PFGE

八尋らの方法²⁾に準じて行った。分離菌株を血液寒天培地で微好気培養後ブロックを作製し、制限酵素 *Sma* I と *Kpn* I を用

いて処理した。電気泳動は CHEF DRIII (Bio-Rad) を用い、6.0V/cm, 6.8 to 38.4 sec, 14.0°Cで19時間泳動した。解析は、FingerPrinting II (Bio-Rad) を使用した。

C. 研究結果

1) 血清型別

分離された *C.jejuni* の血清型はすべて型別不能であった(表2)。

2) PFGE 解析

図1は制限酵素 *Sma* I 処理の解析結果を示す。遺伝子型は大きく5種類に分類された。A事例、D事例は類似度100%と一致した。C事例もバンド数は同じで類似度90%を超えていた。B事例は患者・従業員ともバンド数が同じで類似度90%を超えていたが、残品は類似度25%と低かった。

図2は制限酵素 *Kpn* I 処理の解析結果を示す。遺伝子型は大きく6種類に分類された。C・D事例は類似度100%と一致した。A事例はバンドが2本異なっているが類似度90%を超えていた。B事例は患者由来4株と患者由来2株・従業員

由来 1 株で類似度は 85% となり、残品は類似度 57% と低かった。

D. 考察

C・D 事例においては残品はなく患者便だけであったが、PFGE の解析の結果、それぞれの飲食店で同じものを喫食して発症したと推定された。

A 事例は、残品・患者便とも PFGE で類似度が高く、残品が原因食材と推測された。

B 事例については、残品において制限酵素 *Sma* I 処理、*Kpn* I 処理ともに類似度が低く遺伝子型が異なった。これは、残品が喫食時の食材と仕入れ日が異なっていたためである。しかし *C.jejuni* に汚染された食材であることより、調理時の取り扱いと生食の注意喚起となった。患者・従業員便については、制限酵素 *Sma* I 処理での類似度は 95% と同一由来と推測された。制限酵素 *Kpn* I 処理での類似度は 85% であり同じ由来と思われたが、遺伝子パターンが変化した可能性があるかと推測された。

同一事例で複数の菌種が検出されることもあり、原因究明には分離された菌株の解析だけではなく、喫食調査等の疫学調査も重要である。

E 結論

C. jejuni による食中毒が香川県内飲食店において 4 件発生し、今回調査した結果、4 件の事例の由来がそれぞれ異なることが示された。

Penner による血清型はすべて型不明となり市販されている Penner 法の型別率が低いという欠点により血清型による疫学的解釈の助言は難しく、PFGE による疫学解析が重要である。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) 添付文書:カンピロバクター免疫血清(デンカ生研)
- 2) 八尋俊輔, 上野伸広, 山崎省吾, 堀川和美:「*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討」, 厚生労働省科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業) 分担研究報告書

表1 4事例より分離された菌株

| | |
|------------|----------------------|
| 事例A (2016) | 残品1株 患者便2株 |
| 事例B (2016) | 残品1株 患者便6株 従業員便1株 |
| 事例C (2015) | 患者便4株 |
| 事例D (2015) | 患者便2株 |

表2 4事例より分離された菌株の血清型とPFGE型

| | | | Penner型別 | Sma I 処理 | Kpn I 処理 |
|----------------|-----|------|----------|----------|----------|
| 事例A (2016年) | A-1 | 残品 | UT | G1 | g1 |
| | A-2 | 患者便 | UT | G1 | g1 |
| | A-3 | 患者便 | UT | G1 | g1' |
| 事例B (2016年) | B-1 | 残品 | UT | G2 | g2 |
| | B-2 | 患者便 | UT | G3 | g3-2 |
| | B-3 | 患者便 | UT | G3 | g3-2' |
| | B-4 | 患者便 | UT | G3 | g3-1 |
| | B-5 | 患者便 | UT | G3' | g3-1 |
| | B-6 | 患者便 | UT | G3'' | g3-1' |
| | B-7 | 患者便 | UT | G3 | g3-1 |
| | B-8 | 従業員便 | UT | G3 | g3-2'' |
| 事例C (2015年) | C-1 | 患者便 | UT | G4 | g4 |
| | C-2 | 患者便 | UT | G4 | g4 |
| | C-3 | 患者便 | UT | G4' | g4 |
| | C-4 | 患者便 | UT | G4' | g4 |
| 事例D (2015年) | D-1 | 患者便 | UT | G5 | g5 |
| | D-2 | 患者便 | UT | G5 | g5 |

G3'・G3''はG3とバンド数は同じ

G4'はG4とバンド数は同じ

g1'はg1とバンドが2本異なる

g3-1'はg3-1とバンド数は同じ

g3-2'はg3-2とバンド数は同じであるが、バンド位置が異なる

g3-2''はg3-2とバンドが2本異なる

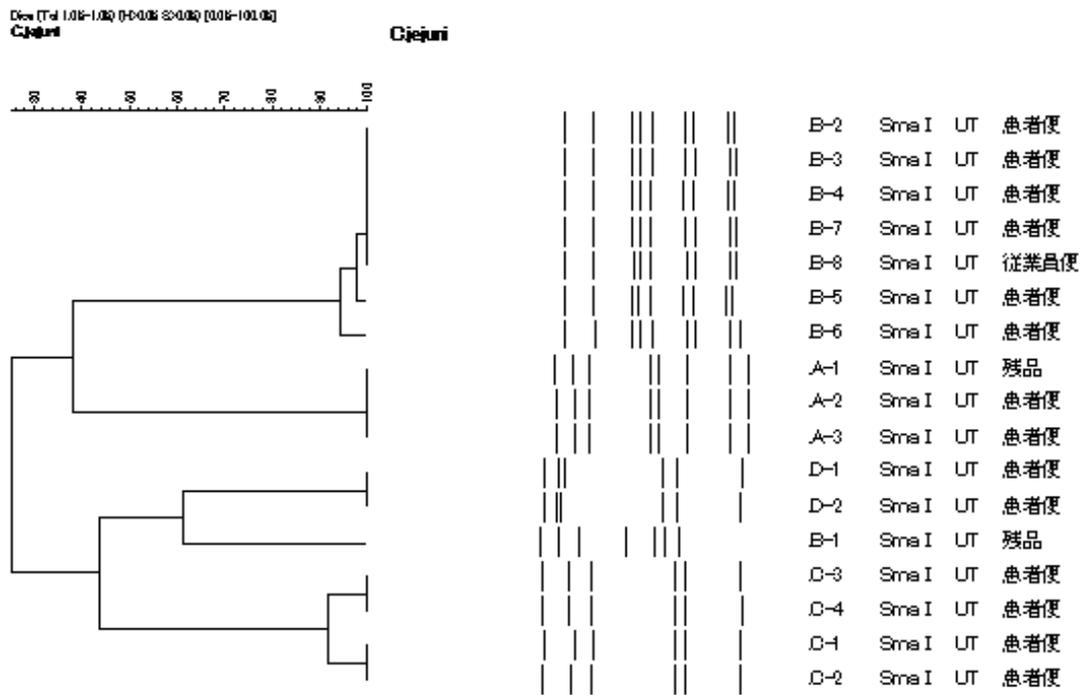


図1 分離された *Campylobacter jejuni* のデンドログラム (制限酵素 *Sma* I 処理)

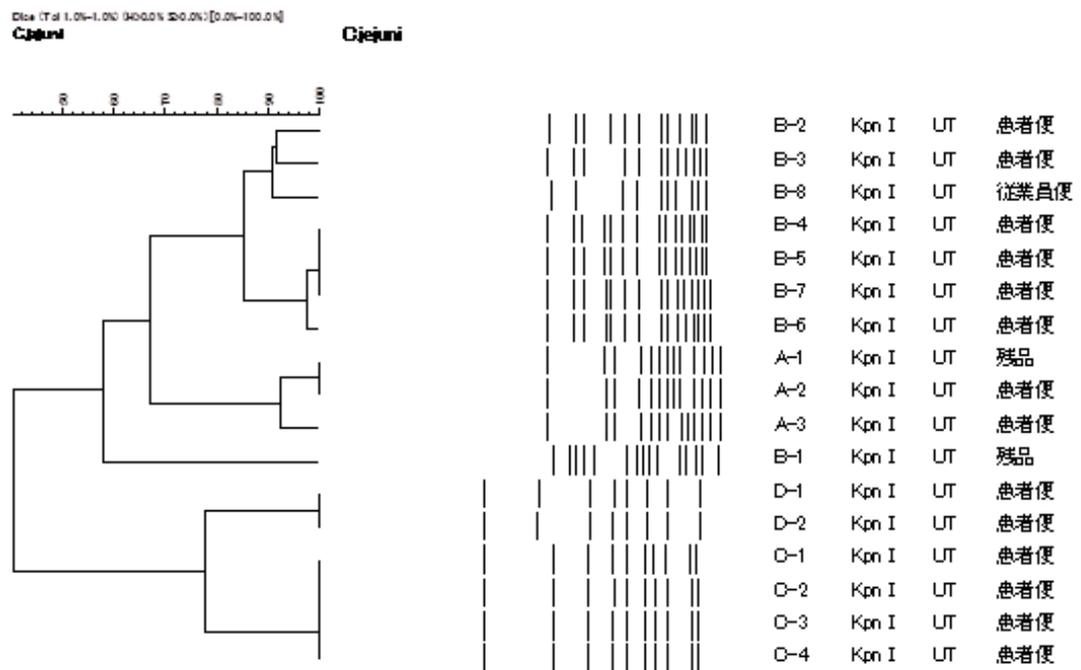


図2 分離された *Campylobacter jejuni* のデンドログラム (制限酵素 *Kpn* I 処理)

高知県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析

研究協力者 高知県衛生研究所
高木 春佳 高橋 富世

研究要旨

平成 28 年 6 月～8 月に県内の 1 家族 4 名から分離された 4 株及び散発事例 2 例から分離された 2 株の腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 計 6 株について、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法)、IS-Printing System 法 (IS 法)、multilocus variable-number tandem-repeat analysis 法 (MLVA 法) による分子疫学解析を実施した。

解析結果から、家族内感染事例の 4 株中 3 株は PFGE 法のパターンがほぼ一致し、IS 法及び MLVA 法の結果は完全に一致した。しかし、残りの 1 株は 3 株と PFGE 法、IS 法、MLVA 法のいずれにおいても全く違うパターンを示し、この家族内感染事例の起原菌には 2 種類の EHEC O157 が存在する可能性が示唆された。

散発事例の 2 例は家族内感染事例との関連性は低いと思われた。

A. 研究目的

感染源・感染経路の解明及び事例間の関連性を明らかにし、感染拡大を防止することを目的として、平成 28 年 6 月～8 月に当県で分離された EHEC O157 について、PFGE 法及び IS 法による分子疫学解析を実施した。また、国立感染症研究所 (感染研) で MLVA 法を実施・解析したので、結果を併せて報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 28 年 6 月～8 月に県内の保健所及び医療機関で分離された 1 家族 4 名からの 4 株及び散発事例 2 例からの 2 株の EHEC O157 計 6 株について、生化学的性状、血清型別、毒素産生性を確認した。

生化学的性状及び血清型別は定法を用い、毒素産生性はベロ毒素 (VT) 遺伝子の保有について、PCR 法を実施した。

2. 分子疫学解析

(1) PFGE 法

感染研ニュープロトコールに基づいて実施した。制限酵素は *Xba*I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2-54.2sec、泳動時間 19 時間で実施した。

