

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 29 年度 総括・研究分担報告書
及び

平成 27～29 年度 総合研究報告書

(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 30(2018)年 4 月

目次

1. 平成 29 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 29 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

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	15		
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	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	

(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	23	
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
	阿部正太郎	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上 剛志	青森県環境保健センター
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	鈴木 裕	山形県衛生研究所
	木村 葉子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	森 直子	仙台市衛生研究所
	三瓶 歩	福島県衛生研究所
	青木 順子	新潟県保健環境科学研究所
	菊池 綾子	新潟市衛生環境研究所

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

関東ブロックにおける腸管出血性大腸菌の解析及び共有化システムの構築に関する研究…… 31

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	山城 彩花	茨城県衛生研究所
	中野 剛志	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	佐藤 孝志	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
	政岡 知佳	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
	森主 博貴	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精度管理および情報共有に関する研究…………… 50

研究分担者	松本 昌門	愛知県衛生研究所
研究協力者	山田 和弘	愛知県衛生研究所
	木全 恵子	富山県衛生研究所
	木村恵梨子	石川県保健環境センター
	岩崎 理美	福井県衛生研究所
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	野田万希子	岐阜県保健環境研究所
	信田 充弘	岐阜市衛生試験所
	永井 佑樹	三重県保健環境研究所
	山本 新也	豊橋市保健所衛生試験所
	中根 千鶴	岡崎市総合検査センター
	多和田光紀	豊田市衛生試験所

(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…………… 55

研究分担者	勢戸 和子	大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
研究協力者	河合 高生	大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
	若林 友騎	大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
	原田 哲也	大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
	河原 隆二	大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター
	井上 英耶	滋賀県衛生科学センター
	梅原 成子	滋賀県衛生科学センター
	藤本 直樹	京都府保健環境研究所
	大石 剛史	京都府保健環境研究所
	武田 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
	中川 力	京都市衛生環境研究所
	荻田 堅一	兵庫県立健康生活科学研究所
	坂野 桂	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
	平垣内雅規	尼崎市衛生研究所
	中村 寛海	大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター
	福田 弘美	堺市衛生研究所
	下迫 純子	堺市衛生研究所
	田邊 純子	奈良県保健研究センター
	佐伯美由紀	奈良県保健研究センター
	西山 貴士	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
	岩下さくら	和歌山県環境衛生研究センター

(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…………… 66

研究分担者	河合 央博	岡山県環境保健センター
研究協力者	大友 麗	鳥取県衛生環境研究所
	福間 藍子	島根県保健環境科学研究所

酒井 智健	島根県保健環境科学研究所
平塚 貴大	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
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
園部 祥代	愛媛県立衛生環境研究所
阿部 祐樹	愛媛県立衛生環境研究所
高木 春佳	高知県衛生研究所
戸梶 彰彦	高知県衛生研究所
狩屋 英明	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
中嶋 洋	岡山県環境保健センター

b) 島根県で分離された腸管出血性大腸菌 O26 の分子疫学的解析…………… 85

研究協力者	福間 藍子	島根県保健環境科学研究所
	酒井 智健	島根県保健環境科学研究所

c) 腸管出血性大腸菌O26の分子疫学的解析…………… 88

研究協力者	平塚 貴大	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

d) 2013～2017年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌O26 : H11(VT1産生)株の分子疫学的解析…………… 93

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

e) 2017年に発生した腸管出血性大腸菌O157、O26におけるMLVA解析結果の

迅速な還元を試み..... 99

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

(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

及び精度管理 (PFGE及びISPS) — 106

研究分担者	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
研究協力者	阿部 有利	福岡市保健環境研究所
	有川 衣美	北九州市保健環境研究所
	緒方美奈子	佐賀県衛生薬業センター
	高木由美香	長崎県環境保健研究センター
	小嶋 裕子	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
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
	小原 敦美	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
	江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
	中山 志幸	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	122
	研究分担者	片山 和彦 北里大学生命科学研究所
	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	128
	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 29 年度)	132

平成 29 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 29 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、感染源を究明し、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 (ISPS) 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。現在地方衛生研究所 (地衛研) において最も活用されている方法は ISPS であった。精度管理の実施から判定に影響するエキストラバンドの存在が明らかとなった。判定補助のため、エキストラバンド泳動像に係る情報をハンドブックとしてとりまとめた。MLVA については、3 年前に比べて実施する地衛研が多少増加傾向にあった。上記 3 手法からの病原体情報は、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、CaliciWeb 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 万件超のデータを収集、DDBJ 等データバンクからのサブデータバンクを構築した。NoroNet へのリンクを通じて Norovirus typing tool の活用を可能とした。ロタウイルス RNA-PAGE による新規解析法、自動判定ソフトウェアを開発した。同システムをウェブ上で稼働させる MultiNAWeb を構築した。

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)

松本昌門 (愛知県衛生研究所)

勢戸和子 (大阪健康安全基盤研究所)

河合央博 (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 (ISPS) の精度管理を継続した。b) 平成 21 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 ISPS オンラインデータベースに関しては、平成 23 年度

より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、サーバーの改修、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。平成 29 年度はさらに 0103、0121、0145、0165、091 の 5 血清群を追加した。f) PFGE、ISPS、MLVA 法で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 ;

研究協力者の所有するロタウイルス陽性便検体を用いて MultiNA とバンドパターンによる流行株分類法を検証した。検体は、A 地域より 22 検体、B 地域より 9 検体、C 地域より 20 検体の合計 51 検体を用いて β テストランを行った。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を昨年度構築したソフトウェアに転送し、型判別を行った。

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。世界 3 大遺伝子データベース (NCBI、EMBL、DDBJ) 上に登録された下痢症ウイルスの塩基配列に関するサブデータバンクをサーバー内部に構築し、システムの改善を図る。新規に開発されるロタウイルス遺伝子型分類ソフトウェアを搭載する。

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。2017 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 1581 株、026 686 株、0111 122 株について MLVA 法を用いて解析し、それぞれ、581、243、49 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 201 (35%)、026 で 92 (38%)、0111 で 16 (33%) であった。本年は上記 3 血清群のほか 0103、0121、0145、0165、091 の 5 血清群 303 株を解析し 132 のタイプが同定された。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 714 株であった。当該コンプレックスは 0157 11 種類、026 2 種類、0121 2 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 7 種類、0103、0121、0145 で各 1 種類であった。PFGE は 313 株を解析し、0146、0115 などにおいて一部集団事例を含むクラスターが観察された。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。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックでは、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 菌株を用いた IS-Printing System (TOYOB0) 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。平成 29 年度は関東を中心とする EHEC 0157 VT2 タイプによる事例が広域に発生し、ブロック内でも患者発生が確認された。北海道・東北・新潟ブロック内での情報共有化システム構築のための基礎的検討として、平成 29 年度に各県で分離された EHEC 0157 VT2 タイプの菌株の IS-Printing System の結果を集積し、発生パターンを調査した。また、秋田県内で発生した EHEC 0157 事例について、ISPS による解析結果の情報共有により、行政関係機関との連携体制が構築できた。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

腸管出血性大腸菌 0157 共通菌株を用いて PFGE 法、ISPS の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。いずれの施設も良好な成績ではあったが、PFGE 法では画像が若干不鮮明なもの、ISPS ではエキストラバンドの報告が無いものがあつた。今年度から希望参加の形で MLVA 法の精度管理も実施し、8 施設の参加があつた。結果はいずれも良好な成績であつた。

地方衛生研究所全国協議会で作成した腸

管出血性大腸菌 MLVA ハンドブックについて、執筆協力を行った。また、当該協議会で実施した MLVA 法技術研修会へ、講師あるいは研修生として参加し、MLVA 法の普及を目指した。

アンケート調査を実施した結果、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。

【病原体情報の疫学調査への活用事例の報告（以下、追加事例報告等）：横浜市、千葉県、埼玉県】

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 10 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所）に対して、1. ISPS 精度管理、2. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

1) ISPS 精度管理

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

2) 地域共有データベース

4 月から運用開始され、腸管出血性大腸菌シーズンをカバーすることができた。平成

29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

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

6. 中国四国ブロック

食品由来感染症の広域発生事例が発生した場合、各地域の事例間の関連性を明らかにするためには、事例由来株の分子疫学解

析結果等を共有し、比較・解析を行うことが有用となる。その際、各地域の施設が実施した分子疫学解析結果を用いて解析等を行うため、各施設における分子疫学解析手法の技術維持や解析精度の向上が不可欠かつ重要となる。そこで、中四国ブロック内の施設を対象に、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 菌株を用いた ISPS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。その結果、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では検査法の改良や判定方法を含めた技術の習熟が必要と思われた。

平成 29 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、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し解析した結果、同一の分子疫学解析結果である感染事例が複数の県で確認されたが、いずれの事例間でも関連は不明であった。

分子疫学解析結果を用いた広域な菌株データベースの構築は、広域事例発生の迅速な探知、さらには感染源の究明、感染拡大防止対策の構築等、事例への対応に有益なものとなると考えられる。データベースをさらに有意義に活用するためには、分子疫学解析技術の維持や精度の向上はもちろんであるが、疫学情報をいかに収集し、データベースに組み込むかが今後の課題と思われる。

【追加事例報告等：島根県、広島県、広島市、山口県】

7. 九州ブロック

九州地区では、1. ISPS による IS 型別データベースの運用、2. EHEC 検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約及び 4. 精度管理 (PFGE 及び ISPS) の 4 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」という。) の IS 型別の登録数は平成 30 年 2 月 14 日現在で 1731 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、平成 28 年度 199 件及び平成 29 年度 128 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移していたが、平成 29 年度は 0157EHEC の検出数が少なかったため減少した。九州地区で平成 29 年度に収集された EHEC は 397 株であった。その内訳は、0157EHEC が 156 株、026 EHEC が 119 株、0111 EHEC が 40 株、0103 EHEC が 32 株、0121 EHEC が 13 株、091 EHEC が 7 株、0115 EHEC が 7 株、その他の血清型が 11 株及び血清型別不能が 12 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率 60.7% 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 29 年度の 0157EHEC 及び非 0157EHEC による集団発生事例は 13 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 4 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 PFGE 及び ISPS について実施した。PFGE の精度管理において、泳動は概ね良好に行われており、対象菌株の関連性は参加した 11 地研全てにおいて一致した。ISPS の精度管理では、エキストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。また、PFGE 及び ISPS の両方において、菌株を輸送中又は保存中に変異したと考えられる事案が発生した。今後、精度管理に使用する菌株をより慎重に選定する必要があると考えられた。

8. ブロックアンケート結果

EHEC の分子疫学解析手法 PFGE、ISPS 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 83% で、このうち (ほぼ) 全株試験している地衛研は 15% であった。同様に、ISPS 実施率は 83% (うち全株試験は 61%)、MLVA 実施率は 20% (うち全株試験は 38%) であった。回答総数が 68 から 81 となり、各手法において若干の増減が見られた。MLVA 法は実施率でも実施機関数でも若干の増加が見られた (それぞれ 15→20%、10→16 機関)。

9. ISPS エキストラバンド集

EHEC 0157 の ISPS においてはエキストラバンドが判定に影響を与えることがある。各ブロックでの精度管理試験においてもエキストラバンドによって異なる判定結果を得ることが明らかとなった。各ブロック研究分担者および研究協力者からエキストラバンドに係る泳動像を収集し、「腸管出血性大腸菌 0157 IS-printing system エキストラバンド集」を作成した。本ハンドブックは 113 の泳動像を含む。

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、昨年度に完成を見たマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA によるロタウイルス遺伝子型判定プログラムの β テストを実施した。