(2) IS 法

試薬キット IS-Printing System (東洋紡(株)) を用い、添付のプロトコールに従って実施した。各プライマーにより増幅される産物を各セット毎に高分子量側から 3 バンドずつ「1」「2」「4」の数字を当て、Standard DNA と比較し、増幅があったバンドの数値を区分毎に加算し、1st、2nd の順に並べて 12 桁のコード化したものを判定結果とした。

(3) MLVA 法

感染研にて分子疫学解析を実施した。

C. 研究結果

1. EHEC の性状

結果を IS 法及び MLVA 法の結果と併せて表 1 に示す。

分離された 6 株は全て O157:H7 で、菌株 No.1～3 は VT1VT2 遺伝子を保有

し、菌株 No.3~6 は VT2 遺伝子のみ保有していた。

2. 分子疫学解析

(1) PFGE 法

PFGE 法の系統樹及び電気泳動画像を図 1、図 2 に示す。

家族内感染事例の 4 株中 3 株は 95% 以上の一致率を示したが、残りの 1 株は一致率が 47.5% であった。

散発事例である菌株 No.5 と No.6 の一致率は 85.7% であり、5 つのバンドで相違があった。

(2) IS 法

家族内感染事例の 4 株中 3 株は、「717577 611657」であり、残りの 1 株は「012057 210442」であった。

散発事例である菌株 No.5 は「305457 211642」であり、菌株 No.6 は、「305057 211242」と 1st と 2nd でそれぞれ 1 つのバンドの相違があった。

(3) MLVA 法

家族内感染事例の 4 株中 3 株は、MLVA type 16m0089、MLVA complex 16c055 で神戸市環境保健研究所（神戸市）の 8 株と一致した（12 月 8 日時点）。残りの 1 株は MLVA type13m0322、MLVA complex16c075 で神戸市の 3 株及び滋賀県立衛生環境センターの 1 株と一致した（12 月 11 日時点）。

散発事例の菌株 No.5 は MLVA type16m0142、MLVA complex16c025 で MLVA complex は複数の地衛研の分離株と一致したが、MLVA type が一致するものはなかった（11 月 24 日時点）。

散発事例の菌株 No.6 は MLVA type16m0102 で神戸市の 1 株及び相模原市衛生試験所の 2 株と一致した（10

月 26 日時点）。

D. 考察

家族内感染事例の 4 株中 3 株は、PFGE 法においてバンド 1 つの相違が見られたが、IS 法、MLVA 法では完全に一致しており、由来株は同一と考えられる。しかし、残りの 1 株は、PFGE 法の一致率も低く、IS 法、MLVA 法の結果も大きく異なっているため、3 株の由来株が変異したものではなく、3 株とは全く異なる由来株があったと推測される。

また、家族内感染事例の 3 株と残りの 1 株の MLVA type は全く異なっているにも関わらず、共に神戸市で検出された菌株の MLVA type と一致していた。疫学情報は不明であるが、1 つの家族の中で感染源の異なる曝露があったわけではなく、2 種類の EHEC O157 に汚染された食品が原因となった可能性が示唆された。しかし、当所に提供された菌株は感染者 1 名につき 1 株であったため、1 名の感染者からこの 2 種類の EHEC O157 を検出することはできなかった。

2 件の散発事例については、PFGE 法、IS 法、MLVA 法の結果より、家族内感染事例とは関連性は低いと考えられる。また、散発事例の PFGE 法及び IS 法において近縁菌株のようなパターンを示したが、MLVA 法の結果より、関連性は低いと判断することができた。今後の県内の発生において、近縁菌株の有無等に注視していきたい。

E. 結論

1. 今回の家族内感染事例では、由来

の異なる 2 種類の EHEC O157 が検出され、同一の MLVA type が他県でも検出されていることから、原因食品が 2 種類の EHEC O157 に汚染されていた可能性が示唆された。しかし、疫学情報の不足等により感染源・感染経路の特定には至らなかった。

2. 散発事例については、分離時期が家族内感染事例と近いが、分子疫学的な関連性は低いと考えられた。また事例間の関連性も低いと考えられる。

3. 各事例の関連性把握するうえでは、迅速な分子疫学解析が重要であり、感染源・感染経路を明確にするためには、詳細な疫学情報の収集が必要不可欠と考える。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

なし

表 1 EHEC の性状、IS 法及び MLVA 法の結果

| 菌株 No. | 血清型 | 毒素型 | 発生状況 | 分離日 | IS コード | | MLVA(感染研) | | 一致した地衛研 |
|--------|---------|---------|------|------|--------|--------|-----------|---------|----------|
| | | | | | 1st | 2nd | type | complex | |
| 1 | O157:H7 | VT1+VT2 | | 7/6 | 717577 | 611657 | 16m0089 | 16c055 | |
| 2 | O157:H7 | VT1+VT2 | 家族内 | 7/7 | 717577 | 611657 | 16m0089 | 16c055 | 神戸市 |
| 3 | O157:H7 | VT1+VT2 | 感染 | 7/2 | 717577 | 611657 | 16m0089 | 16c055 | |
| 4 | O157:H7 | VT2 | | 7/6 | 012057 | 210442 | 13m0322 | 16c075 | 神戸市・滋賀県 |
| 5 | O157:H7 | VT2 | 散发例 | 6/20 | 305457 | 211642 | 16m0142 | 16c025 | - |
| 6 | O157:H7 | VT2 | 散发例 | 8/25 | 305057 | 211242 | 16m0102 | - | 神戸市・相模原市 |

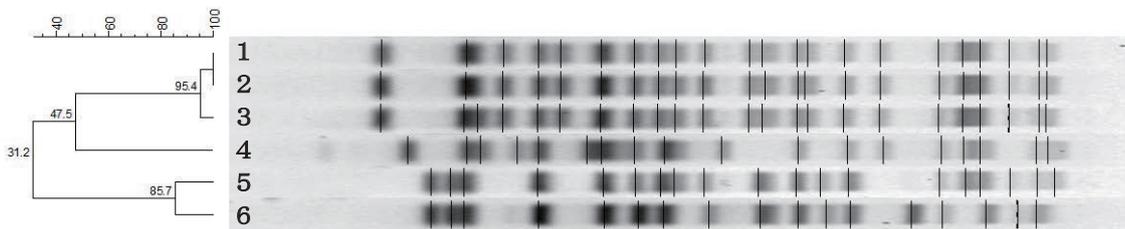
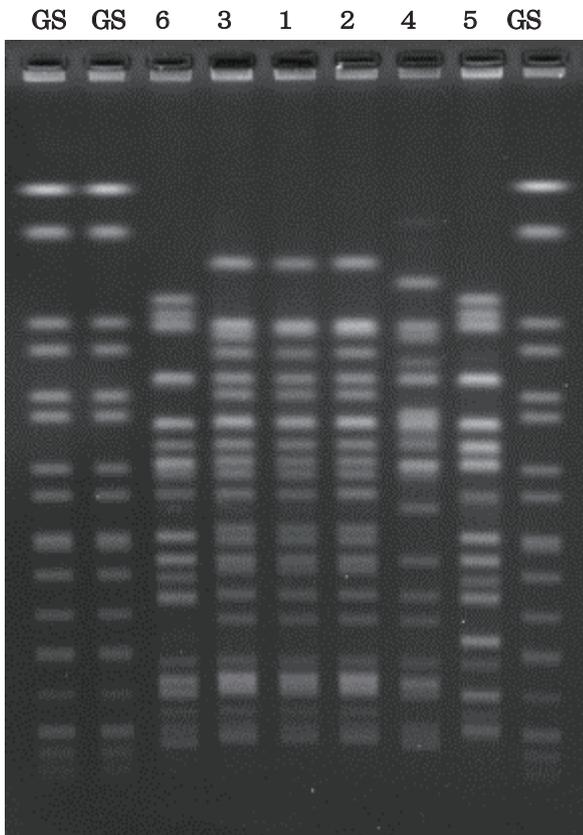


図 1 PFGE 系統樹

1～6：菌株 No. 1～6



GS : *Salmonella* Brenderup

1～6：菌株 No. 1～6

図 2 PFGE 泳動画像

腸管出血性大腸菌 O26 感染症事例での分子疫学的解析

研究協力者 高知県衛生研究所

高橋富世 高木春佳 戸梶彰彦 松本道明

研究要旨

平成 28 年 (2016 年) 9 月上旬に端を発した高知県高岡郡内 K 保育所の腸管出血性大腸菌 O26 感染症の集団事例を報告する。

9 月 9 日に県内 2 箇所の保健所に腸管出血性大腸菌 O26 (VT1 産生) (以下「EHEC O26」) の届出があった。届出のあった 2 事例は同じ保育所の同じクラスに通所する園児であったため、K 保育所を管轄する S 保健所が接触者調査と共に K 保育所に立入り調査を実施した。その結果、園児・職員および感染者家族の検便 241 検体中 26 件から EHEC O26 が検出された。感染者のうち下痢や血便などの有症者は園児 3 名であったが、溶血性尿毒症、脳症や死亡などの重症例はなかった。また、感染者の約 9 割が無症状であった。疫学調査および検査結果から食中毒は否定された。

これらの分離株についてパルスフィールドゲル電気泳動(以下「PFGE」)による遺伝子解析を実施したところ、PFGE パターンがほぼ一致した。また、国立感染症研究所(以下「感染研」)での Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (以下「MLVA」)からも集団事例関連株との結果が得られた。データベースにおいて、現在までに集積された菌情報で本事例株と同じ MLVA 型を示す菌株はなかった。

本事例は、分子疫学解析の結果から同一感染源による感染が疑われる事例であった。感染源の特定には至らなかったが、感染経路としてヒト→ヒト伝播が強く示唆された。

A. 研究目的

平成 28 年 9 月 9 日に発生した K 保育所の集団感染事例から分離された EHEC O26 28 株について感染源の特定や分離株の関連性を調べるため、PFGE による分子疫学解析を実施した。また、感染研において MLVA を実施・解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 28 年 9 月に S 保健所で実施した検便から分離された EHEC O26 26 株および医療機関を受診した EHEC O26 感染症患者(以下「患者」)から分離された

2 株、合計 28 株について、生化学的性状、血清型別、毒素産生性を確認した。

生化学的性状および血清型別は定法を、毒素産生能はベロ毒素 (VT) 遺伝子の保有については PCR 法を実施した。

2. 分子疫学解析

(1) PFGE 法

感染研新プロトコールに基づいて行った。制限酵素は *Xba*I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2–54.2sec、泳動時間 19 時間で行った。

参考として、当所で保存している EHEC O26 1 株の PFGE を実施した。

(2) MLVA 法

感染研にて分子疫学解析した。

C. 研究結果

1. 事例の概要

平成 28 年 9 月 9 日、県内 2 箇所の保健所に EHEC O26 の届出があった。届出のあった 2 事例は同じ保育所の同じクラスに通所する園児であることが判明したため、S 保健所が接触者調査および立入り調査を実施した。

当初、患者が 1 つのクラスに限定されていたため、患者在籍クラスと患者の兄弟が在籍するクラスの園児、同クラスを担当する保育士、調理従事者および患者家族の計 31 名を検便の対象者とした。その結果、4 名から EHEC O26 が検出された。これをうけて、K 保育所へ通所する全園児、保育所全職員および感染者家族に検便対象を拡大し、合計 241 検体(再検査 1 名)の検便を実施し、26 件から EHEC O26 が検出された(表 1)。なお、給食従事者からは検出されなかった。また、職員 2 名(0 歳児 B クラス担任、4 歳児 A クラス担任)から菌は分離されなかったが、スクリーニング検査で VT 遺伝子が確認された。

感染者のうち下痢や血便などの有症者は 3 名(1 歳児: 2 名、3 歳児; 1 名)であったが、溶血性尿毒症、脳症や死亡などの重症例はなかった。また、感染者の約 9 割(園児 20 名、家族 5 名)は無症状であった。1 歳児 B クラスでは、患者 2 名に加え園児 1 名が 9 月 2 日に下痢症状を呈していたが、EHEC O26 は検出されなかった。