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&配列検索システムを新サーバーシステムに移行した。これにより、NoroNet norovirus genotyping system へのリンク追加後の、データ量の急増と操作速度向上を実現した。さらにロタウイルスでは、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ソフトの搭載を実現し、本システムの β テストを開始した。

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 掲示板等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。報告には焼肉店や飲食店による事例等も含まれた。また 8 月に O157 VT2 株 (17c013) の流行が見られ、ポテトサラダに関連した集団事例もこれに含まれた。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つ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 O157 の解析において ISPS 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。ISPS について泳動像の判定精度を向上・維持するため、エキストラバンド集を作成した。今後本ハンドブックが活用されエキストラバンドに関する理解と結果判定の安定化につながることが期待される。

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 ISPS と同様、結果がデジタル形式なので情報共有がしやすい。平成 29 年 11 月の食品衛生分科会では EHEC 解析手法として MLVA が取り上げられた。本研究のアンケートでも MLVA の実施率には上昇が見られた。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 は迅速かつ簡便な新規解析システムである。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およびラボ間アッセイを可能にした。泳動パターンの解析ソフトウェアを開発し、基準泳動パターンをデータベースに登録することで実用レベルの正答率を実現した。

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 の構築を進めた。世界 3 大データベースから下痢症ウイルスに関する塩基配列データを

自動取得し、サブデータベースを構築するシステムを開発した。2017年12月現在10万以上のデータを収集した。NoroNetとのリンクを通じて収集した遺伝子配列の解析も可能とした。

上記ロタウイルスRNA-PAGE法による解析システムをウェブ上に構築しMiltiNA Webとしてβテストを行った。本システムの稼働により、ロタウイルスワクチン導入による流行型の変化等の調査に資することが期待される。

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、ISPS、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、データベースの環境整備、操作性の向上、データキャパシティの大幅な上昇を達成した。NoroNetとのリンクにより、Norovirus typing toolの利用が可能となった。

ロタウイルス解析システムを実装し、

MultiNA Webとしてβテストを開始した。当該ロタウイルス株分別法は、異なる施設間における結果も安定している。異なる地域で流行しているロタウイルスが同じか異なるかを、泳動パターンをサーバーに送るだけである程度判別可能となった。ハードルの高かったロタウイルスの全ゲノムセグメントを対象とした分子疫学の底上げにつながる。また、今まで検出不可能であった食中毒事件の原因に成り得るC群ロタウイルスの検出と鑑別にも対応可能な本システムの有用性は高い。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1. Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Taku Wakui, Taichiro Ishige, Masaki Nakamura : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 subclade 8b strains in Chiba Prefecture, Japan, produced larger amounts of Shiga toxin 2 than strains in subclade 8a and other clades. PLOS ONE. 2018. 13(1): e0191834.
2. Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato MP, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, Maeda E, Piérard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee KI, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T: Population structure of *Escherichia coli* O26 : H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple

- lineages. *Microbial Genomics* 2017, 3.
3. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、伊豫田淳、大西真：2016年に分離された腸管出血性大腸菌0157、026および0111株のMLVA法による解析。IASR、第38巻、100-101、2017年5月
 4. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：腸管出血性大腸菌 non-0157/026/0111広域感染事例の分子疫学解析、2016年。IASR、第38巻、101-102、2017年5月
 5. 李謙一、石原朋子、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真：全ゲノム配列解析を用いた腸管出血性大腸菌の分子疫学解析。化学療法の領域、第33巻第7号、1467-1471、2017年7月
 6. 上野詩歩子、黒岩祥子、若松倫子、熊本サチ子、永岡貴美子、長岡章次、寺松孝二、畔野征子、梅崎みどり、吉田まり子、松尾美智代、濱崎光宏、中山志幸、世良暢之；保育所で発生した腸管出血性大腸菌026：H11による集団感染事例-福岡県。病原微生物検出情報 2017, 38: 148-149.
 7. 吉田弘、高橋雅輝、濱崎光宏、山下育孝、四宮博人、山下照夫、皆川洋子、岸本剛、調恒明；エンテロウイルス検査の信頼性確保について。病原微生物検出情報 2017, 38: 199-200.
 8. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Onishi K, Katayama K, Kimura H. Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016-2017. *Front. Microbiol.*, 18 January 2018 doi: 10.3389/fmicb.2018.00001. eCollection 2018.
 9. Motoya T, Nagasawa K, Matsushima Y, Nagata N, Ryo A, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Morita Y, Suzuki Y, Sasaki N, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII. 4 Variants in 1974-2015. *Front Microbiol.* 2017 Dec 5;8:2399.
 10. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17. *Emerg Infect Dis.* 2018 Jan;24(1):144-148.
 11. Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. *Infect Genet Evol.* 2017 Nov;55:209-217.

12. Utsumi T, Lusida MI, Dinana Z, Wahyuni RM, Yamani LN, Juniastuti, Soetjipto, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Kimura H, Katayama K, Shoji I. Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia. *Infect Genet Evol.* 2017 Nov;55:1-7.
 13. Doan YH, Suzuki Y, Fujii Y, Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Someya Y, Nayak MK, Mukherjee A, Imamura D, Shinoda S, Chawla-Sarkar M, Katayama K. Complex reassortment events of unusual G9P[4] rotavirus strains in India between 2011 and 2013. *Infect Genet Evol.* 2017 Oct;54:417-428.
 14. Kitamoto T, Takai-Todaka R, Kato A, Kanamori K, Takagi H, Yoshida K, Katayama K, Nakanishi A. Viral population changes during murine norovirus propagation in RAW 264.7 cells *Front Microbiol.* 2017 Jun 15;8:1091.
 15. Kondo K, Tsugawa T, Ono M, Ohara T, Fujibayashi S, Tahara Y, Kubo N, Nakata S, Higashidate Y, Fujii Y, Katayama K, Yoto Y, Tsutsumi H. Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jun;23(6):968-972.
 16. Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara M, Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004-2015. *Front Microbiol.* 2017 Apr 25;8:705.
- 2) 学会発表等**
1. Hiroaki Shigemura, Koichi Murakami, Tamie Noda, Mari Matsui, Satowa, Suzuki, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Nobuyuki Sera; Decrease in extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* from chicken meats in Japan. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2017)、15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Singapore)
 2. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2016年における腸管出血性大腸菌 0157・026・0111 の分子疫学解析。第38回日本食品微生物学会学術総会、2017年10月、徳島県徳島市。
 3. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA 解析について。平成29年度 地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2017年10月、東京都。
 4. 平井晋一郎、横山栄二、涌井拓、石毛太一郎、中村正樹、蜂巢友嗣、遠藤幸男、村上覚史：腸管出血性大腸菌 0157 の subclade 8b における高病原性菌株について。第38回 日本食品微生物学会学術総会 (2017)
 5. 小西典子、畠山薫、原田幸子、神門幸

- 大, 尾畑浩魅, 赤瀬悟, 森功次, 門間千枝, 平井昭彦, 甲斐明美, 貞升健志: 遡り調査で明らかとなった VT2f 産生 *Escherichia albertii* による集団事例と散発事例からの検出状況, 第 21 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2017, 鹿児島県
6. 勢戸和子, 原田哲也, 若林友騎, 伊豫田淳: EHEC 0165 選択分離培地の検討. 第 21 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2017 年 11 月, 鹿児島)
 7. 濱崎光宏, 市原祥子, 中山志幸, 世良暢之, 吉田弘; 環境水中の腸管系ウイルス量と感染症発生動向調査事業における患者報告数との関連について. 第 76 回日本公衆衛生学会総会 (2018 年 10 月, 鹿児島県)
 8. 吉田弘, 滝澤剛則, 小澤広規, 高橋雅輝, 筒井理華, 中田恵子, 濱崎光宏, 世良暢之, 堀田千恵美; 環境サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題. 第 76 回日本公衆衛生学会総会 (2018 年 10 月, 鹿児島県)
 9. 江藤良樹, 重村洋明, 世良暢之; 原因不明食中毒疑い事例の患者糞便からの多殻目粘液胞子虫遺伝子の検出状況について. 第 38 回日本食品微生物学会学術総会 (2017 年 10 月, 徳島県)
 10. カール由起, 重村洋明, 中山志幸, 村上光一, 世良暢之; 肉用鶏、鶏肉及びヒトから分離した *Campylobacter jejuni* の薬剤耐性状況について 第 10 回日本カンピロバクター研究会総会 (2017 年 11 月, 宮崎県)
 11. 濱崎光宏, 中山志幸, 世良暢之, 上野詩歩子, 梅崎みどり; 保育所で発生した腸管出血性大腸菌 O26:H11 による集団感染事例-福岡県. 第 91 回日本細菌学会総会 (2018 年 3 月, 福岡県)
 12. 藤良樹, 濱崎光宏, 世良暢之; 福岡県で分離された稀な血清型の志賀毒素産生性大腸菌が保有する志賀毒素遺伝子の亜型について. 第 91 回日本細菌学会総会 (2018 年 3 月, 福岡県)
 13. カール由起, 重村洋明, 中山志幸, 大石明, 村上光一, 世良暢之; 福岡県における鶏肉及びヒトから分離した *Campylobacter jejuni* の薬剤耐性状況について 第 91 回日本細菌学会総会 (2018 年 3 月, 福岡県)

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

腸管出血性大腸菌 0157 IS-printing system エキストラバンド集 (2018 年 3 月作成)

【本体ファイルについてはお問い合わせください】

腸管出血性大腸菌 O157 IS-printing system エキストラバンド集

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
(平成 27-29 年度)

「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」班作成

はじめに

本資料は腸管出血性大腸菌 O157 菌株を IS-printing system で解析するにあたり、その判定に影響を与える可能性があるエキストラバンドにかかる泳動像をまとめたものです。

IS-printing system は、O157 ゲノム上にある IS 629 の分布を 2 種類のマルチプレックス PCR を用いて調べる試験です。上記 2 種類のプライマーセット (Set1 と Set2) を用い、下表に示す各セット 18 本のバンドが出るか (1) 出ないか (0) を判定します。

予想される大きさのバンド以外のものをエキストラバンドと称し、これらを真のバンドと誤って判定しないことは本試験にとって重要です。また、エキストラバンドによっては特定の株に特徴的なものもあり、泳動パターンから菌株の類似性を見るための指標となることもあります。

Set 1-	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
Size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137
判定*	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
Set 2-	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1
Size (bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0

(*判定欄は一例です。)

さまざまな泳動条件におけるエキストラバンドの泳動像を集めましたので、各機関での試験の際の参考にしていただければ幸いです。

本資料は、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」の一環として作成されました。泳動像の収集及び提供にご協力いただきました地方衛生研究所の諸先生方に深謝いたします。

平成 30 年 3 月 研究代表者 泉谷秀昌 (国立感染症研究所)
 細菌グループ研究分担者 熊谷優子 (秋田県健康環境センター)
 平井昭彦・甲斐明美 (東京都健康安全研究センター)
 松本昌門・鈴木匡弘 (愛知県衛生研究所)
 勢戸和子 (大阪健康安全基盤研究所)
 河合央博・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)

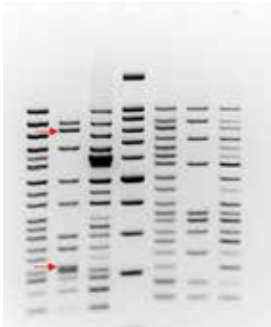
本資料の見方

エキストラバンドの出現位置に従って泳動像を並べてあります。

各ページの左上に出現位置

左に泳動像（矢印等でエキストラバンドを示してあります）

右には【方法】使用した機器、泳動条件、【結果】エキストラバンドの位置、感染研データベースによる IS パターンの型名（AA 番号）、判定結果（1/0 表記、エキストラバンドの示されたレーンの株。対となるセットの泳動像は示されておられません。）【備考】を示してあります。