8 月 23 日～31 日(8 月 27 日、28 日を除く)の給食保存食(原材料および調理

品)からは EHEC O26 は検出しなかった。

K 保育所では 8 月末までプールを実施しており、0～1 歳児のグループ、2 歳以上のグループがそれぞれプールを共用していた。また、居残り保育は 0～2 歳児のグループ、3 歳児以上のグループで実施されていた。

S 保健所は、K 保育所に対し立入り調査時から施設の消毒、手洗いの徹底、石鹸・タオルの共用禁止、また、保護者へは二次感染予防の周知等について指導を行い、感染拡大の防止に努めた。

9 月 23 日の検便陽性者を最後に 3 週間以上新規感染者発生のないこと、感染者 28 名全員の菌が陰性化したことをもって、10 月 13 日に終息を確認した。

2. EHEC の性状

分離した 28 株は、すべて O26 : H11 で VT-1 遺伝子を保有していた。

3. 遺伝子型の比較

(1) PFGE 法

28 名の分離株および参考株の PFGE 結果を図 1 に示す。

28 株のうち、3 株(No.19, 20, 21)を除く 25 株は一致率 90.3～100%でほぼ同じパターンであった。上記 3 株は同一家族であり、他の 25 株との一致率は 83.9%であった。

また、分離株 28 株と参考株との一致率は 52.9%であった。

(2) MLVA 法

MLVA 型は、28 株中 25 株が「16m2135」、2 株(同一家族)が「16m2137」、1 株が「16m2136」で

あった。「16m2135」と比較して「16m2137」は2SNP、「16m2136」は1SNPの違いしかなく、28株は集団事例関連株と考えられると判定された。

また、感染研データベースにおいて集積された菌情報には、本事例菌株と一致している菌株データはなかった。

D 考察

今回の事例では、0～1歳児クラスを中心にEHEC O26が検出された。疫学調査および検査結果より食中毒は否定されたが、分離された菌株のPFGEパターンおよびMLVA型の解析から同一の感染源に由来するものと考えられる。

2歳児クラス以上で検出された園児7名のうち5名は兄弟が0～1歳児クラスに在籍していたことから、患者を含む0～1歳児クラスを中心として、園児および家族間でのヒト→ヒト感染が強く推測された。

今回の集団事例では、無症状保菌者が多く、届出のあった2名が初発と判定するには十分ではないことから、感染源の特定には至っていない。しかし、何らかの要因で保育所に持ち込まれたEHEC O26がプール、居残り保育を通じて、また、0歳児Bクラス担任の検便よりVT遺伝子の痕跡が検出されたことから、排泄処理時の汚染等により拡大した等が考えられた。

保育園におけるヒト→ヒト感染によるEHEC集団感染事例は数多く報告されており、また、患者発生に伴う家族内の二次感染も多く報告されている^{1~3)}。保健所では、日頃から保育所に対し、食中毒や感染症予防として、施設の消毒、手洗いの徹底、石鹸、タオルの共用禁止等、

保護者への二次感染予防の周知等について指導を行っている。しかし、立入り調査時には固形石鹸や共用タオルが使用されていたことから、今後とも基本的な予防策として手洗い等の衛生管理および二次感染防止の徹底指導が必要であると思われる。

E 結論

1. 無症状病原体保菌者が多く、重症例はなかった。
2. 分離した28株は、全て血清型O26:H11でVT-1遺伝子を保有しており、分子疫学的にはほぼ同じパターンで、感染研データベースにおいて集積された菌情報には、本事例菌株と一致している菌株データはなかった。
3. 感染源の特定はできなかったが、ヒト→ヒト感染が示唆された。

F 研究発表

なし

G 参考文献

- 1)腸管出血性大腸菌感染症 2015年4月現在;病原微生物検出情報 Vol.36 No5;2015.5
- 2)腸管出血性大腸菌感染症 2016年4月現在;病原微生物検出情報 Vol.37 No5;2016.5
- 3)保育園における腸管出血性大腸菌O26:H11の感染事例—大阪府;病原微生物検出情報 Vol.37 No5;2016.5

表 1 事例概要(感染者一覧)

| | 感染者数 | クラス年齢 (在籍者数) | 有症者数 | 無症状者数 | 備 考 |
|-------|------|-----------------|------|-------|--|
| K 保育園 | 23 名 | 0 歳児(9 名) | 0 | 6 | |
| | | 1 歳児 A(11 名) | 0 | 6 | |
| | | 1 歳児 B(8 名) | 2 | 2 | |
| | | 2 歳児 A(11 名) | 0 | 1 | 1 歳児 A クラスの家族 1 名 |
| | | 2 歳児 B(11 名) | 0 | 1 | |
| | | 3 歳児(22 名) | 1 | 2 | 0 歳児クラスの家族 1 名 1 歳児 B クラスの家族 2 名 |
| | | 4 歳児 A(13 名) | 0 | 1 | 1 歳児 A クラスの家族 1 名 |
| | | 4 歳児 B(13 名) | 0 | 0 | |
| | | 5 歳児 A(20 名) | 0 | 1 | |
| | | 5 歳児 B(21 名) | 0 | 0 | |
| 家族 | 5 名 | | 0 | 5 | 0、3 歳児クラスの家族 1 名 1 歳児 A クラスの家族 2 名 1 歳児 B クラスの家族 1 名 |
| 計 | 28 名 | | 3 名 | 25 名 | |

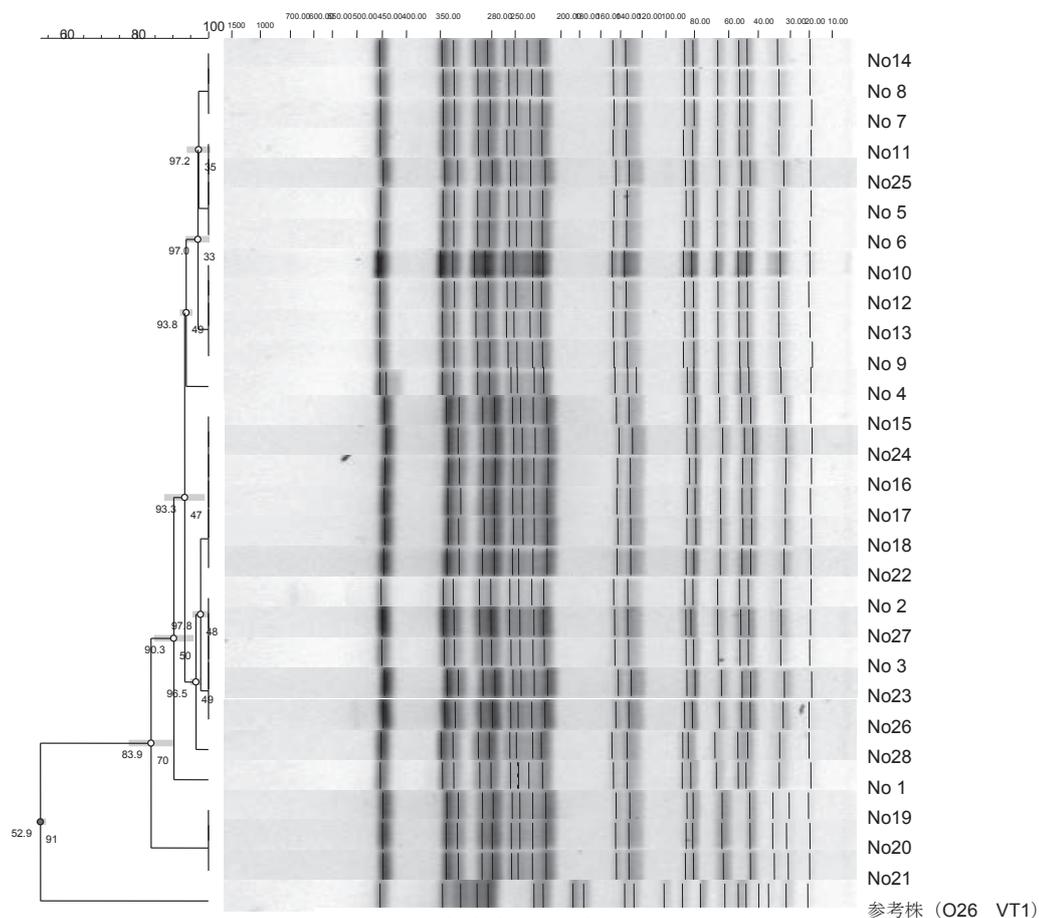


図1 有症者便由来株 PFGE 系統樹

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
「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」

平成 28 年度分担研究報告書

九州地区における効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究
—IS 型別データベースの運用、EHEC 検出状況、集団発生事例の集約、精度管理 (ISPS、
PFGE) 及び ISPS エクストラバンド情報の集約—

| | | |
|-------|-------|---------------|
| 研究代表者 | 泉谷秀昌 | 国立感染症研究所 |
| 研究分担者 | 世良暢之 | 福岡県保健環境研究所 |
| 研究協力者 | 岩佐奈津美 | 福岡市保健環境研究所 |
| | 有川衣美 | 北九州市環境科学研究所 |
| | 塘由香 | 佐賀県衛生薬業センター |
| | 川野みどり | 長崎県環境保健研究センター |
| | 江原裕子 | 長崎市保健環境試験所 |
| | 成松浩志 | 大分県衛生環境研究センター |
| | 福島宏暢 | 熊本県保健環境科学研究所 |
| | 矢坂多佳子 | 熊本市環境総合センター |
| | 水流奈己 | 宮崎県衛生環境研究所 |
| | 穂積和佳 | 鹿児島県環境保健センター |
| | 高良武俊 | 沖縄県衛生環境研究所 |
| | 濱崎光宏 | 福岡県保健環境研究所 |
| | カール由起 | 福岡県保健環境研究所 |
| | 岡元冬樹 | 福岡県保健環境研究所 |
| | 西田雅博 | 福岡県保健環境研究所 |
| | 重村洋明 | 福岡県保健環境研究所 |

要旨

九州地区では、1. IS-printing System (以下、ISPS とする) による IS 型別データベースの運用、2. 腸管出血性大腸菌 (以下、EHEC) 検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約、4. 精度管理 (ISPS、PFGE) 及び 5. ISPS で発生したエクストラバンド情報の集約の 5 項目について取り組んだ。

九州地区における腸管出血性大腸菌 0157 (以下 0157EHEC) の IS 型別の登録数は平成 28 年 12 月現在で 1602 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 229 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 224 件、平成 26 年度 206 件、平成 27 年度 204 件及び平成 28 年度 198 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。九州地区で平成 28 年度に収集された EHEC は 471 株であ

った。その内訳は、0157EHECが227株、026EHECが164株、0111EHECが18株、0103EHECが17株、0121EHECが9株、091EHECが6株、0145EHECが6株、その他の血清型が16株及び血清型別不能が8株であった。九州地区は非0157EHECの占める比率48.2%であり、本研究で0157EHECに加えて非0157EHECの情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。平成28年度の0157EHEC及び非0157EHECによる集団発生事例は11事例であった。その内訳は、0157EHECによるものが5事例で、026EHECによるものが6事例であった。精度管理では昨年度に引き続きISPS、PFGEについて実施した。ISPSでは、エクストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。PFGEでは、泳動は概ね良好に行われていたが、11地衛研の各担当者が判定したバンド数で、全4株一致した地衛研は1地衛研のみであった。ほとんどの地衛研が0~3本相違であり、昨年度と比べると相違数が少なくなっていた。一致しなかったのは、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

A. 研究目的

食中毒や感染症等の緊急事例発生時には、科学的根拠に基づいた感染源及び感染経路を解明し、原因究明や拡大防止等の行政対応をすることが求められる。科学的根拠としては、有症者、調理従事者及び推定原因食品等から分離された病原細菌について、分子疫学的手法を用いて関連性を鑑別することが最も一般的である。腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法として汎用されているパルスフィールド・ゲル電気泳動法（以下、PFGE）は、国立感染症研究所（以下、感染研）を中心に全国規模のPFGE型別データベースの構築が進んでいる。平成26年度からは、0157EHEC、026EHEC及び0111EHECに対しては、迅速性と分解能の両立を目指した遺伝子型別解析方法として、Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)により情報還元が開始された。九州地区では、従来からのPFGE法と比較して操作が簡便で迅速性に

優れ、デジタル結果が得られるといった特徴があるIS-printing system (ISPS)法を用いてデータベースを構築し、菌株識別のためのデジタル情報の共有、流行菌株の探知及び監視等を目的に研究を実施している。本研究では、遺伝子型別法の信頼性を確保するため、PFGE及びISPSの精度管理を実施した。ISPSのエクストラバンドについて、九州内の各地衛研からの情報を集約した。また、EHEC検出状況及びEHECによる集団発生事例についても集約した。

B. 研究方法

ISPSは、IS-printing system (東洋紡(株))を用い、取扱い説明書に従って実施した。IS型別は、ISの分布に由来する32の増幅バンド(No. 1-01~1-16/2-01~2-16)及び病原性関連遺伝子(stx_1 、 stx_2 、 eae 及びEHEC- $hlyA$)の合計36種の遺伝子の検出の有無を1及び0の2進数で置き換えた後、10進数に再変換し

た 11 桁の整数として数値化した。また、得られた 36 種類の遺伝子座のコードから BioNumerics Ver. 6.1 (Applied Maths) を用いて Minimum spanning tree (MST) 解析を行った。

EHEC 検出状況、EHEC による集団発生事例及び ISPS のエクストラバンド情報の集約については、メールを利用したエクセルデータ等のやりとりにより実施した。

ISPS については、平成 26 年度に配分した「IS-printing 電気泳動マニュアル(最終版)-九州パルスネット ver.2」により実施した。PFGE については各地衛研が通常行っている方法にて行った。O157EHEC 4 菌株 (A-D; ISPS で明瞭なエクストラバンドをもつ株を含む) を参加地衛研に配布した (表 1)。

C. 研究結果及び考察

1. IS 型別データベースの運用

ここでは平成 22 年 4 月から平成 28 年 12 月までの IS 型別の登録状況等について解析したものを報告する。

九州地区における O157EHEC の IS 型別の登録数は平成 28 年 12 月現在で 1602 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 229 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 224 件、平成 26 年度 206 件、平成 27 年度 204 件及び平成 28 年度 198 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移している (表 2)。

平成 22~28 年度に登録された 1602 件の O157EHEC の IS 型別数は 289 型に分類された。最も多く登録されている O157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 161 株 (10.0%) が九州地区の全ての地衛研から、登録された (表 3、図 1)。また、7 年間で 20 株以下しか登録が無い O157EHEC の IS 型別数は 273 型 (94.4%)

で、それに属する株は合計 813 株 (50.7%) であった。また、MST 解析の結果から、IS 型別の O157EHEC が分離された地域による差は認められなかったが、分離された時期による偏りは確認された (図 1.1、1.2)。

ISPS は操作が簡便で迅速性に優れた特徴を有する一方で、PFGE 型別が同一で IS 型別が異なる株等も報告されていることから、ISPS の精度管理等で解析能力の向上に努める必要がある。ISPS の実施は、人的及び予算的問題、PFGE 法の実施等を考慮し、効率的な運用という観点から、各地衛研において判断され、実施されていると考えられた。

2. 九州地区での EHEC 検出状況

九州地区の地衛研における EHEC の O 群血清型別の検出状況について解析した。

九州地区 12 地衛研にて平成 28 年 4 月から 12 月までに 471 株の EHEC 菌株が収集され (表 4)、その内訳は O157EHEC が 227 株 (48.2%)、非 O157EHEC が 244 株 (51.8%) そのうち O 群血清型別不能 EHEC が 8 株であった。非 O157EHEC は 15 種類の O 群に型別され、その内訳は O26 EHEC が 164 株 (34.8%)、O111 EHEC が 18 株 (3.8%)、O103 EHEC が 17 株 (3.6%)、O121 EHEC が 9 株 (1.9%) などの順であった。九州地区で収集される EHEC の O 群血清型の内訳に大きな変化は無く、例年、O157EHEC、O26EHEC、O111EHEC、O103EHEC 及び O121EHEC などで全体の 9 割を占めている。九州地区は本研究で O157EHEC に加えて非 O157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。

3. EHEC による集団発生事例数

平成 28 年度の EHEC による集団発生事例は

11 事例であった(表 5)。その内訳は、0157EHEC によるものが 5 事例で、026EHEC によるものは 6 事例であった。発生場所別に見ると、保育所、家庭内であった。集団発生事例は、保育所など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。

4. 精度管理 (ISPS、PFGE)

昨年と同様に ISPS の精度管理を、九州地区 12 地衛研を対象に実施した。併せて PFGE の精度管理も同 11 地衛研で行った。A は無作為に選択した菌株、B、C 及び D は ISPS が同一で PFGE が異なる菌株で ISPS において 1st セットの 1-02 と 1-03 の間にエクストラバンドが現れる株を選択した。

ISPS の精度管理の結果、エクストラバンドのない A については全施設で正しく判定された。しかし、エクストラバンドを含む B、C 及び D については、3 地衛研で誤判定がみられた(図 2.1)。さらに泳動が非常に綺麗に行われないと本物のバンドとの識別は困難であり(図 2.2)、担当者により判定が異なっていた。

一方、PFGE については、泳動は概ね良好に行われていたが(図 3.1 から 3.4)、11 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研は 1 地衛研のみであった。ほとんどの地衛研が 0~3 本相違であった(表 6)。一致しなかった原因として、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

5. ISPS エクストラバンド情報の集約

ISPS のエクストラバンド情報は、九州地区 6 地衛研から得られた。代表的な ISPS のエクストラバンドの写真を図 4.1 から 4.4 に示す。

ISPS のエクストラバンドは、6 か所報告された(表 7)。報告された 6 か所のうち、1-02 と 1-03 の間、1-14 と 1-15 の間及び 1-12 と 1-13 の間の 3 か所のエクストラバンドは、誤判定する可能性があるため注意が必要である。

D. 結論

九州地区における 0157EHEC の IS 型別の登録数は毎年 200 件前後の登録で推移している。平成 22~28 年度に登録された 1602 株の 0157EHEC の IS 型別数は 289 型に分類され、7 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 16 型 (5.5%) でそれに属する株は合計 772 株 (48.2%) であった。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 161 株 (11.0%) が 12 地衛研から登録された。

九州地区 12 地衛研にて平成 28 年 4 月から 12 月までに 471 株の EHEC 菌株が収集され、その内訳は 0157EHEC が 227 株 (48.2%)、非 0157EHEC が 244 株 (51.8%) そのうち 0 群血清型別不能 EHEC が 8 株であった。九州地区で収集される EHEC の 0 群血清型の内訳に大きな変化は無く、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC 及び 0121EHEC などで、全体の 9 割を占めていた。

平成 28 年度の EHEC による集団発生事例は 11 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 5 事例、026EHEC によるものが 6 事例であった。発生場所別に見ると、保育所等、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。

精度管理では、昨年度に引き続き ISPS、PFGE について行った。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。

PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、11 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研は 1 地衛研のみであった。ほとんどの地衛研が 0～3 本相違であった。バン

ドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

表1 精度管理に用いた腸管出血性大腸菌

| 試料名 | 菌株名 | 分離年 | 由来 | 血清型 | 志賀毒素遺伝子 | IS型別 |
|-----|--------|------|-----|---------|---|-------------|
| 菌株A | 16E004 | 2016 | 保菌者 | O157:H- | <i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂ | 64427577418 |
| 菌株B | 16E014 | 2016 | 患者 | O157:H- | <i>stx</i> ₁ | 57733536074 |
| 菌株C | 16E015 | 2016 | 保菌者 | O157:H- | <i>stx</i> ₁ | 57733536074 |
| 菌株D | 16E016 | 2016 | 保菌者 | O157:H- | <i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂ | 57733536074 |

表2 九州地区地衛研におけるIS型別登録数

| 地衛研 | IS型別登録数 | | | | | | | 合計 |
|-----|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| | 平成22年度 | 平成23年度 | 平成24年度 | 平成25年度 | 平成26年度 | 平成27年度 | 平成28年度 | |
| 1 | 112 | 48 | 61 | 26 | 28 | 46 | 29 | 350 |
| 2 | 50 | 53 | 44 | 24 | 32 | 42 | 34 | 279 |
| 3 | 30 | 15 | 12 | 15 | 38 | 46 | 10 | 166 |
| 4 | 12 | 12 | 17 | 52 | 28 | 15 | 40 | 176 |
| 5 | 23 | 18 | 11 | 28 | 26 | 10 | 25 | 141 |
| 6 | 6 | 5 | 4 | 8 | 2 | 7 | 2 | 34 |
| 7 | 13 | 16 | 24 | 18 | 11 | 14 | 31 | 127 |
| 8 | 16 | 10 | 5 | 30 | 25 | 0 | 0 | 86 |
| 9 | 5 | 3 | 7 | 2 | 4 | 5 | 3 | 29 |
| 10 | 20 | 17 | 16 | 4 | 3 | 4 | 5 | 69 |
| 11 | 19 | 25 | 21 | 15 | 8 | 15 | 16 | 119 |
| 12 | 6 | 7 | 7 | 2 | 1 | 0 | 3 | 26 |
| 合計 | 312 | 229 | 229 | 224 | 206 | 204 | 198 | 1602 |

表3 九州地区での登録数が多いIS型別（年度別、地衛研別）

| 順位 | IS型別 | 登録数 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 合計 | |
|----|-------------|------|----|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|----|---|---|----|----|----|-----|
| | | 登録年度 | | | | | | | 登録地衛研 | | | | | | | | | | | | |
| | | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | 12 |
| 1 | 66324257743 | 22 | 32 | 4 | 11 | 33 | 50 | 9 | 26 | 18 | 59 | 7 | 12 | 1 | 16 | 6 | 2 | 5 | 8 | 1 | 161 |
| 2 | 57733536074 | 3 | 15 | 23 | 8 | 16 | 10 | 27 | 22 | 23 | 4 | 16 | 15 | 11 | 4 | 2 | 1 | 4 | | | 102 |
| 3 | 30671622280 | 33 | 11 | 1 | 7 | 11 | 2 | 2 | 31 | 5 | 3 | | 11 | 3 | 2 | | 1 | 6 | 5 | | 67 |
| 4 | 56643812046 | 31 | 14 | 3 | 13 | 3 | | | 19 | 17 | 7 | 3 | 6 | 2 | 8 | | | 1 | 1 | | 64 |
| 5 | 30653010185 | 9 | 4 | 4 | 14 | 6 | 3 | 2 | 6 | 5 | 3 | 3 | 8 | | 2 | 8 | | 5 | 1 | 1 | 42 |
| 6 | 66457435083 | 6 | 2 | 9 | 10 | 1 | 5 | 9 | 11 | 7 | 3 | 3 | 1 | 1 | 7 | | 1 | 3 | 5 | | 42 |
| 7 | 57733470538 | | 2 | 12 | 1 | 16 | 5 | 4 | 12 | 5 | 0 | 18 | 2 | | 1 | | 1 | | 1 | | 40 |
| 8 | 27384601163 | 26 | 3 | | 7 | | | | 8 | 1 | 4 | | 8 | 6 | | 2 | 3 | 2 | 2 | | 36 |
| 9 | 66324192207 | 3 | 7 | 7 | 0 | 3 | 10 | 3 | 12 | 9 | 1 | 2 | 1 | | 4 | | | 4 | | | 33 |
| 10 | 22081687688 | 12 | | | 2 | 16 | | | 9 | 7 | 8 | | 3 | | | | 2 | 1 | | | 30 |
| 10 | 66323217359 | 10 | 8 | 8 | 4 | | | | 4 | 14 | 1 | 1 | | | 9 | | | | 1 | | 30 |