タイトル（エキストラバンドの出現位置）	
（泳動像） 	方法 使用機器 泳動条件 結果 エキストラバンドの位置 IS パターンの型名 判定結果表 備考

平成 29 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	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。2017 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 1581 株、026 686 株、0111 122 株について MLVA 法を用いて解析し、それぞれ、581、243、49 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 201 (35%)、026 で 92 (38%)、0111 で 16 (33%) であった。本年は上記 3 血清群のほか 0103、0121、0145、0165、091 の 5 血清群 303 株を解析し 132 のタイプが同定された。解析した EHEC 株のうち、5 地研以上で検出された MLVA コМПレックスもしくはタイプに含まれる株は 714 株であった。当該コМПレックスは 0157 11 種類、026 2 種類、0121 2 種類であり、コМПレックスに含まれない広域タイプは 0157 で 7 種類、0103、0121、0145 で各 1 種類であった。PFGE は 313 株を解析し、0146、0115 などにおいて一部集団事例を含むクラスターが観察された。複数の地研で同一の MLVA 型を示す株、もしくはコМП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

生頻度の高い主要 3 血清群 (0157, 026, 0111) を対象に、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。本年はさらに血清群 0103、0121、0145、0165、091 (追加 5 血清群) についても MLVA 法を実施した。

B. 研究方法

平成 29 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。追加 5 血清群については上記 MLVA 法に 23 遺伝子座を追加した方法で実施した。

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 29 年分離株で平成 30 年 2 月 23 日におけるものである。)

1. PFGE

313 株を解析した。MLVA を実施した 8 血清群については、0157 23 株、026 7 株、0103 91 株、0121 19 株、0145 12 株、0165 2 株、091 14 株であった。上記以外の血清群 145 株のうち、菌株数が多かった血清群は 0146 21 株、0115 17 株であった。BN サーバーに結果を登録しクラスター解析を行った。0146 については 7-8 月にかけて中四国ブロックにおいてクラスターが見られた。0115 については 8 月に発生した集団事例株が含まれていた。

2. MLVA

EHEC 0157 1581 株、026 686 株、0111 122 株を MLVA で解析した。それぞれ、581、243、49 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 201 (35%)、026 で 92 (38%)、0111 で 16 (33%) であった。追加 5 血清群 305 株を解析し、132 のタイプが同定された。

3. 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 29 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 714 株であった。このうちコンプレックスは 15 種類 (0157 が 11 種類、026 が 2 種類、0121 が 2 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 10 種類 (0157 で 7 種類、0103、0121、0145 でそれぞれ 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 17c013、17c201、17c027、17c044、17c050 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、

17c013 は 8 月に発生した複数の集団事例関連株を含んでいた。

4. 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 NESFD に掲示版を利用して情報共有を行った。広域株については IS-printing system および PFGE 解析に関する病原体情報をブロック代表研究分担者より収集し、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)。平成 29 年度は NESFD 掲示版に掲載した「お知らせ」についても回覧し、情報共有を行った。

D. 考察

平成 26 年度から稼働し始めた EHEC 主要 3 血清群、並びに本年度から導入した追加 5 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。

2 株以上検出された MLVA タイプは全タイプの 35% であった。これは菌株数にして解析株の 76% に達する。これらは病原体情報から、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 24 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。

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. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、伊豫田淳、大西真：2016年に分離された腸管出血性大腸菌0157、026および0111株のMLVA法による解析。IASR、第38巻、100-101、2017年5月

2. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：腸管出血性大腸菌non-0157/026/0111広域感染事例の分子疫学解析、2016年。IASR、第38巻、101-102、2017年5月

3. 李謙一、石原朋子、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真：全ゲノム配列解析を用いた腸管出血性大腸菌の分子疫学解析。化学療法の領域、第33巻第7号、1467-1471、2017年7月

2) 学会発表等

泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2016年における腸管出血性大腸菌

0157・026・0111 の分子疫学解析。第 38 回
日本食品微生物学会学術総会、2017 年 10 月、
徳島県徳島市。

泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA 解析に
ついて。平成 29 年度 地域保健総合推進事
業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、
2017 年 10 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. 2017 年広域コンプレックス検出状況 (5 機関以上)

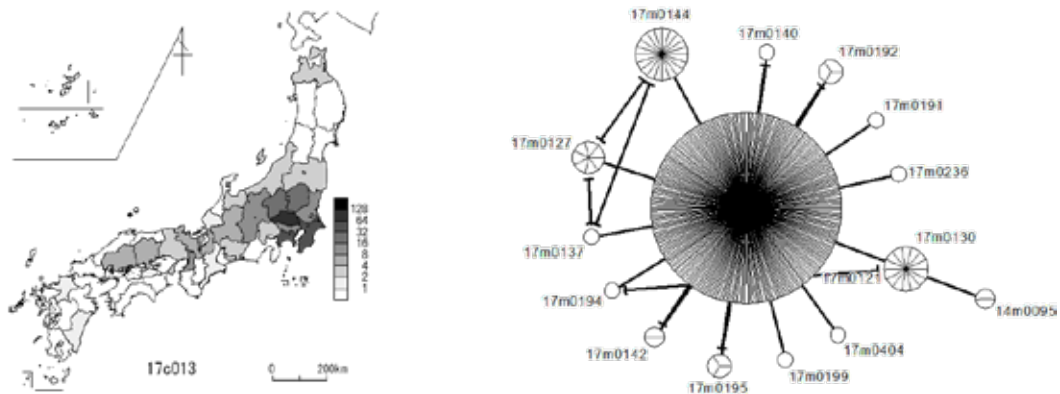
コンプレックス	株数	機関数	都道府県数	0 群	VT 型
17c013	313	36	25	0157	VT2
17c201	49	20	17	026	VT1
17c027	48	19	15	0157	VT1+VT2
17c049	47	5	4	0157	VT1+VT2
17c044	28	18	15	0157	VT1+VT2
17c028	24	7	6	0157	VT1+VT2
17c213	22	6	5	026	VT1
17c050	16	8	8	0157	VT1+VT2
17c025	15	6	6	0157	VT1+VT2
17c052	10	5	5	0157	VT1+VT2
17c503	9	5	4	0121	VT2
17c015	8	7	5	0157	VT1+VT2
17c008	7	5	3	0157	VT1+VT2
17c502	7	5	4	0121	VT2
17c021	5	5	4	0157	VT2

表 2. 2017 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)

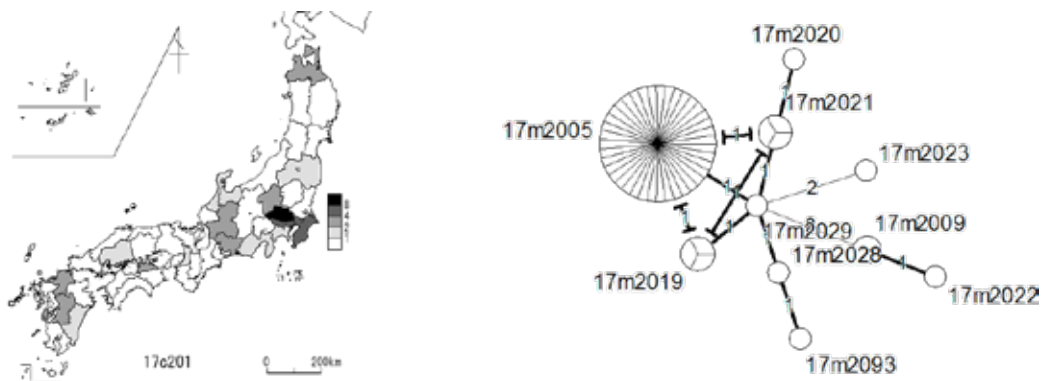
MLVA 型	株数	機関数	都道府県数	0 群	VT 型
13m0327	9	8	7	0157	VT2
17m0028	10	6	5	0157	VT2
17m0059	5	5	5	0157	VT1+VT2
17m0104	15	7	5	0157	VT1+VT2
17m0227	5	5	4	0157	VT1+VT2
17m0229	11	6	4	0157	VT1+VT2
17m0351	13	6	5	0157	VT1+VT2
16m4013	13	11	11	0103	VT1
17m5009	10	5	5	0121	VT2
16m6009	15	6	3	0145	VT2