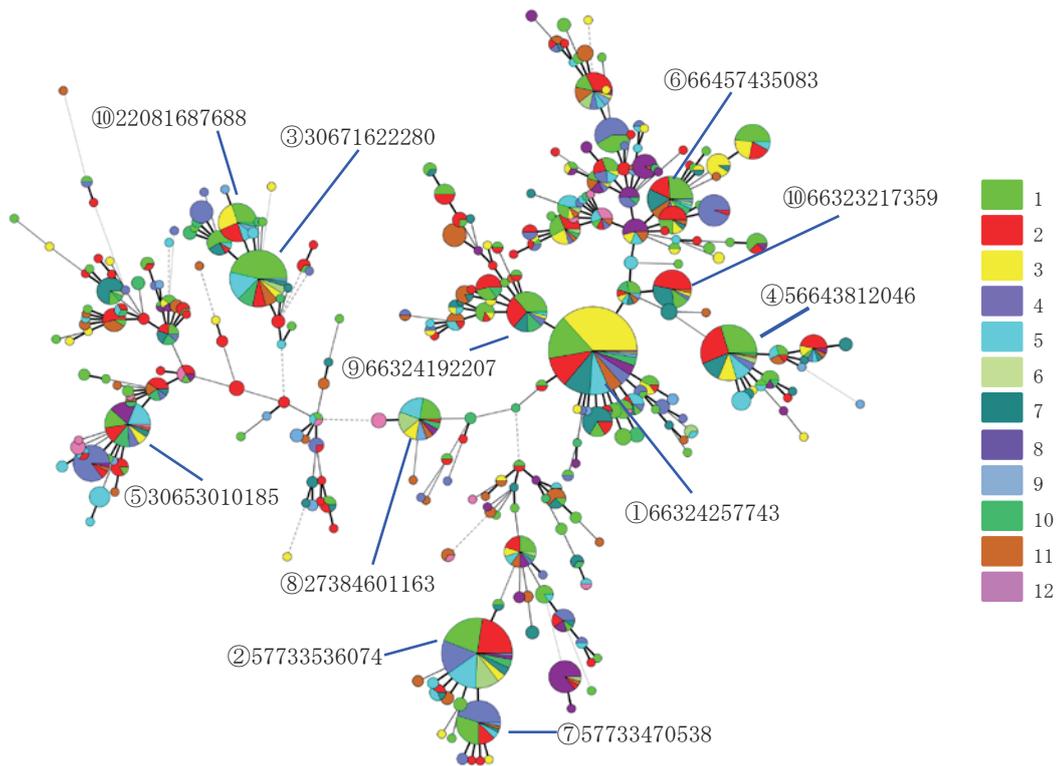


図1.1 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree (地域別)

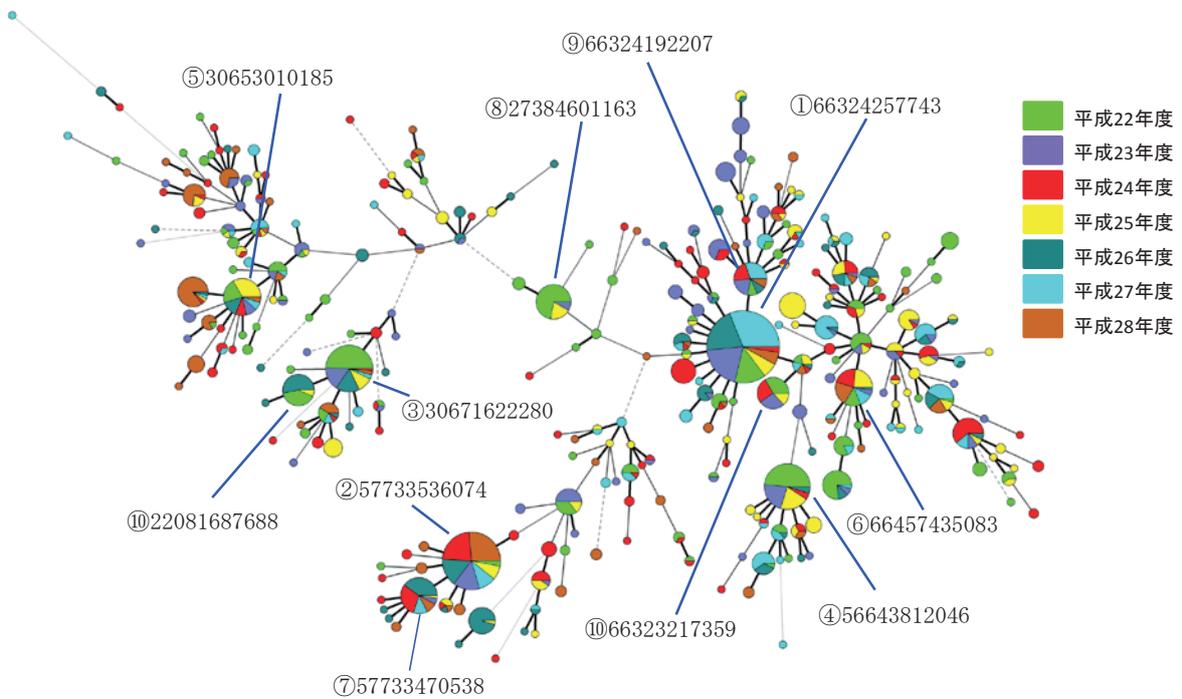


図1.2 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4 平成28年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

| 地衛研 | O血清型別の分離菌株数 | | | | | | | | | | | | | | | | | 計 |
|-----|-------------|-----|------|------|------|-----|------|------|------|---------|------|----|----|------|------|----|-----|-----|
| | 0157 | 026 | 0111 | 0103 | 0121 | 091 | 0145 | 0183 | 0115 | 0128abc | 0152 | 04 | 05 | 0119 | 0165 | 01 | OUT | |
| 1 | 29 | 57 | 3 | | | 2 | | | | | | | 1 | | | | 1 | 93 |
| 2 | 33 | 7 | 1 | 2 | 4 | 3 | | 1 | | | 2 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 57 |
| 3 | 10 | 1 | | 2 | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | 15 |
| 4 | 72 | 15 | | 3 | | | | | 2 | | | | 1 | | | | | 93 |
| 5 | 25 | 40 | 9 | 2 | 3 | 1 | | | | 1 | | | | | | | 1 | 82 |
| 6 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 7 | 31 | 16 | 1 | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | 53 |
| 8 | 4 | 11 | | 2 | 1 | | | | 1 | 2 | | | | | | | 1 | 22 |
| 9 | 3 | 2 | | | | | 3 | | | | | | | | | | | 8 |
| 10 | 1 | 2 | | | | | | | | | | | | | | 1 | | 4 |
| 11 | 14 | 10 | 4 | 3 | | | | | | | | | | | | | 2 | 33 |
| 12 | 3 | 3 | | | | | 3 | | | | | | | | | | | 9 |
| 合計 | 227 | 164 | 18 | 17 | 9 | 6 | 6 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 8 | 471 |

表5 平成28年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例

| 地衛研 | O血清型別のEHEC集団発生事例数 | | | | |
|-----|-------------------|---------|--|-----|---------|
| | 0157 | (発生場所) | | 026 | (発生場所) |
| 1 | | | | 1 | 保育所 |
| 2 | 1 | 保育所 | | | |
| | 1 | 学童保育所 | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | 1 | 保育所 | | 1 | 保育所 |
| 5 | | | | 2 | 保育所 |
| 6 | | | | | |
| 7 | 1 | 幼稚園及び家庭 | | 2 | 保育所及び家庭 |
| | 1 | 保育所 | | | |
| 8 | | | | | |
| 9 | | | | | |
| 10 | | | | | |
| 11 | | | | | |
| 12 | | | | | |
| 合計 | 5 | | | 6 | |

- 菌株A
 - 正解 12/12地衛研

- 菌株B、C、D
 - (1本のエクストラバンド有り)
 - 正解 9/12地衛研

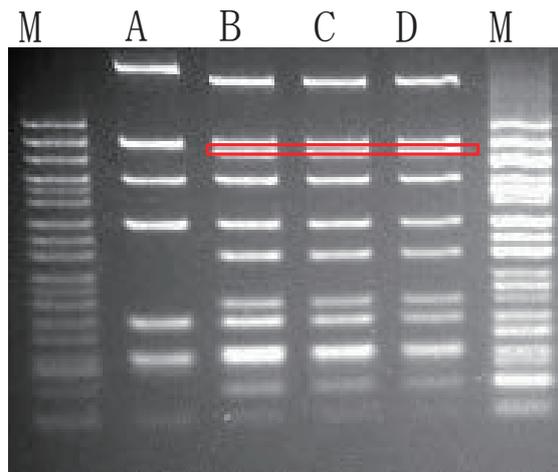


図2.1 ISPSの結果

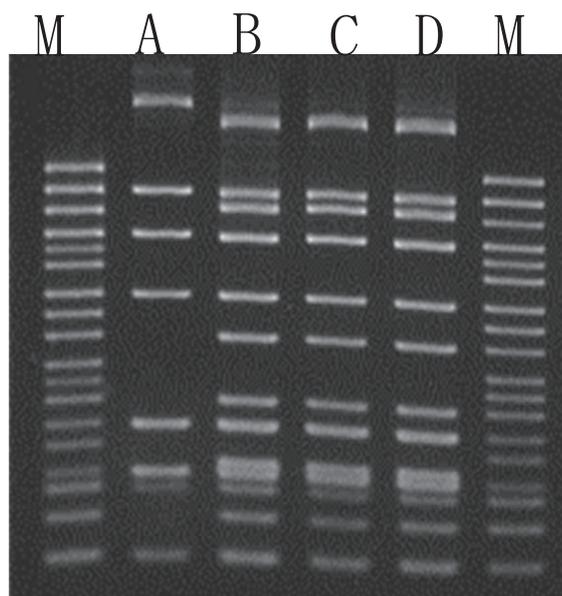


図2.2 ISPSの結果

エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に分離できなかった例

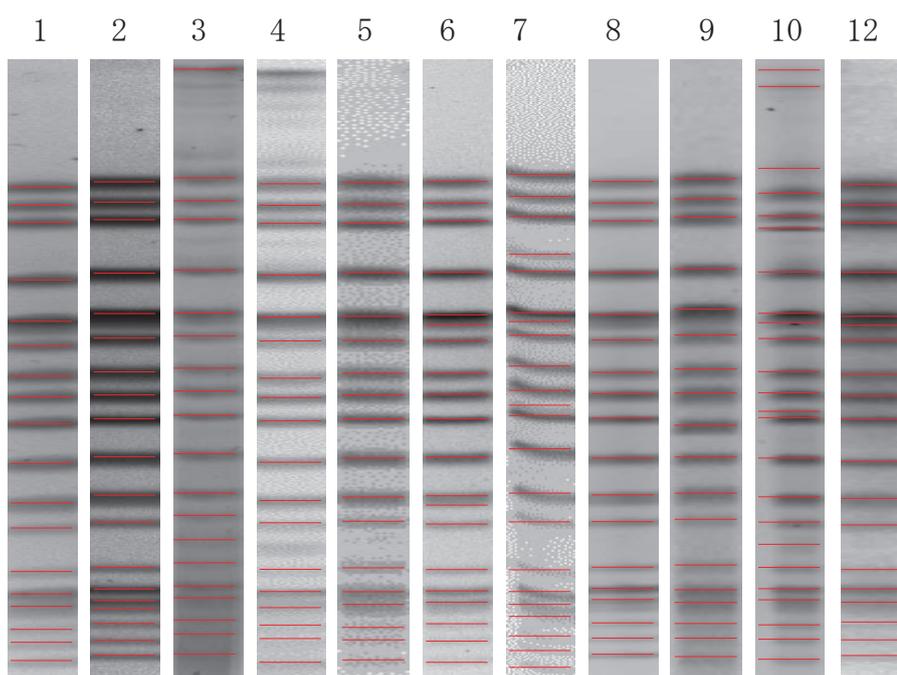


図3.1 PFGEの結果 (菌株A)