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）

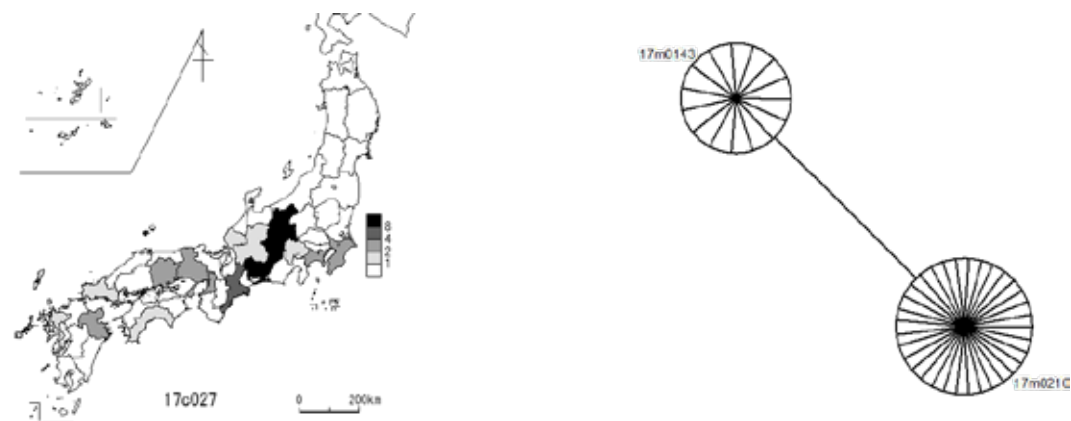
a) 17c013



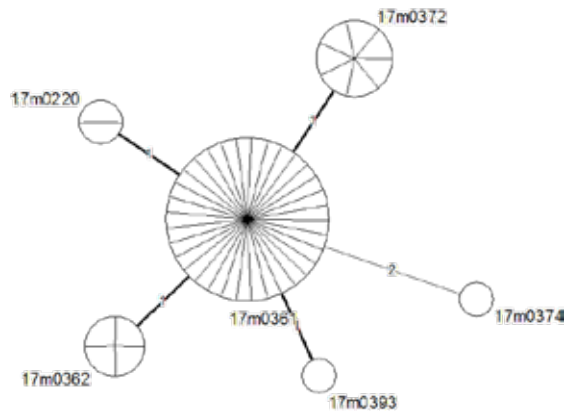
b) 17c201



c) 17c027



d) 17c049



e) 17c044

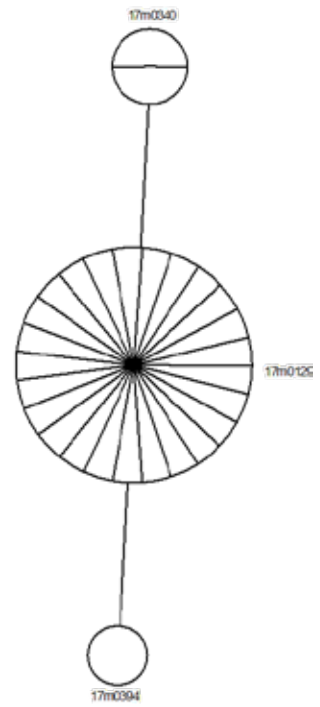
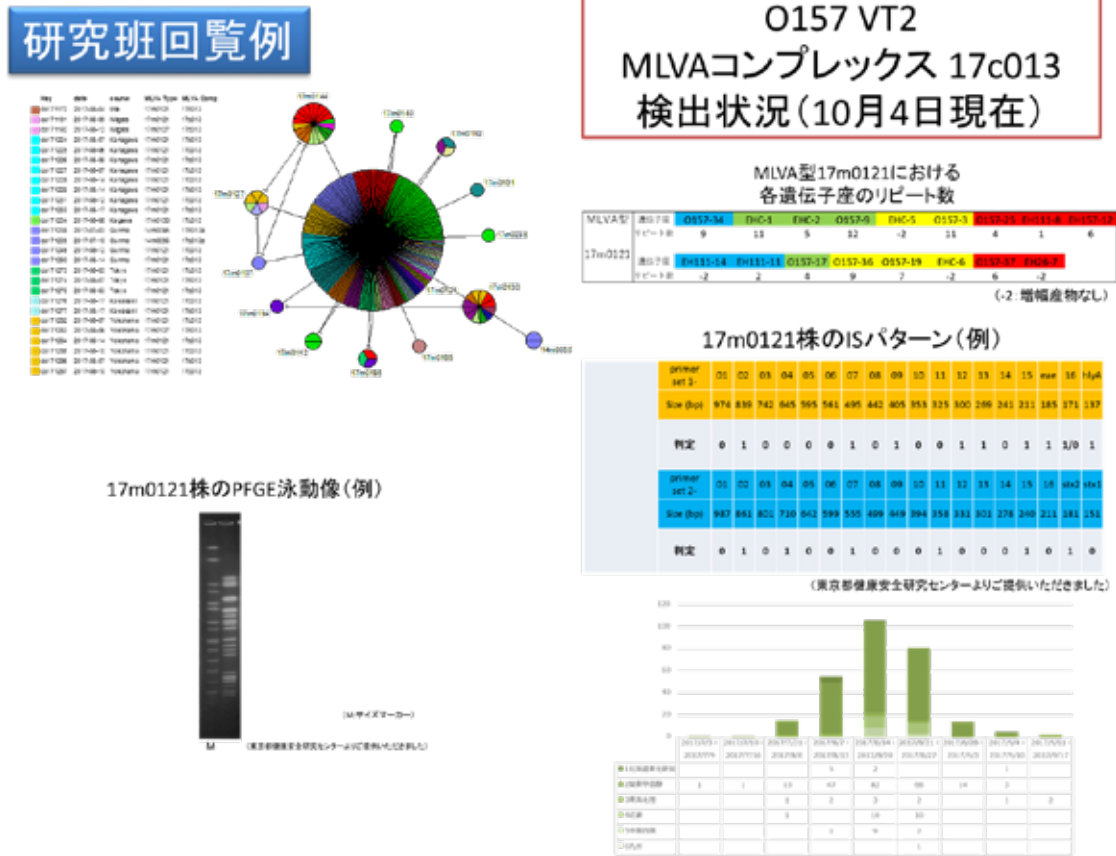


図 2. 広域株パルスネット回覧例 (左上：検出状況、MST、左下：PFGE 情報、右上：MLVA、IS-PS 情報、右下：ブロック別検出状況)



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

平成 29 年度 分担研究報告書

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
	阿部正太郎	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上 剛志	青森県環境保健センター
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	鈴木 裕	山形県衛生研究所
	木村 葉子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	森 直子	仙台市衛生研究所
	三瓶 歩	福島県衛生研究所
	青木 順子	新潟県保健環境科学研究所
	菊池 綾子	新潟市衛生環境研究所

研究要旨

北海道・東北・新潟ブロックでは、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 菌株を用いた IS-Printing System（TOYOBO）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。平成 29 年度は関東を中心とする EHEC O157 VT2 タイプによる事例が広域に発生し、ブロック内でも患者発生が確認された。北海道・東北・新潟ブロック内での情報共有化システム構築のための基礎的検討として、平成 29 年度に各県で分離された EHEC O157 VT2 タイプの菌株の IS-Printing System の結果を集積し、発生パターンを調査した。また、秋田県内で発生した EHEC O157 事例について、IS-Printing System による解析結果の情報共有により、行政関係機関との連携体制が構築できたので報告する。

A. 研究目的

広域的に流通する食品由来の病原体による食中毒・感染症事例では、原因病原体の検索のみならず、近年は分子疫学解析も迅速に行うことが求められてきている。

特に、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の分子疫学的解析法の一つである IS-Printing System は迅速性に優れ、従来の方法に比べ短時間で解析結果 (IS コード) が得られるため、北海道・東北・新潟ブロック内でも食中毒等の事例対応の検査に少しずつ活用され始めている。しかし、北海道・東北・新潟ブロックは他の地区ブロックに比べ事例数が少ないこともあり、IS-Printing System の利用は依頼があった事例のみなど、限られた一部の事例の解析で終わっている施設がほとんどである。

今年度、関東を中心とする広域に食中毒患者等が発生した事例対応を契機として、感染経路や原因食品を特定するためには、近隣の自治体との迅速な情報共有が重要であることが改めて示唆された。そこで、北海道・東北・新潟ブロック内における IS コードを共有化するシステム構築のため、共通菌株を用いた各施設の精度管理を実施するとともに、各県から今年度発生した EHEC O157 VT2 タイプの IS コードを集積し、北海道・東北・新潟ブロック内に患者発生がみられる菌株の発生状況の調査を行った。

秋田県においては、IS-Printing System のデータ活用について関係行政機関との情報共有の体制の構築に向けて、県内の保健所等の担当者向けに分子疫学

解析についての研修を行った。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた精度管理

1) 供試菌株配布

平成 29 年度に秋田県内で分離された EHEC O157 菌株 4 株を共通解析菌株とし、IS-Printing System (TOYOBO) の取扱説明書に従い DNA 溶液を作製し、ブロック内の地方衛生研究所 11 施設に配布した (表 1)。

2) IS-Printing System による解析

各施設で IS-Printing System を用いて、取扱説明書に従い解析を実施し、結果と画像の提出を求めた (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) (表 2)。

2. O157 VT2 タイプの IS コードの比較

北海道・東北・新潟ブロックの各施設から、平成 29 年度に分離された EHEC O157 VT2 タイプの IS コードを 5 株程度集約し、同一の IS コードを示す菌株を探索した。

3. 秋田県における IS コードの活用

秋田県内において事例発生時、できる限り迅速に解析を行い、IS コードを関係行政機関へ情報提供を行った。

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。配布した DNA 溶液の IS コードを示す (表 3)。菌株 No. 3 については、1st set 1-03 の判定結果が施設間で異なり、2 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を反映し、解析画像は若干異なっている。

2. ブロック内 O157 VT2 タイプ IS コード比較

北海道・東北・新潟ブロック内の各施設から計 35 株の EHEC O157 VT2 タイプ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 24 株の解析結果を比較した。24 株中 9 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 17 パターンに分類された。この内、6 施設一致が 1 パターンあり、この株は関東を中心に発生したタイプであった。また、3 施設一致が 1 パターンあったが、関連は不明であった。その他 15 株は他の施設とは一致しなかった。

3. 秋田県内における IS コードの活用

秋田県内においては、発生した事例の菌株が EHEC O157 と同定され、菌株が入手可能な場合、迅速に IS-Printing System による解析を行っている。結果を関係行政機関へ情報提供するにあたり、今年度は保健所等の食品衛生監視員を対象に EHEC の分子疫学的解析法に関して研修会を実施した。今後は、IS コードの一致が判明した時点で、所管の保健所へも連絡することになり、IS-Printing System の結果について疫学調査と照らし合わせ等による活用が期待される。

D. 考察

IS-Printing System の精度管理は、前年の検討でも、エキストラバンド判定により解析結果が不一致となっていたが、

平成 29 年度においても 4 株中 1 株において 1-02、1-03 間のエキストラバンドを 2 施設が (+) 判定した。解析画像をみると、電気泳動条件の違いもあるが、バンド位置がコントロールと少し差があり、電気泳動時間を調整し増幅産物のバンド間を十分分離することで、正しいバンド判定ができたものと思われる。各施設の検査精度向上のため、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。今年度の北海道・東北・新潟ブロックでは、担当者の変更も多くあった。マルチプレックス PCR による全てのバンドをシャープに撮影するためには、泳動するテンプレートの量の調整や希釈を行うなどの工夫も必要であり、技術の継承も今後の課題と思われる。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特徴あるものは共有化することが必要と思われる。

北海道・東北・新潟ブロック内の各施設で分離された EHEC O157 VT2 タイプの一部について広域患者発生菌株を探索したところ、2 種類の菌株で IS コードの一致が見られた。一つのパターンは、個人情報保護の観点から、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 3 施設一致、もう一つのパターンは、今年度関東を中心に発生した広域な患者発生を伴う食中毒や感染症の菌株で 6 施設の一一致であった。早期に国立感染症研究所よりこの広域事例由来菌株

の IS コードの情報を得ていたため各施設においても検出した菌株と比較し、早期探知が可能であったと思われる。秋田県の場合も行政機関へ県内発生事例との比較結果を情報提供していた。広域な事例の早期探知には、疫学的な調査の科学的な裏付けとして IS-Printing System は迅速で、大変有用と考えられる。

秋田県内で発生した複数保健所にまたがる事例の際も、IS-Printing System により迅速な情報を得て、早期に秋田県内の患者が同一感染源の患者である可能性を考慮することができた。その後の国立感染症研究所による MLVA の分子疫学解析の情報からも同一感染源の患者である可能性が確認されている。今後、行政機関とも連携を深め、迅速な情報提供に努めたい。

本研究の成果を踏まえ、今後の北海道・東北・新潟ブロック内での情報共有化システムの構築に向けては、一定の検査精度を保ち、さらに各施設の条件設定の確認と担当者変更時において技術の継承の必要があると考えられる。

E. 結論

北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所 11 施設における IS-Printing System の精度管理における解析結果は、1-02、1-03 間に出現したエキストラバンドについて判定で分かれた。しかし、概ね良好な解析結果であり、発生事例等について解析を続けて行うことによりデータの幅広い活用の仕方が各施設で構築できると考えられる。IS-Printing System は、広域にわたる事例発生時の病原体情報と

して迅速性と有用性が高いことから、今後も精度管理による検査技術の水準を保ち、データの精度を高め、地域行政に還元していく必要がある。

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 精度管理供試菌株

	菌株番号	分離年月日	由来	病原遺伝子
1	EC16810	2017.5.1	散発下痢症患者	VT1,2 eae
2	EC16831	2017.7.5	散発下痢症患者	VT2 eae
3	EC16851	2017.7.20	散発下痢症患者	VT1,2 eae
4	EC16950	2017.10.19	散発下痢症患者	VT2 eae

表 2 各施設使用PCR装置 及び 電気泳動条件

NO	使用PCR装置名	テンプレート量	泳動装置	泳動時間	備考
A	AB 2720 Thermal Cycler	1μ l	ADVANCE Mupid-α	70分	135V
B	TAKARA DiceR Touch	1μ l	QIAGEN QIAxcel		
C	AB Veriti	1μ l	Mupid-exU	1st60分 2nd45分	
D	AB Veriti 200	1μ l	i-MyRun.N	115分	
E	AB 9600	1μ l	Mupid-2plus	80分	
F	BIO-RAD My Cycler	2.5or0.5μ	Mupidミニゲル泳動槽	75分	
G	AB 2720 Thermal Cycler	1μ l	MS WideMini Horizontal MT-108	120分	
H	BIO-RAD PTC-0220	1μ l	Mupid-2plus	95分	
I	Bio-RAD iCycler	1μ l	Mupid-2plus	70分	
J	AB Veriti	1μ l	Mupid-exU	150分	100V
K	AB Veriti 96-Well (Veriti200)	1μ l	ADVANCE Mupid	79分	