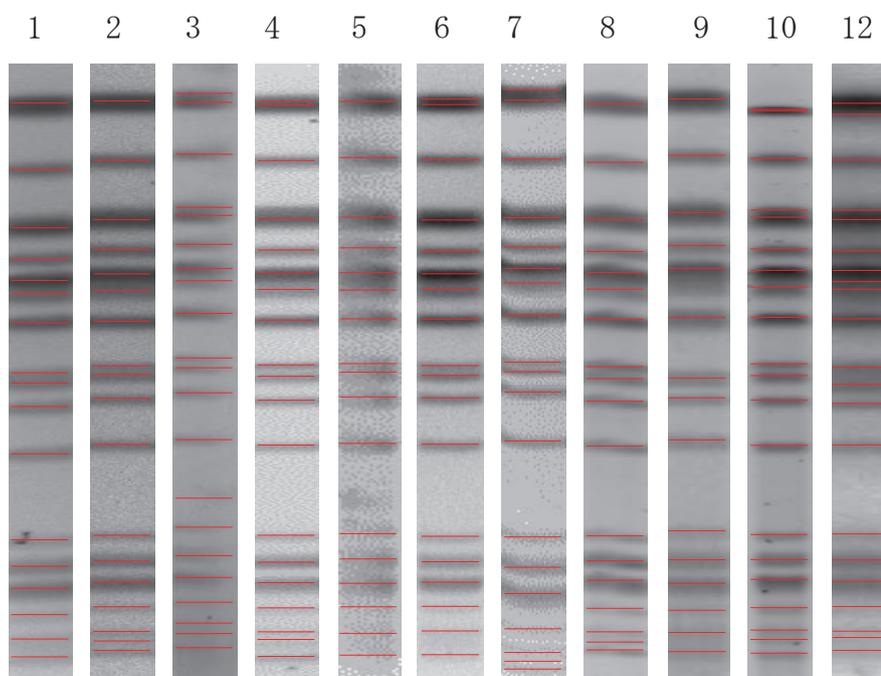


図3.2 PFGEの結果 (菌株B)

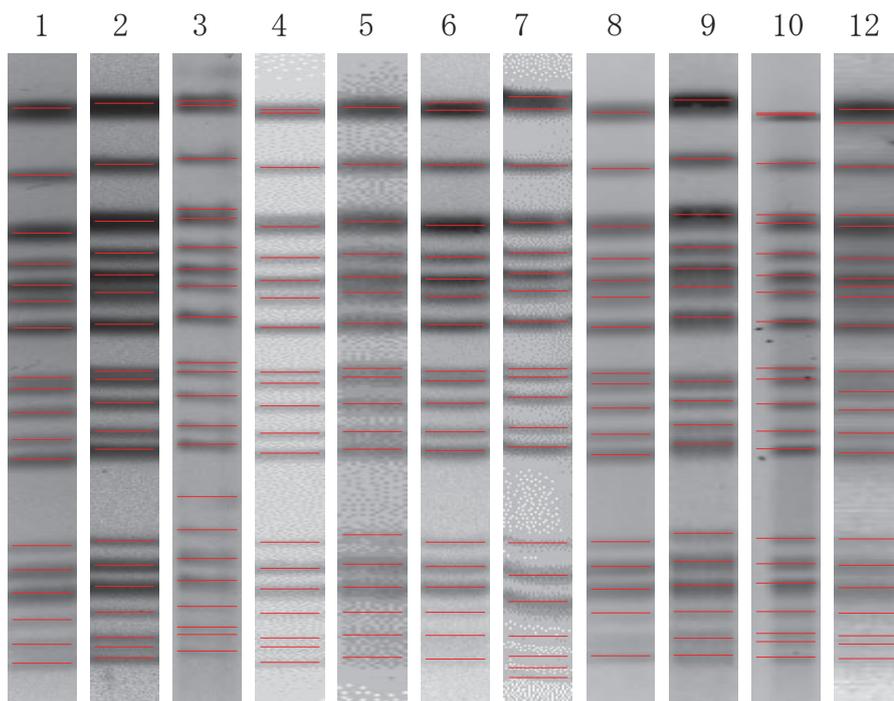


図3.3 PFGEの結果（菌株C）

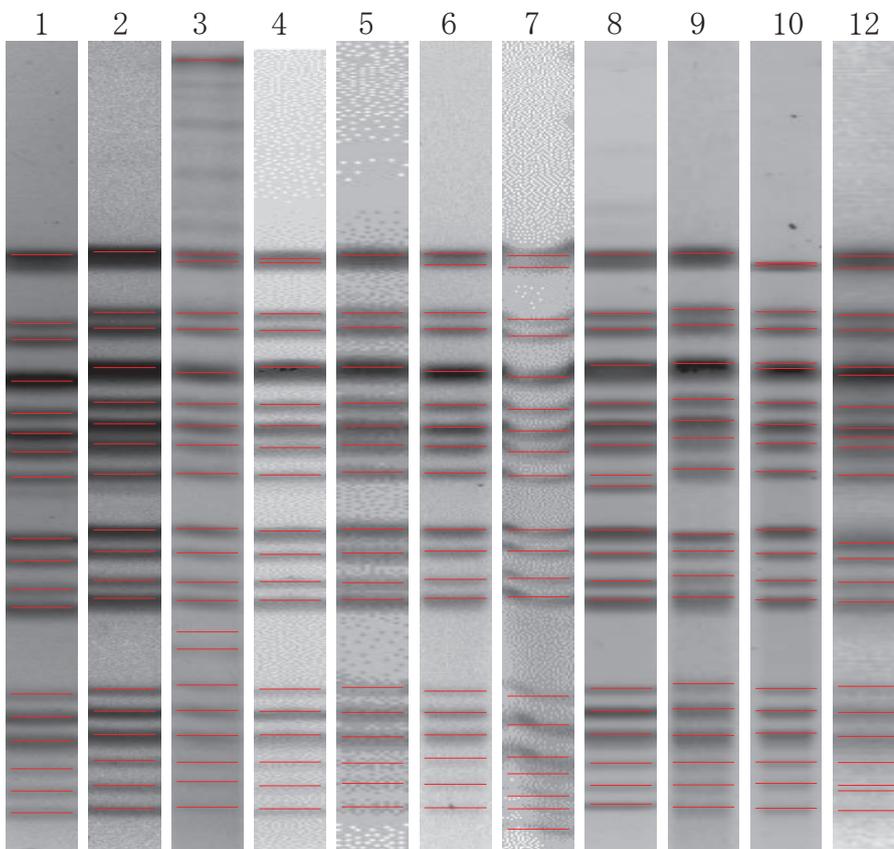
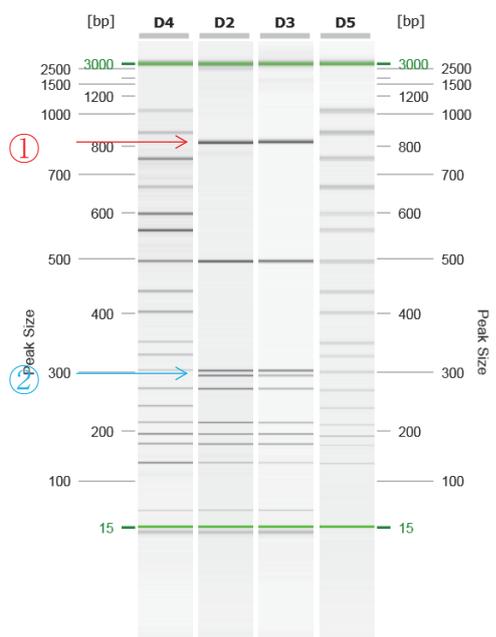


図3.4 PFGEの結果（菌株D）

表6 PFGEの結果 (バンド数)

| 地衛研 | 菌株 | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 菌株A | 菌株B | 菌株C | 菌株D |
| 1 | 18 | 17 | 18 | 18 |
| 2 | 19 | 18 | 19 | 18 |
| 3 | 20 | 21 | 22 | 22 |
| 4 | 18 | 19 | 20 | 19 |
| 5 | 18 | 17 | 18 | 18 |
| 6 | 20 | 18 | 19 | 19 |
| 7 | 22 | 19 | 20 | 20 |
| 8 | 18 | 18 | 17 | 19 |
| 9 | 18 | 15 | 17 | 18 |
| 10 | 24 | 20 | 21 | 20 |
| 12 | 19 | 21 | 22 | 22 |

• 泳動像



• 方法

- 使用機器：QIAxcel
- 泳動条件
 - QIAxcel DNA High Resolution Kit
 - method OM2100

• 結果

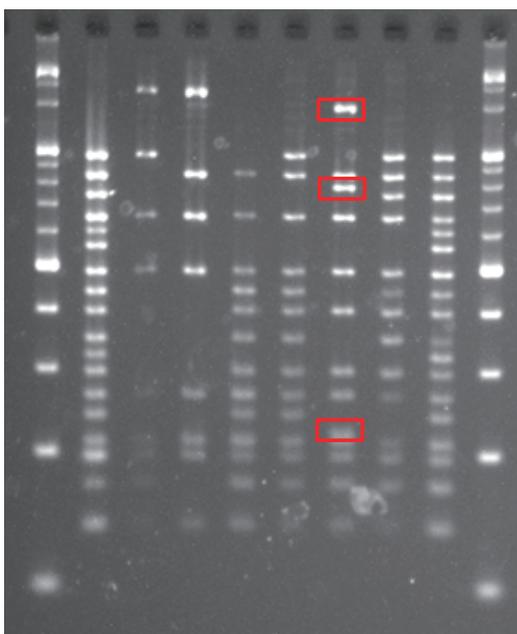
- エキストラバンドの位置
 - ①1-02と1-03の間
 - ②1-12のバンドの下
- 型名 (感染研DB)
 - MLVA Type 16m0169
 - MLVA Comp 16c027
- 判定表 (次ページに従って1/0標記)
 - Set1: 000000100001101111
 - Set2: 011100000011101010

• 備考 (コメント・注意点等)