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

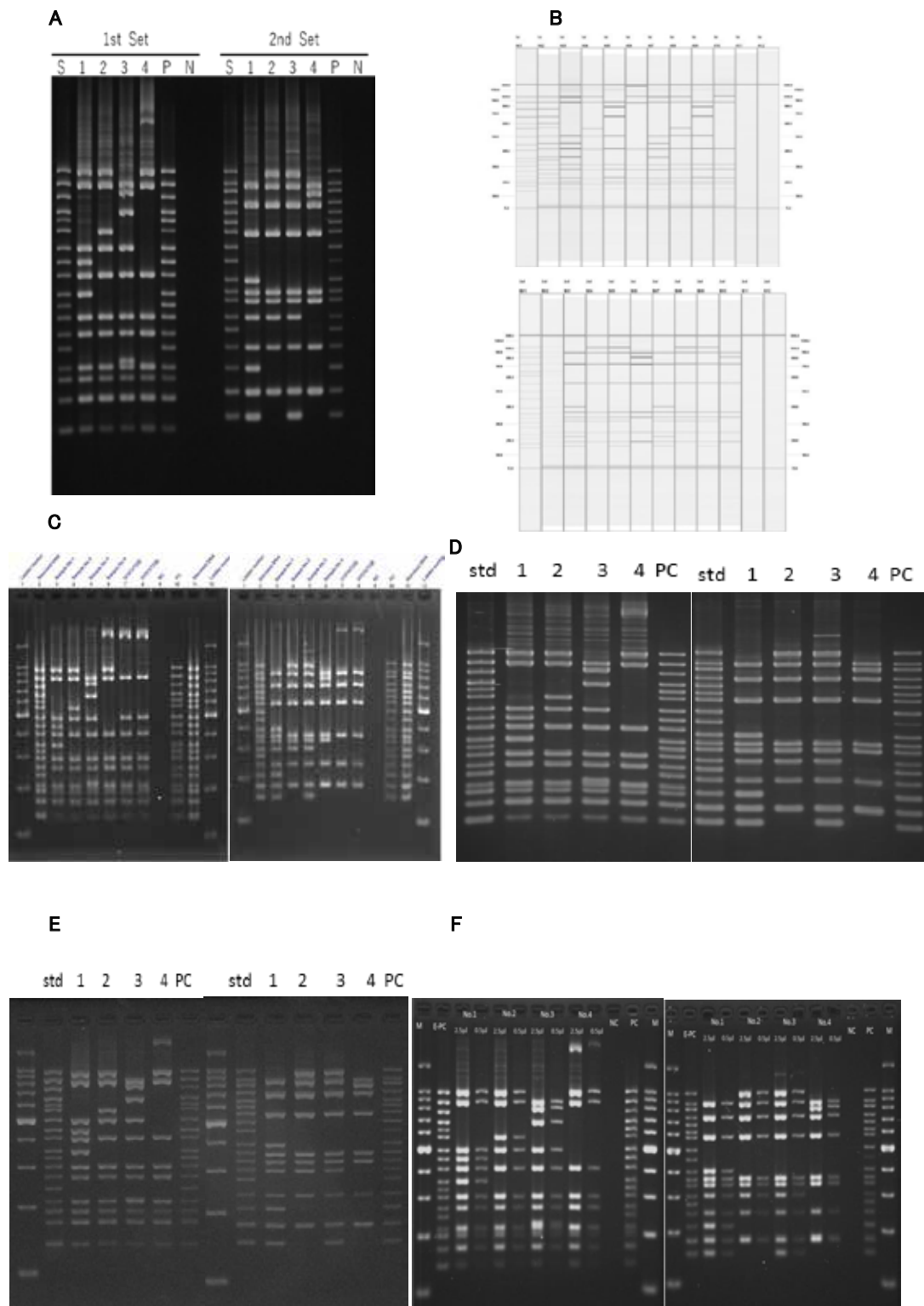


図 1 各施設のIS-Printing Systemによる電気泳動像

レーン 1 :EC16810, レーン 2 :EC16831, レーン 3 :EC16851, レーン 4 :EC16950

図 1 続き

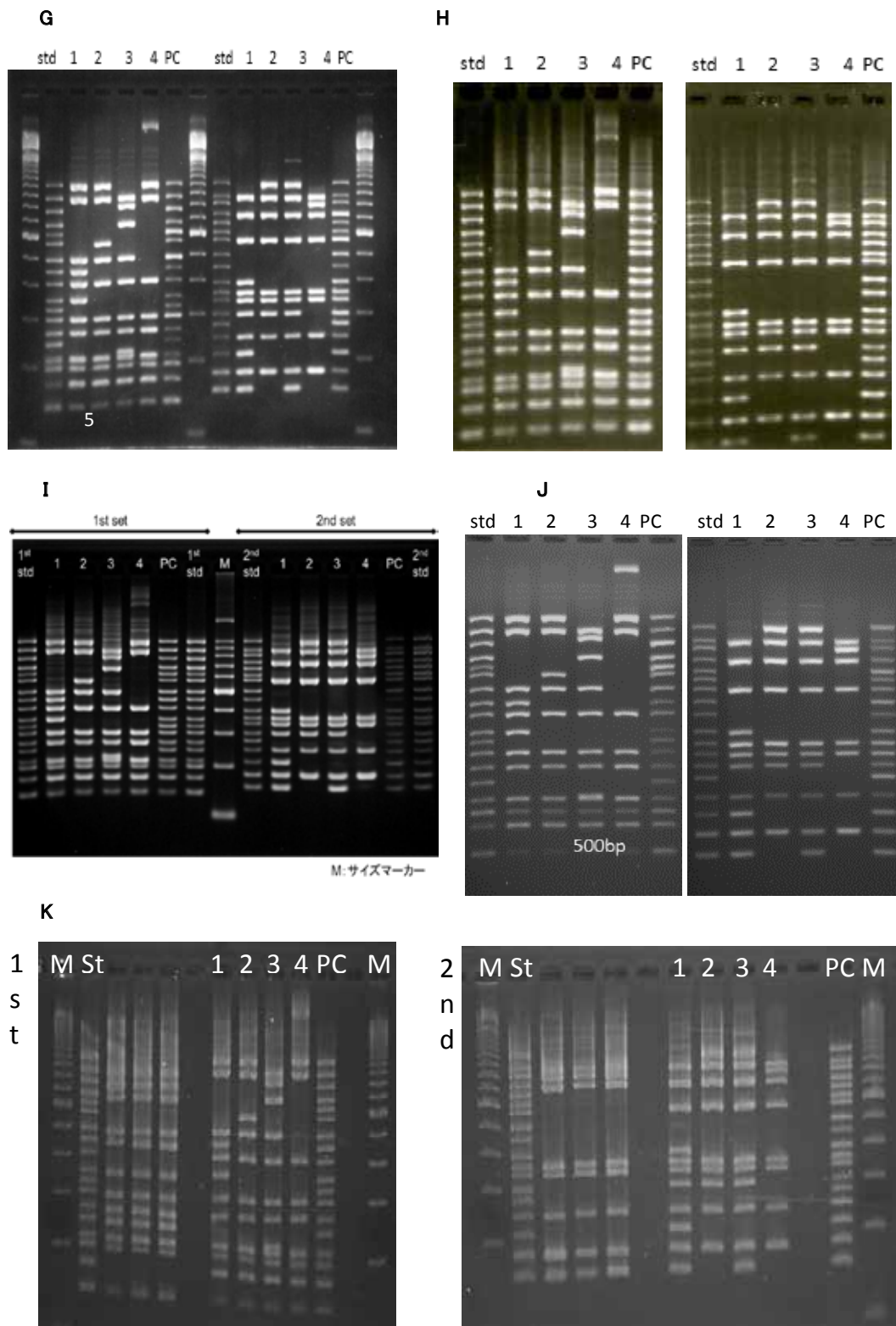


図 1 各施設のIS-Printing Systemによる電気泳動像
 レーン 1 :EC16810, レーン 2 :EC16831, レーン 3 :EC16851, レーン 4 :EC16950

表 4 北海道・東北・新潟ブロック内 O157VT2タイプ IS コード

自治体名	bp	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151					
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	1-16	1-17	1-18	1-19	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					
G	①	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0			
D	②	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
K	③	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
C	④	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
D	⑤	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
G	⑥	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
H	⑦	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
D	⑧	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
J	⑨	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
ポテトサラダ株		0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1/0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
F	⑩	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
H	⑪	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	
D	⑫	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
J	⑬	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	
F	⑭	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
F	⑮	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
J	⑯	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
H	⑰	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
E	⑱	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
K	⑲	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
E	⑳	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
D	㉑	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	
E	㉒	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	
G	㉓	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	
E	㉔	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0

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 29 年度分担研究報告書

関東ブロックにおける腸管出血性大腸菌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	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山城 彩花	茨城県衛生研究所
	中野 剛志	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	佐藤 孝志	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
	政岡 知佳	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
	森主 博貴	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

研究要旨 腸管出血性大腸菌 O157 共通菌株を用いて PFGE 法、IS 法の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。いずれの施設も良好な成績ではあったが、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。今年度から希望参加の形で MLVA 法の精度管理も実施し、8 施設の参加があった。結果はいずれも良好な成績であった。

地方衛生研究所全国協議会で作成した腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブックについて、執筆協力を行った。また、当該協議会で実施した MLVA 法技術研修会へ、講師あるいは研修生として参加し、MLVA 法の普及を目指した。

アンケート調査を実施した結果、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。

A. 研究目的

食中毒、感染症等が発生した際には、原因特定を迅速に行い、患者の拡大を防ぐこと

が重要である。食材、食品の広域流通が行われている現在は、同一の食材・食品を原因として散発的に異なる地域で患者が発生する

(Diffuse Outbreak) 可能性がある。このような場合、原因の食材・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) による患者の症状は重篤に陥ることがあり、病原体の解析は特に重要となる。

また自治体をまたがる事例の場合、各地方衛生研究所での検査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。近年は地研の職員も、異動により部署が変わることが多くあり、技術レベルを一定以上に保つためには定期的な精度管理調査が必要とされている。

このことから今回、EHEC 共通菌株を使用してパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法と IS-printing System (IS) 法について各地研の精度管理を実施した。また、希望参加として multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法についても精度管理を実施した。

解析データの比較を行う場合、データがデジタルであると解析が容易であることから、MLVA 法等については手技の統一や普及が望まれている。これを受けて、地方衛生研究所全国協議会で腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (MLVA の実践的プロトコール) の作成と、ハンドブックを使用した研修会の開催が企画された。そこで、MLVA 法の普及啓発を目的としてこれらに協力を行った。

また、分子疫学解析を用いた病原体解析を行った事例に関する情報収集を実施すると共に、分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査を行い、解析の現状と方向性について調査した。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株を関東ブロックの 10 施設に送付し、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の精度管理を行った。なお、MLVA 法に関しては今回が初めての試みであることから、希望参加型とした。

1) 供試菌株

2017 年に東京都内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 を 4 株用いた (表 1)。

2) PFGE 法

各施設で実施しているプロトコールに従って PFGE 法を行い、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

キット付属のプロトコールに従って IS 法を行い、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。

4) MLVA 法

地研全国協議会で実施された MLVA 法研修会を受講後、各施設で MLVA を行い、得られたデータを比較することにより解析を行った。なお、今回が初めての試みであったことから、報告するデータについては、レポート数への換算の有無を問わずに実施した。

2. MLVA の実践的プロトコール作成 (執筆協力)

地研全国協議会で、MLVA 法の実践的プロトコール (ハンドブック) の作成を企画していたことから、執筆と内容の校正について協力を行った。

3. MLVA 法の普及啓発（研修会への参加）

地研全国協議会で、作成したハンドブックを用いた MLVA 法研修会を企画していたことから、研修講師として協力を行うと共に、関東ブロックの研究協力者を研修生として参加させ、MLVA 法の普及を試みた。

4. 集団事例、散発事例など、分離された菌株の分子疫学解析を実施した事例について情報収集

分子疫学解析を活用して解析した事例について、関東ブロック内の研究協力施設へ情報収集を行った。

5. 分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査

PFGE 法、IS 法および MLVA 法の実施状況について、関東ブロック内の研究協力施設へアンケートを行った。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理結果

1) PFGE 法

関東ブロック 10 施設で、共通菌株について PFGE 法を実施した結果を図 1 に示した。PFGE 法は画像ファイルを用いた解析を行うことから鮮明な映像が望ましいが、今回の結果では、鮮明なものから若干不鮮明なものまで混在した。元の画像かファイルの解像度の問題と考えられるが、画像ファイル上でもバンドの分離が確認できることが必要と考えられた。

2) IS 法

関東ブロック 10 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 2 施設が Primer No.1-03 で誤判定の報告をした。当該株は、エキストラバンドが 1-02 と 1-03 の間および 1-14 と 1-15 の間に出る株であり、2 施設は前者のエキストラバンドを誤判定したものと考えられた（表 2 共通菌株の IS-printing System 成績）。

3) MLVA 法

関東ブロック 8 施設で、共通菌株について MLVA 解析を実施した結果、6 施設はリポート数を、1 施設は実測値を、1 施設は両者を報告した。リポート数を報告した施設は全て同一の結果であり、実測値を報告した施設も、数値が範囲内とすべての施設で良好な結果であった（表 3 共通菌株の MLVA 成績）。

2. MLVA の実践的プロトコール作成（執筆協力）結果

関東ブロック 2 施設が、ハンドブック中の「PCR 反応物のシーケンサーを用いた電気泳動」と「MLVA 型別における異同判定の考え方」部分の執筆を行った。また、全体の校正について関東ブロック 2 施設が協力を行った。これらの協力により、「腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック（O157、O26、O111 編）」が完成し、10 月 13 日に実施された研修会で使用されると共に、11 月 30 日には地研ネットワークのホームページへアップされた。

<http://www.chieiken.gr.jp/index.html>

3. MLVA 法の普及啓発（研修会への参加）結果

平成 29 年 10 月 13 日に、地研全国協議会、保健疫学情報部会により東京都健康安全研

究センターで開催された「平成29年度腸管出血性大菌 MLVA 技術研究会」に、本研究班の研究代表者と、関東ブロック 2 施設が研修講師として協力を行った。また、関東ブロック 8 施設の研究協力者が研修生として参加し、MLVA 法について普及啓発が行われた。研修会終了後、共通菌株を用いた MLVA 法精度管理を関東ブロックで実施したところ、8 施設の参加があった。

4. 集団事例、散発事例など、分離された菌株の分子疫学解析を実施した事例について情報収集結果

分子疫学解析を活用した事例については、平成29年度は PFGE 法と MLVA 法を行政活用した事例について経験していることが判明した。(別紙 分子疫学解析が有効に活用された事例集)

5. 集団事例、散発事例など、分離された菌株の分子疫学解析を実施した事例についてアンケート調査結果

アンケートの結果、PFGE 法と IS 法は全施設が実施しており、MLVA 法は 7 施設が実施していることが判明した。

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 10 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 2017 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 法の結果は概ね良好であったが、画像が若干不鮮明なものが認められた。元画像の問題か、ファイル解像度の問題かは不明であったが、PFGE 法は画像ファイルを用いて解析を行うことから、バンドの分離が確認できる映像が必要と考えられた。

IS 法の結果は、エキストラバンドが Primer set 1 で 1-02 と 1-03 の間に出る株について、Primer No.1-03 をプラスと誤判定した施設があり、バンドの想定サイズ確認は慎重に行う必要があるものと再確認された。

平成29年度は、MLVA 法についても共通菌株を用いた精度管理試験を施行した。希望参加とした結果、8 施設の参加があり、結果は各施設とも良好であった。

MLVA 法普及を目的として、ハンドブックの作成と研修会への協力を実施した。両者とも地研全国協議会が企画した事業であったが、研究班として執筆・校正の協力と、研修会へ講師として、あるいは研修生として参加し、MLVA 法の普及に尽力した。

アンケート調査の結果、分子疫学解析を有効に活用した事例では、他自治体で発症した患者由来株との比較などに有効に活用されていることが判明した。また、関東ブロック内で MLVA 法を実施している施設が、昨年は 6 施設 (11 施設中) であったところ今年度は 7 施設 (10 施設中) へと増加していることが判明した。

E. 結論

共通菌株を用いた精度管理により、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の検査・解析レベルが一定以上であることが判明した。

MLVA 法ハンドブックの作成に執筆協力を、研修会へ講師および研修生として参加

を行い、MLVA 法の普及を図った。

アンケート調査の結果、分子疫学解析を行政活用した事例を各施設で経験していることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Taku Wakui, Taichiro Ishige, Masaki Nakamura : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 subclade 8b strains in Chiba Prefecture, Japan, produced larger amounts of Shiga toxin 2 than strains in subclade 8a and other clades. PLOS ONE. 2018. 13(1): e0191834.
- 2) 平井晋一郎、横山栄二、涌井拓、石毛太一郎、中村正樹、蜂巢友嗣、遠藤幸男、村上覚史：腸管出血性大腸菌 O157 の subclade 8b における高病原性菌株について．第 38 回 日本食品微生物学会学術総会（2017）
- 3) 小西典子，畠山薫，原田幸子，神門幸大，尾畑浩魅，赤瀬悟，森功次，門間千枝，平井昭彦，甲斐明美，貞升健志：遡り調査で明らかとなった VT2f 産生 *Escherichia albertii* による集団事例と散発事例からの検出状況，第 21 回腸管出血性大腸菌感染症研究会，2017，鹿児島県

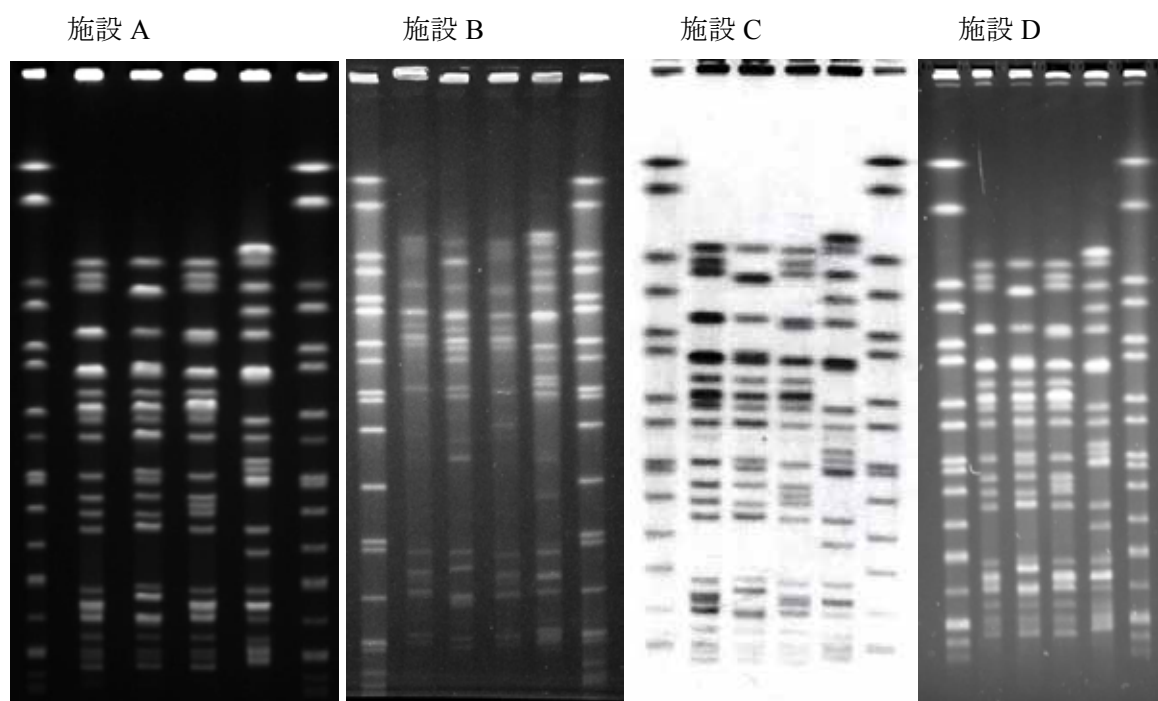
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 共通供試菌株 (2017 年分離腸管出血性大腸菌 O157 株)

No.	血清型	毒素型
1	O157 : H7	VT2
2	O157 : NM	VT1+VT2
3	O157 : H7	VT2
4	O157 : H7	VT1+VT2