同じMLVA Compで1000 bp以上のエキストラバンドがある株や②がない株も存在する。

図4.1 ISPSのエキストラバンド情報

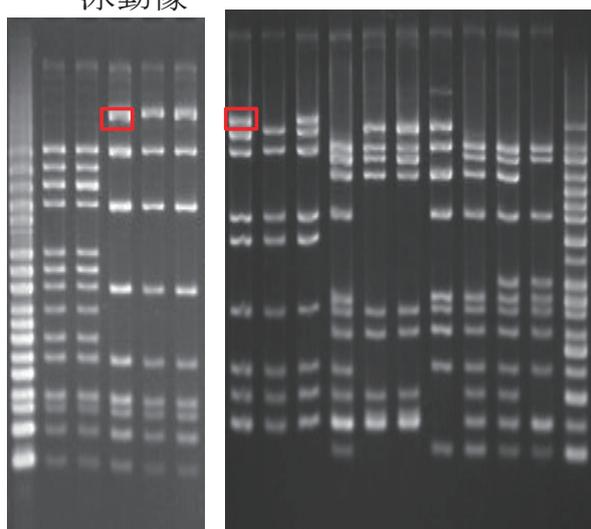
- 泳動像



- 方法
 - 使用機器：Mupid-exu
 - 泳動条件
 - ゲル濃度：3%
 - 電圧：100V
 - 泳動時間：99分
 - 泳動温度：室温（26度前後）
- 結果
 - エキストラバンドの位置
 - 1-01の上
 - 1-02と03の間
 - 1-14と15の間
 - 判定表
 - Set1: 010100101001101111
 - Set2: 110100100011101011
- 菌株情報
 - 2016年・20160610

図4.2 ISPSのエキストラバンド情報

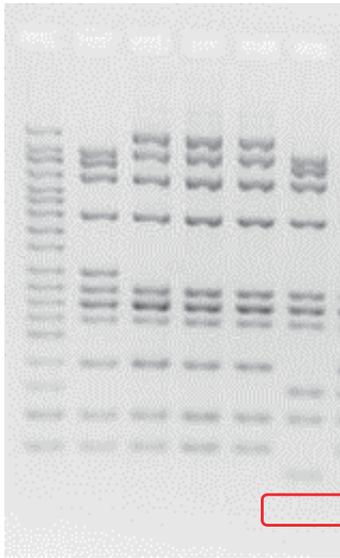
- 泳動像



- 方法
 - 使用機器：M u p i d
 - 泳動条件
 - 3%アガロースゲル
 - 100 v
 - 65分
 - 泳動温度
- 結果
 - エキストラバンドの位置
 - 1-01の上
 - 2-01の上
 - 型名 e590
 - 判定表
 - Set1: 100100001000101111
 - Set2: 110000110001001110
- 菌株情報
 - 平成21年分離 21-7

図4.3 ISPSのエキストラバンド情報

- 泳動像



- 方法
使用機器：Mupid-2plus
泳動条件：
ゲル濃度：3%
泳動条件：50V, 40分+100V, 65分
- 結果
エキストラバンドの位置
2-stx1の下
判定表
1st：111100111101111101
2nd：011100100011100110
- 菌株情報
分離年：2016年、NPH-STEC-1216

図4.4 ISPSのエキストラバンド情報

表7 IS-printingエキストラバンドの出現位置と報告数

| エキストラバンドの位置 | 報告株数 | 報告地衛研数 |
|-------------|------|--------|
| 1-02と1-03の間 | 10 | 5 |
| 1-14と1-15の間 | 5 | 3 |
| 1-12と1-13の間 | 1 | 1 |
| 1-01の上 | 20 | 3 |
| 2-01の上 | 1 | 1 |
| 2-stx1の下 | 1 | 1 |

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの
構築に関する研究」

平成 28 年度研究分担報告書

ロタウイルスの RNA-PAGE 泳動パターンによる流行株分類法の検討

研究分担者 片山和彦・藤井克樹 北里大学生命科学研究所・国立感染症研究所

研究要旨

ロタウイルス（RV）は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。RV 感染患者の便検体から抽出した RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動（RNA-PAGE）すると、その分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することが可能である。この泳動パターンは遺伝子型や株によって異なるため、検体間のウイルスの類似性を推定する事も可能である。我々の保有する検体を用いて、RNA-PAGE のバンドパターンとそれらの遺伝子型との関連性について検討を行ったところ、VP2、VP3、VP6、VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP5 の各遺伝子分節において遺伝子型とバンドパターンに明確な関連性が認められた。本研究では、島津社製マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA の RNA-PAGE によるパターン分類プログラムを開発して、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築する。本年度は、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA による標準株泳動パターンを蓄積し、RNA-PAGE 泳動パターンを標準株と相関係数を用いて比較し、判定するプログラム構築を行った。

A. 研究目的

ロタウイルス (RV) は乳幼児の重症胃腸炎の最大の原因であり、我が国における年間の患者数は 70-80 万人、入院数は 7-8 万人におよぶと推定されている。時に腎炎や腸重積、脳炎・脳症などの重篤な合併症を引き起こすこともあり、年間数人から 10 人前後の患者が、RV が原因で命を落としている。また、RV は教育施設や老人施設などで集団感染を引き起こす事も多く、食中毒の原因として検出される事例も散見されており、公衆衛生上も問題視されている。

RV はコア、内殻、外殻の三層構造を有するウイルスであり、そのゲノムは 11 分節からなる二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) で構成されている。RV のゲノムは非常に多様性が高く、11 本の遺伝子分節それぞれに多数の遺伝子型が存在している。実際にヒトの間で流行している RV 株も地域や時期によって大きく異なる事があり、非常に多彩な様相を呈している。ウイルス株の遺伝子型を記載する場合には、11 分節の遺伝子型を VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5 (Gx - P[x] - Ix - Rx - Cx - Mx - Ax - Nx - Tx - Ex - Hx) の順に羅列する方法が取られているが、それぞれの株の遺伝子型を全て決定するには多大な労力と時間を要する。従って、RV の流行株を詳細に幅広く把握するのは容易ではない。

地研などの検査室では、RV の検出法としては ELISA 法や RT-PCR 法およびシーケンス解析を行うことが通例となっているが、RV 研究者の間では、ポリアクリルアミドゲル電気

泳動 (RNA-PAGE) によりウイルスゲノムを直接検出できる事がよく知られている。RV 感染患者の便 1g には 10 の 10 乗~12 乗もの大量のウイルス粒子が存在している為、便検体から抽出した RNA について RNA-PAGE を行うと 11 本の遺伝子分節に由来するバンドを容易に検出できる。しかも、そのバンドパターンは遺伝子型の違い或いは僅かな塩基配列の違いにより泳動度が異なって現れる。これまでの研究により、RNA-PAGE とマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA の比較検討を行い、MultiNA による株判別が可能であることを示した。本年度は、MultiNA による標準 RV 株の RNA-PAGE パターン蓄積を実施するとともに、検体のバンドパターンを標準株のバンドパターンの相関値を算出し、それを用いて株判別を行うプログラムの開発を行った。

B. 研究方法

本実験には、共同研究者より提供されたユニークな RNA-PAGE パターンを示したロタウイルス陽性便検体を用いた。便検体から 10% PBS 懸濁液を調製し、TRIzol® LS Reagent (Life technologies) および Direct-zol RNA MiniPrep Kit (ZYMO Research) を使用してウイルス RNA の抽出を行った。マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA における泳動は、DNA500 ポリマーキットを用いて行った。得られたバンドパターンの画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積を行った。すべての検体について、次世代シーケンスシステムを用いたウイルスゲノムの塩基配列解析を行い、

遺伝子型を決定してパターンライブラリーに蓄積した。相関値の算出は、泳動パターンの長鎖部分（上部）、中鎖部分（中部）、短鎖部分（下部）に分け、electrophoregram のフィッティング処理を行った後、その相関係数をそれぞれ算出した。

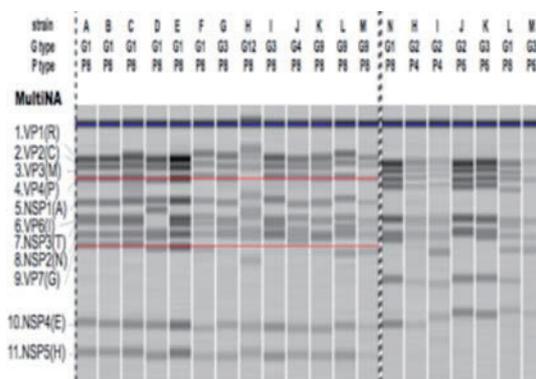
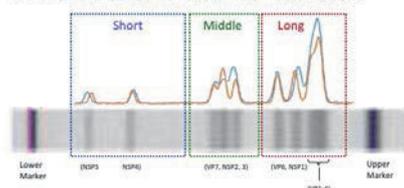
C. 研究結果および考察

RV のゲノムはサイズの大きいものから順に VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp)、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp)、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) の順番で MultiNA によるパターンとして検出された（サイズは株により異なるため、およその値で示した）。MultiNA では、VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp) は上部に近接したバンド群として、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp) は中部に近接したバンド群として、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) は下部に互いに独立した 2 本のバンドとして検出された（図 1）。そこで、この特長を生かし、上部、中部、下部の 3 箇所に分けて、相対移動度だけでは無く、画像と electrophoregram（泳動波形とピーク位置が示されたグラフ）の蓄積を行った（図 2-1, -2）。

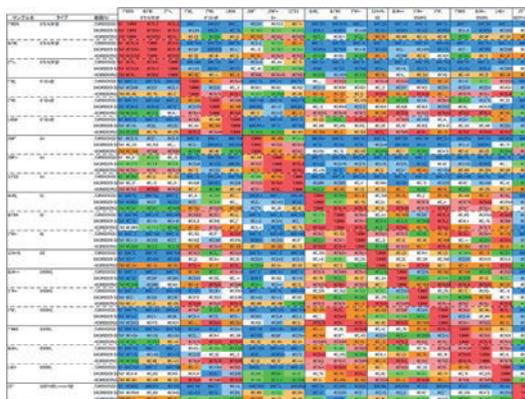
Fitting Process

- The wave is divided into three regions (short, middle and long regions).
- The weighted average of correlation factors of three regions is calculated and used as the **similarity index**.

$$\text{Similarity index} = [(\text{CF}(s) \times 1) + (\text{CF}(m) \times 1.5) + (\text{CF}(l) \times 0.5)] / 3$$



MultiNA による相対移動度は、時にアッセイ間差が株間差を上回る場合があり、RV 株の中には相対移動度で分別できない株を経験した。そこで、画像と electrophoregram（泳動波形とピーク位置が示されたグラフ）の蓄積データを基盤として、上部、中部、下部の electrophoregram を互いにフィッティングさせることで、その相関係数を算出した。



上記表（図 3）には、一致度が高い法から低い方に赤色から青色へのグラデーションでカラ

ーリングを施した。左上部から右下部にかけての対角線上に暖色系（特に赤の頻度が高い）ことが分かる。つまり、同じサンプルは、アッセイ間変動が多少存在しても高い相関係数を示した。逆に、異なる株は寒色系（青色）の頻度が高くなる。

次に、実際の疫学調査で得られた検体をこの解析方法で解析し、蓄積した標準株と照合することでタイピングを行った(図4)。

Trial of rotavirus typing system using MultiNA

- MultiNAおよびPAGEの遺伝子型別検出率

| Genotype | No. of Samples | Detection rates | |
|----------|----------------|-----------------|----------|
| | | MultiNA | PAGE |
| Total | 100 | 73 (73%) | 78 (78%) |
| G1(Wa) | 34 | 27 (79%) | 29 (85%) |
| G1(D5-1) | 28 | 18 (64%) | 20 (71%) |
| G2 | 10 | 8 (80%) | 8 (80%) |
| G3 | 3 | 3 (100%) | 2 (67%) |
| G9 | 25 | 17 (68%) | 19 (76%) |