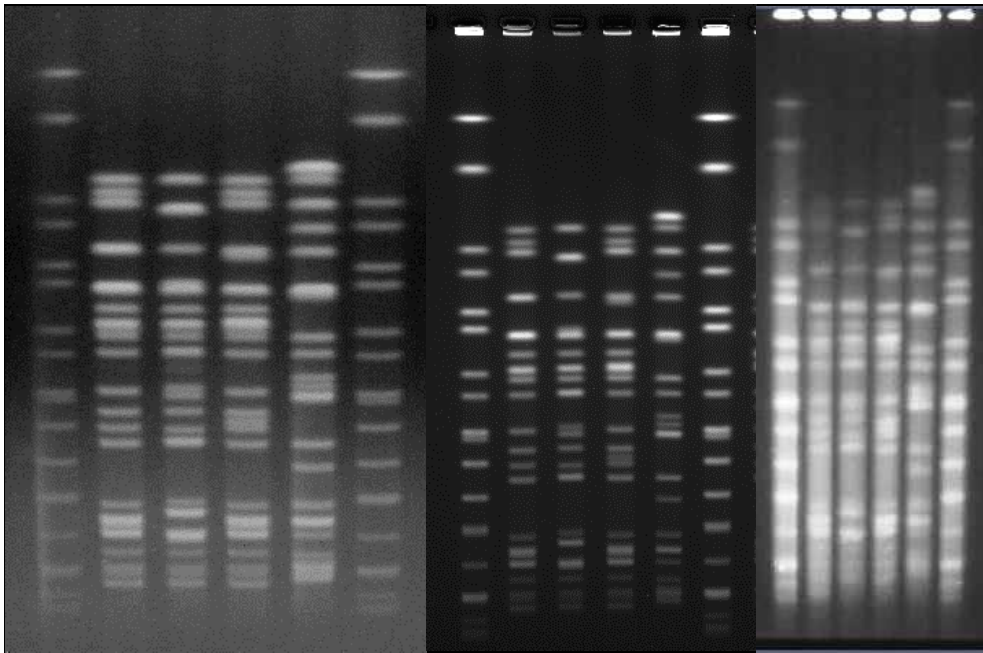
図 1 共通菌株の PFGE 像



施設 E

施設 F

施設 G



施設 H

施設 I

施設 J

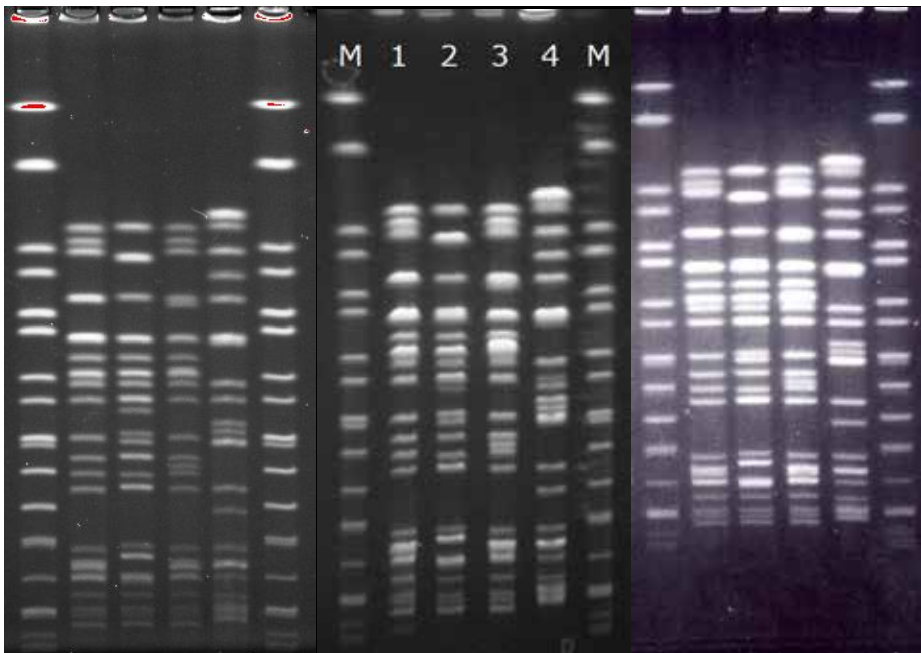


表2 共通菌株の IS-printing System 成績

Primer set 1

菌株 1

Prime No. 菌株 No.	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	非特異バンド	備考
A	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
B	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
C	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
D	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01(974 bp)より 大きい位置	
E	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
F	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	>1500bp	
G	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上 (>1500bp)	
H	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1(>1000bp)	
I	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上	
J	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		

菌株 2

Prime No. 菌株 No.	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	非特異バンド	備考
A	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02,03の間 及び1-14,15の間 にエキストラバンド あり。	
B	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間 (80bp付帯) 1-14と1-15の間 (220bp付帯)	
C	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	2と3の間 ・15の上	
D	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-14(241 bp)と1- 15(211 bp)の間の 位置	
E	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間	
F	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	約220bp(1-15の すぐ上)	
G	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間 ・1-14と1-15の間	
H	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1(839bpと742bpの間) 1(241bpと211bpの間)	
I	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間 1-14と1-15の間	
J	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	上から2本目と3本 目の間	

Primer set 1

菌株 3

Primer No. 菌株 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	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	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
B	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
C	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
D	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01(974 bp)より 大きい位置	
E	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
F	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
G	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上 (>1500bp)	
H	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1(>1000bp)	
I	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上	
J	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		

菌株 4

Primer No. 菌株 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	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	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
B	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
C	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
D	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
E	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
F	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
G	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
H	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
I	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
J	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		

Primer set 2

菌株 1

Primer No. 菌株 No.	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	非特異バンド	備考
A	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
B	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
C	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	・1と2の間	
D	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01 (987 bp) より大きい位置	
E	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
F	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	>1500bp	
G	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上 (>1500bp)	
H	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1 (>1000bp)	
I	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上	
J	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		

菌株 2

Primer No. 菌株 No.	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	非特異バンド	備考
A	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
B	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
C	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
D	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	2-01 (987 bp) より大きい位置	
E	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
F	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	約1400bp	
G	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	2-01の上 (1000-1500bpの間) 2-01の上	
H	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
I	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
J	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		

Primer set 2

菌株 3

Primer No. 菌株 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	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	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
B	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
C	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	・1と2の間	
D	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01(987 bp)より大きい位置	
E	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
F	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	>1500bp	
G	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上(>1500bp)	
H	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1(>1000bp)	
I	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上	
J	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		

菌株 4

Primer No. 菌株 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	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	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
B	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
C	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
D	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
E	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
F	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
G	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
H	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
I	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
J	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		

図2 共通菌株の IS 像

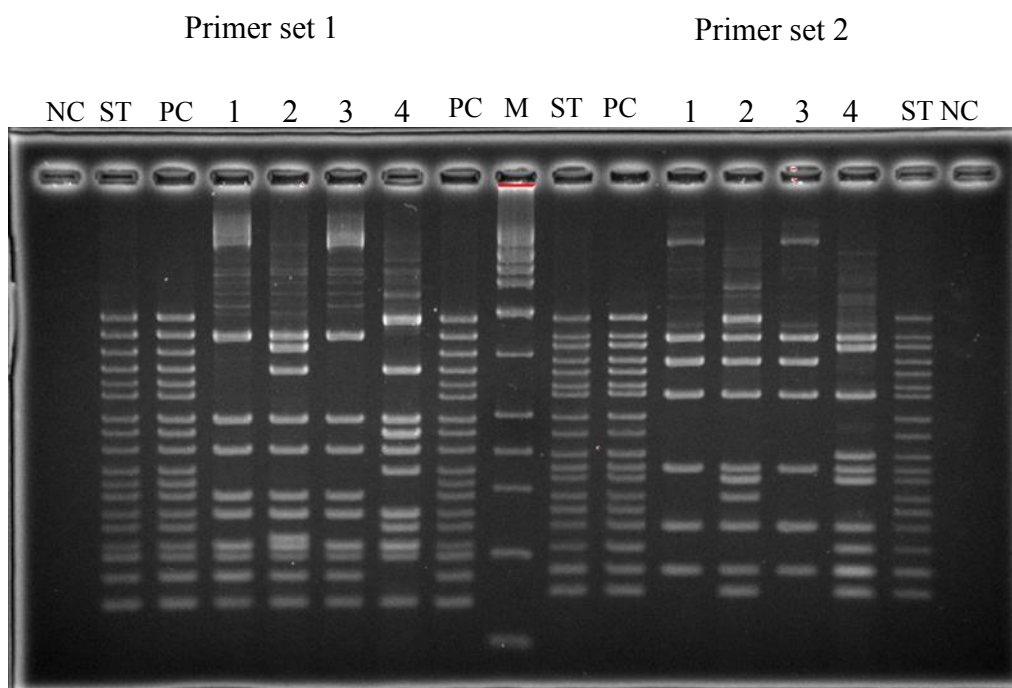


表3 共通菌株の MLVA 成績
菌株 1

Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	9	9	9	9	296.00	257.8, 297.6	9	9	9
EHC-1	70-210	VIC	緑	11	11	11	11	134.44	135.6	11	11	11
EHC-2	220-460	VIC	緑	5	5	5	5	239.20	240.1	5	5	5
O157-9	480-600	VIC	緑	13	13	13	13	538.18	537.8	13	13	13
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	11	11	11	11	383.41	386.6	11	11	11
O157-25	120-200	PET	赤	4	4	4	4	132.33	132.6	4	4	4
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.21	235.6	1	1	1
EH157-12	400-470	PET	赤	6	6	6	6	439.36	444.7	6	6	6
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	422.47	427.8	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	4	4	4	4	137.56	142.3	4	4	4
O157-10	370-700					20	20	465.49				
O157-36	120-240	NED	黄	9	9	9	9	160.53	161.1	9	9	9
O157-19	260-340	NED	黄	7	7	7	7	307.82	310.2	7	7	7
EHC-6	400-650	NED	黄	null	-2	0	-	-	567.6	0	-2	
O157-37	80-240	PET	赤	6	6	6	6	114.69	117.2	6	6	6
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-		0	-2	

菌株 2

Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	10	10	10	10	312.16	315.4, 365.0	10	10	10
EHC-1	70-210	VIC	緑	5	5	5	5	98.37	99.9	5	5	5
EHC-2	220-460	VIC	緑	5	5	5	5	239.43	239.9	5	5	5
O157-9	480-600	VIC	緑	9	9	9	9	515.36	514.5	9	9	9
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	18	18	18	18	426.95	428.4	18	18	18
O157-25	120-200	PET	赤	2	2	2	2	118.78	121.2	2	2	2
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.26	235.5	1	1	1
EH157-12	400-470	PET	赤	4	4	4	4	422.22	427.4	4	4	4
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	422.63	427.7	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	12	12	12	12	188.01	192.0	12	12	12
O157-10	370-700					25	25	495.67				
O157-36	120-240	NED	黄	4	4	4	4	124.71	126.8	4	4	4
O157-19	260-340	NED	黄	7	7	7	7	307.86	310.2	7	7	7
EHC-6	400-650	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-37	80-240	PET	赤	7	7	7	7	120.60	123.1	7	7	7
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-		0	-2	

菌株 3

Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	9	9	9	9	296.48	297.6	9	9	9
EHC-1	70-210	VIC	緑	11	11	11	11	134.47	135.6	11	11	11
EHC-2	220-460	VIC	緑	5	5	5	5	239.18	240.1	5	5	5
O157-9	480-600	VIC	緑	12	12	12	12	532.64	532.0	12	12	12
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	11	11	11	11	383.94	386.6, 428.6	11	11	11
O157-25	120-200	PET	赤	4	4	4	4	130.54	132.5	4	4	4
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.34	235.6	1	1	1
EH157-12	400-470	PET	赤	6	6	6	6	441.62	444.9	6	6	6
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	425.95	427.9	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	4	4	4	4	136.93	142.2, ※ 522	4	4	4
O157-10	370-700					21	21	473.24				
O157-36	120-240	NED	黄	9	9	9	9	160.56	161.1	9	9	9
O157-19	260-340	NED	黄	7	7	7	7	309.99	310.3	7	7	7
EHC-6	400-650	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-37	80-240	PET	赤	6	6	6	6	117.00	117.2	6	6	6
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-		0	-2	

菌株 4

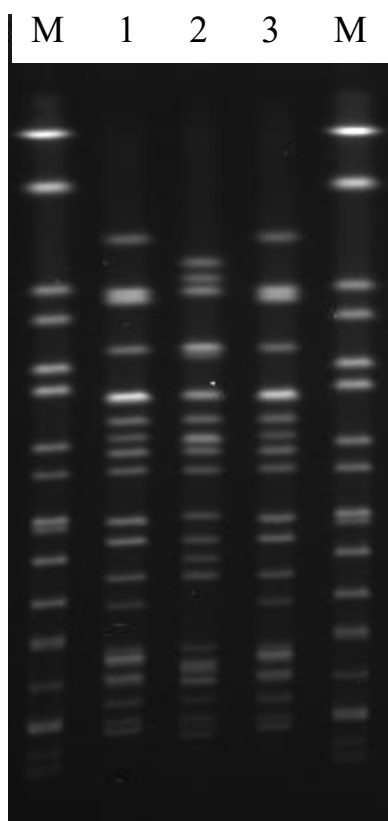
Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	12	12	12	12	348.33	351.5	12	12	12
EHC-1	70-210	VIC	緑	5	5	5	5	98.45	100.0	5	5	5
EHC-2	220-460	VIC	緑	4	4	4	4	232.90	233.9	4	4	4
O157-9	480-600	VIC	緑	17	17	17	17	561.97	561.3	17	17	17
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	9	9	9	9	371.88	327.3, 374.6	9	9	9
O157-25	120-200	PET	赤	5	5	5	5	136.21	138.3	5	5	5
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.32	235.5	1	1	
EH157-12	400-470	PET	赤	4	4	4	4	421.94	427.6	4	4	4
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	426.00	427.8	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	8	8	8	8	166.68	167.2	8	8	8
O157-10	370-700					25	25	497.44				
O157-36	120-240	NED	黄	7	7	7	7	144.92	147.2	7	7	7
O157-19	260-340	NED	黄	6	6	6	6	304.15	304.4	6	6	6
EHC-6	400-650	NED	黄	20	20	20	20	555.09	557.7	20	20	20
O157-37	80-240	PET	赤	3, 15	3	3	15	169.37	98.9, 170.9	3	3	15
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-	※ 520.2	0	-2	