- MultiNAの検出感度はPAGEと同程度

全 100 検体のロタウイルス陽性サンプルは、全ゲノム塩基配列を次世代シーケンサーによってあらかじめ決定した。このシーケンスデータの基づきあらかじめ遺伝子型を決定した。MultiNA と PAGE の検出率は、シーケンスデータに基づいて決定された遺伝子型との一致率を示す。図4の結果から、MultiNAによる遺伝子型分類正解率は、RNA-PAGEよりも若干劣っていた。しかし、RNA-PAGEでは、PAGEのアッセイ間比較が非常に困難である事、ラボ間比較はほぼ不可能に近いことを考慮すると、これらを全て On line で可能とする MultiNA を用いた株判定システムの正解率は、十分に実用化できるレベルであると評価できる。特に、GP タイピングで G1P[8] と判定される DS-1 like G1P[8] の判定的中率が 60% を超えて

いるのは、高く評価できる。また、本システムの場合、標準株、既報の株に一致しないパターン、つまり新しい遺伝子型の可能性がある場合、Not assigned (NA) と表示されるため、新型の流行をいち早く感知できるメリットがある。また、A 群ロタウイルスだけではなく、それ以外の B 群、C 群と他ウイルスに対しても、理論上判定が可能であるというメリットがある。

このようにして、MultiNA による electrophoregram データを用いて、互いにフィッティングを行い、相関係数を指標にすることで、株分けを行うソフトウェア開発に成功した。来年度は、ベータバージョンを GatVirusWeb に搭載し、関西地区の MultiNA を保有する衛生研究所の協力を受け、プレランテストを実行する予定である。

E. 結論

MultiNA は、アッセイ間変動、チップ間変動、施設間変動がわずかし生じず、RNA-PAGE との比較においても、良好な成績を示した。Electrophoregram のフィッティングと、相関係数を指標にする株分別法は、異なる施設間における結果も安定しており、ベータバージョンでのプレランに値する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文)

1. Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiol Immunol* 60, 609-616, 2016.
2. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, and Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, 2016. *Genome Announcements*, vol. 4 (5) e01099-16, 2016.
3. Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld enable murine norovirus to internalize into host cells. *PNAS* 2016 Oct 11;113(41):E6248-E6255.
4. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep.* 2016 Jul 7;6:29400. doi: 10.1038/srep29400.
5. Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan. DOI; 10.7883/yoken. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Jun 30. [Epub ahead of print]
6. Suzuki Y, Doan H. Y., Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K. Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan. *Microbiol and Immunol.* 60, 418-426, 2016.
7. Doan HY, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon-Tanaka N, and Katayama K. Genetic analysis of human rotavirus C: the appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries. *Infect Genet Evol.* 2016 Apr 9;41:160-173. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.027. [Epub ahead of print]
8. Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T,

Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Infect Genet Evol. 2016 Mar;38:90-5. doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.013. Epub 2015 Dec 18.

9. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. PLoS One. 2015 Nov 5;10(11):e0141739. doi: 10.1371/journal.pone.0141739. eCollection 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
「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」
平成 28 年度研究分担報告書

“GatVirusWeb” ウェブサイトの構築

研究分担者 三瀬敬治 札幌医科大学

研究要旨

ロタウイルス遺伝子データベースおよび遺伝子型判定システムを CaliciWeb に加え、新たに GatVirusWeb として運用するべく Web site の構築、維持、開発を行う。具体的には、これまで運用してきたカリシウイルスデータベース&配列検索システムに、NoroNet norovirus genotyping system へのリンクを加え、さらにロタウイルスでは、RNA-PAGE によるパターン分類をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA に適応させ、MultiNA 泳動パターンフィッティング解析によって算出される相関係数を用いた株分類法の搭載準備を進めた。本年度は過去三年間で倍増したデータに対応し、今後搭載されるロタウイルスのパターンフィッティングソフトウェアへの対応へも対応するため、サーバー環境の刷新を行った。

A. 研究目的

世界3大データベース上に登録された下痢症ウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスなど）の塩基配列データは膨大な数に上り、ユーザーが研究目的に応じて必要な配列を見つけ出すために、かなりの努力を要する。そこで、オートパイロットシステムにより、毎日登録される下痢症ウイルスの塩基配列データをアップロードしつつ、我が国内部から自由にアクセス可能な下痢症ウイルスに特化したサブデータベースを構築し、インターフェースの改良を行いつつ維持管理を行う。さらに、新規に開発される下痢症ウイルス遺伝子型分類ツールを搭載し、我が国の研究者が自由に使用して型分類を行い、ワクチン導入後の疫学調査に資することのできるウェブサイトを構築することを目的とする。本年度は過去三年間で倍増したデータに対応し、今後搭載されるロタウイルスのパターンフィッティングソフトウェアへの対応へも対応するため、サーバー環境の刷新を行う。

B. 研究方法

ウイルス第二部第一室の分担研究者より提案された案件のウェブサイトへの搭載を行い、テストドライブにてパブリックベータ版をユーザーに評価させる。実際のユーザーからのリクエストをウェブサイトに併設している掲示板を通じて入手し、リクエストを反映させつつウェブサイトの充実

を図る。さらに、現状のユーザーを把握するため、アクセスモニターを施行し、利用状況に応じたウェブ管理、改変を実施する。

C. 研究結果および考察

今年度の活動結果を以下に箇条書きにまとめた。

① ウイルスデータベース登録数、

| 登録 | 総 | 数 |
|-----------|------------|-----------|
| | 46,216 | |
| | 62,648 | 97,035 |
| Norovirus | 16,696 | |
| | 20,192 | 31,272 |
| Sapovirus | 2,543 | |
| | 3,094 | 3,911 |
| Lagovirus | 994 | |
| | 1,154 | 1,557 |
| Vesivirus | 1,442 | |
| | 1,485 | 1,672 |
| Rotavirus | 25,891 | |
| | 38,023 | 58,623 |
| | 2013年1月29日 | 2014年6月2日 |
| | 2016年1月10日 | |

- ・ 3年間で約2倍に増加。
- ・ 登録されたデータのうち、重複するものがあつたため、確認の上削除。重複登録データは約2000（重複の原因はDDBJの不具合によるものも含む）

② OS (Ubuntu Linux) の大幅バージョンアップによる GatVirusWeb 不具合への対応（新サーバへの移行を含む）

- ・ 2016年7月にサーバのOSとして

利用している Ubuntu Linux のバージョンアップにより、GatVirusWeb のシステムに大幅な不具合、一部データーの消失などに対応

- ・ GatVirusWeb 上で電気泳動画像の解析の可能性を図るため、Linux のみではなく Windows サーバ同時に稼働する仮想複数サーバ導入に向け作業中（現在作業中）

③ リンク集に NoroNet (<http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet>) とのリンクを作成。これによって GatVirusWeb と情報の国際的相互利用が可能となった。

④ 系統樹作成支援サービスの動作安定性を確認、インターフェースなどを整備し、公開した。

1. 検索条件での最小塩基配列数と最大塩基配列数による絞り込み条件の変更。これまで 0～、100～、250～、500～、1000～、2000～、3000～、5000bp～の大ざっぱな検索条件であったものを、0～、50～、100～、200～、、、と 100bp 単位で、1000bp 以上のデータも 1000bp 単位で絞り込みを可能とした。

2. ウイルスデータベースのデータ保存方法の変更

これまでは、データベースへ登録されるデータは、accession ナンバー、塩基配列数など、最小限にとどめ、実際の塩基配列データを

表示するには、その都度 DDBJ からデータをダウンロードしてきた。これによって、サーバの CPU、ディスク容量負荷の減少を可能としていた。今年度から、登録データはすべて GatVirusWeb のサーバにダウンロードして保存したものを利用する方式に変更した。新しく登録されたデータのダウンロードは、毎日、新規登録データをチェックする際、同時にダウンロードおよび保存されるようにプログラムを変更した。この変更によって塩基配列データ表示のためのデータ転送のボトルネックが解消され、④-3 に示す、大量のデータ表示も可能となった。

3. ウイルスデータベースの検索結果から一度に複数の塩基配列を表示されるシステムを実装、公開した。

これまでウイルスデータベースの検索結果では、個々の accession ナンバーをクリックすることによって、DDBJ に登録されたデータを表示することが可能であった。実際にこのデータは複数の標準とされる塩基配列と比較することによってはじめて意味のあるものとなる。このため、Select のチェックボックスで複数選択し、続けて Get_sequences ボタンをクリックすることで、必

要な塩基配列を同時にすべて入手可能となるようにプログラムを変更した。これは④-2の「ウイルスデータベースのデータ保存方法の変更」によってはじめて可能となったものである。

なし

- ⑤ ロタウイルスの MultiNA チップ型自動電気泳動装置を用いた全ゲノムセグメント遺伝子型分別システムを構築に成功し、プログラムソフトウェアのウェブ搭載、地研とのネットワークシステムによる簡便な遺伝子型分別のテストランを開始した。
- ⑥ 電気泳動画像データのオンライン解析の可能性を検討開始。

E. 結論

下痢症ウイルス塩基配列データベースの環境整備とサーバー環境の大幅な改良により、操作性が増したとともに、データキャパシティの大幅なアップを達成した。NoroNet とのリンクにより、Norovirus typing tool の利用が可能となった。ロタウイルスの MultiNA チップ型自動電気泳動装置を用いた全ゲノムセグメント遺伝子型分別システムを構築に成功し、プログラムソフトウェアのウェブ搭載、地研とのネットワークシステムによる簡便な遺伝子型分別のテストランを開始した。

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

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 28 年度)

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|---------------------------|---------|-------------|------|
| Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H. | Molecular epidemiology of <i>Vibrio cholerae</i> O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. | J Med Microbiol. | 65(9) | 1007-12 | 2016 |
| Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T | Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> . | Front Microbiol. | 7 | 765 | 2016 |
| Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K. | Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. | Microbiol Immunol. | 60 | 609-616 | 2016 |
| Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, and Shimizu H. | Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, 2016. | Genome Announcements. | 4(5) | e01099-16 | 2016 |
| Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K. | Functional receptor molecules CD3001f and CD3001d enable murine norovirus to internalize into host cells. | Proc Natl Acad Sci U S A. | 113(41) | E6248-E6255 | 2016 |

| | | | | | |
|--|---|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| <p>Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H.</p> | <p>Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II.</p> | <p>Sci Rep.</p> | <p>6</p> | <p>29400</p> | <p>2016</p> |
| <p>Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T.</p> | <p>Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan.</p> | <p>Jpn J Infect Dis.</p> | <p>[Epub ahead of print]</p> | <p>DOI; 10.7883/y oken.</p> | <p>2016</p> |
| <p>Suzuki Y, Doan H. Y., Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K.</p> | <p>Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan.</p> | <p>Microbiol and Immunol.</p> | <p>60</p> | <p>418-426</p> | <p>2016</p> |
| <p>Doan HY, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon-Tanaka N, and Katayama K.</p> | <p>Genetic analysis of human rotavirus C: the appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries.</p> | <p>Infect Genet Evol.</p> | <p>41</p> | <p>160-173</p> | <p>2016</p> |

| | | | | | |
|--|---|----------|----|---------|------|
| 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真 | 2015年に分離された腸管出血性大腸菌 0157、026 および 0111 株の MLVA 解析について | IASR | 37 | 93-95 | 2016 |
| 泉谷秀昌、黒木俊郎、林賢一、齊藤志保子、八柳潤、今野貴之、大西真 | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar 4:b:-株の解析 | 日本感染症学雑誌 | 90 | 652-656 | 2016 |
| 勢戸和子、原田哲也、田口真澄、河原隆二、久米田裕子、田邊純子、福田弘美、中村寛海、松原弘明、泉谷秀昌 | 近畿の飲食チェーン店で発生した食中毒が疑われる腸管出血性大腸菌 0157 事例 | IASR | 37 | 89-90 | 2016 |