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事例

2017年8月8日、横浜市保健所に腸管出血性大腸菌感染症の届出が出された。患者は小児女性で、EHEC O157 (VT1&2 産生) が検出されており、7月30日に市内の焼肉店 A を利用していることが判明した。その後、焼き肉店 A を同じく7月30日に利用した患者 (成人男性) が他の自治体にいることが判明した。

この2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と②は同一の泳動パターンを示した。患者2人に接触歴および共通の感染経路はなく、共通食は当該施設で提供された食事のみということで、横浜市保健所は原因施設である焼き肉店 A に対し、営業禁止処分を行った。



- | | | |
|---|---------------------|--------|
| 1 | 患者① | (横浜市) |
| 2 | 本事例 | 非対象者 |
| 3 | 患者② | (他自治体) |
| M | S. Braenderup H9812 | |

事例 2. 飲食店で発生した腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT2)食中毒事例

2017年8月下旬、保健所に管内医療機関から腸管出血性大腸菌 O157(VT2)の発生届が提出された。患者は4名の家族とともに飲食店を利用しており、患者以外の2名の家族も胃腸炎症状を呈しているとの情報があった。その後さらに、別件で2件の届出があり、いずれも初発患者と同一飲食店を利用していたことが判明した。調査の結果、3グループ11名の喫食者が確認され、そのうち7名が下痢、腹痛、血便を主症状とする胃腸炎症状を呈していた。この7名の検便では4名から腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT2)が検出された。分離された4株に対して MLVA 解析を実施したところ、4株すべてが同一の MLVA パターンを示した(表1)。

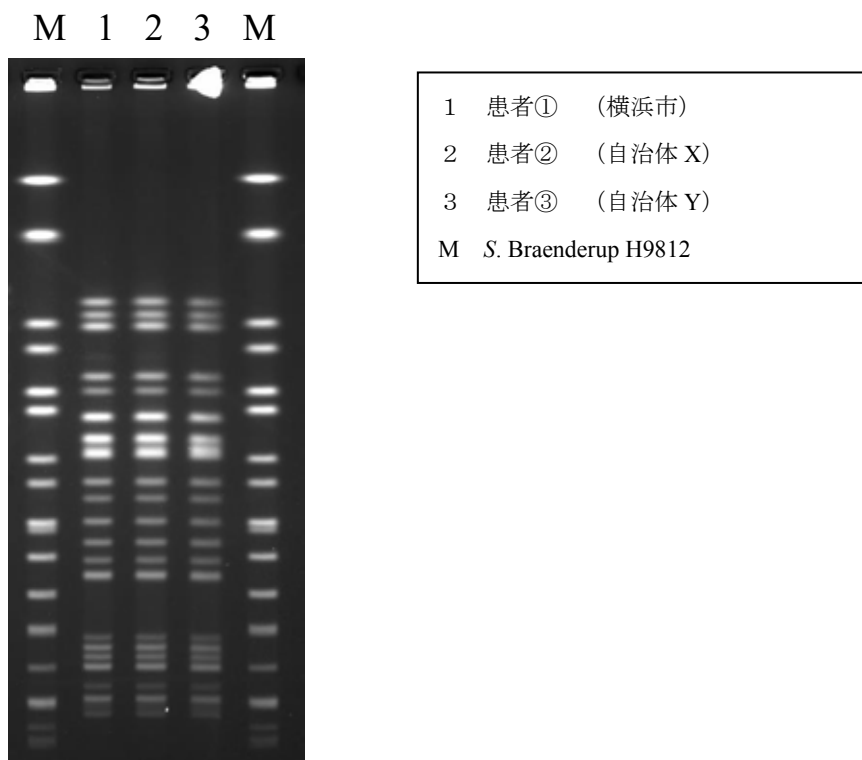
本事例は、患者の主症状及び潜伏期間が、腸管出血性大腸菌 O157 によるものと一致したこと、患者の共通食が、原因施設で提供された食事限定された事、患者4名から分離された菌株の MLVA パターンが一致したことなどから、当該施設で提供された食事を原因とする腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT2)による食中毒事例とされた。

表1 分離株の MLVA パターン

Locus	size	repeat	Locus	size	repeat
O157-34	140-520	9	EH111-14	150-170	0
EHC-1	70-210	11	EH111-11	420-450	2
EHC-2	220-460	5	O157-17	130-220	4
O157-9	480-600	17	O157-10	370-700	17
EHC-5	120-240	0	O157-36	120-240	5
O157-3	330-470	10	O157-19	260-340	7
O157-25	120-200	5	EHC-6	400-650	0
EH111-8	230-350	1	O157-37	80-240	6
EH157-12	400-470	6	EH26-7	270-430	0

事例 3. 焼肉店で発生した食中毒事例 2

2017年11月21日、横浜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、EHEC O157 (VT2 産生) が検出されており、発熱、腹痛、嘔気、水様下痢を呈していた。この患者は11月10日に市内の焼肉店 B を利用していた。その後他の自治体に焼肉店 B を利用した患者が2人 (利用日11月5日および11月8日) いることが判明した。この3人の菌株について制限酵素 Xba I を用いて PFGE を行ったところ、同一の泳動パターンを示した。患者らの利用日はそれぞれ異なるが、接触歴および共通の感染経路はなく、共通食は当該施設で提供された食事のみということで、横浜市保健所は原因施設である焼き肉店 B に対し営業禁止処分を行った。



事例 4. 飲食店で発生した EHEC O157 による集団食中毒事例

【事例概要】

① EHEC O157 による集団食中毒事例の探知（11 月 20 日～21 日）

平成 29 年 11 月 20 日（月）～21 日（火）に、千葉県内の異なる医療機関から管轄保健所に EHEC O157 感染症発生届が提出された。そこで、管轄保健所が疫学的調査を実施したところ、感染者 3 名（感染者 A、B 及び C）は、いずれも別グループとして、11 月 9 日（木）に U 市内の飲食店 S を利用していたことが判明した。なお、感染者 A、B 及び C 間で接触の機会は無かった。

② 衛生研究所での MLVA 法の解析（11 月 28 日～12 月 4 日）

11 月 28 日（火）までに、感染者 A、B 及び C 由来の 3 菌株の EHEC O157 が千葉県衛生研究所へ搬入され、MLVA 法が開始された。12 月 1 日（金）、これら 3 菌株について、MLVA 法で解析した全遺伝子領域のリポートが一致した。さらに、3 菌株は、同時期に同一市内で届出があった EHEC O157 感染者 D 由来の 1 菌株とも MLVA 法のリポート数が一致した。以上より、感染者 A、B 及び C と感染者 D の感染源は同一である可能性が疑われた。休日明けである 12 月 4 日（月）、衛生研究所から管轄保健所へ MLVA 法の解析結果が提供された。

③ 保健所による疫学的調査の追加実施（12 月 4 日）

12 月 4 日（月）、管轄保健所は、感染者 A、B 及び C と感染者 D 間における疫学的関連性の有無について追加調査を開始した。調査の結果、感染者 D は 11 月 8 日（水）に飲食店 S を利用していることが明らかとなった。なお、感染者 A、B 及び C と感染者 D の間で接触の機会は無かった。

④ 飲食店 S を営業停止処分（12 月 5 日）

12 月 5 日（火）、管轄保健所は、以下の a.～d. を根拠に、飲食店 S が提供した食事が原因で集団食中毒が発生したと判断し、飲食店 S に対し営業停止処分を行った。

- a. 感染者 A、B 及び C が EHEC O157 に感染していたこと
- b. 感染者 A、B 及び C の共通食は飲食店 S が提供した食事に限られていたこと
- c. 感染者 A、B 及び C 間で接触の機会が無かったこと
- d. 感染者 A、B 及び C 由来の 3 菌株の EHEC O157 について MLVA 法で同一性が確認されたこと

【まとめ】

MLVA 法は、菌株間の類似性を判定する能力が非常に高い。本事例では、初期の疫学的調査では、感染者 D の感染源を特定できなかったが、MLVA 法の解析結果が、感染者 D の

感染源が飲食店 S の食事であることが発覚する手掛かりとなった。

一方で、MLVA 法は、短時間で解析結果を出すことができるため、MLVA 法の結果は行政的判断に活用できる。本事例では、EHEC O157 菌株の搬入から 4 日で MLVA 法の解析結果（感染者 A、B 及び C と感染者 D の感染源が同一である可能性）が得られた。しかし、本事例では、感染者 D 以外に、飲食店 S の利用者 3 名（感染者 A、B 及び C）も EHEC O157 に感染していたことから、管轄保健所は感染者 D を飲食店 S の営業停止処分の根拠としなかった。今後、感染者数が少なく行政的判断が困難な事例においては、MLVA 法の解析結果が有効に活用できるだろう。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による IS printing System 精度管理および情報共有に関する研究

研究分担者 松本昌門 愛知県衛生研究所
研究協力者 山田和弘 愛知県衛生研究所
木全恵子 富山県衛生研究所
木村恵梨子 石川県保健環境センター
岩崎理美 福井県衛生研究所
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所
野田万希子 岐阜県保健環境研究所
信田充弘 岐阜市衛生試験所
永井佑樹 三重県保健環境研究所
山本新也 豊橋市保健所衛生試験所
中根千鶴 岡崎市総合検査センター
多和田光紀 豊田市衛生試験所

研究要旨

東海・北陸地方 10 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所）に対して、1. IS-printing 精度管理、2. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

1. IS-printing 精度管理

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

2. 地域共有データベース

4 月から運用開始され、腸管出血性大腸菌シーズンをカバーすることができた。平成 29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）は死亡に至ることもある腸管感染細菌として、公衆衛生上対策を必要とする主要な病原体の一つである。EHEC はいわゆる食中毒の原因菌であると共に、食品を介した diffuse outbreak 例も報告されている。diffuse outbreak は散発事例に紛れることが多く、発見が困難であるため、対策には迅速な分子疫学解析と、情報共有が重要となる。東海・北陸地方では従来情報共有が十分ではなく、diffuse outbreak の把握に問題があった。かつて分子疫学解析手法がパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）に限られていた時は、分子疫学情報を共有するためには、複雑な PFGE パターンの比較を行う必要があり、迅速な情報共有は事実上不可能であった。しかし近年 PCR による EHEC 0157 の分子疫学手法として IS-printing system（IS-PS）及び代表的な血清型の分子疫学解析手法として multilocus variable-number tandem-repeat analysis（MLVA）が登場し、迅速性に加えデータベース化しやすい環境が整ってきた。そこで本研究では東海・北陸地方 10 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所）に対して、1. IS-PS 精度管理、2. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

1. IS-PS 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 5 株からカラム精製した DNA（20 ng/μL）を送付し、解析結果を送付してもらった。その際、解析に使用したサーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、電気泳動条件等についての調査を行った。なお、送付した 5 検体のうち、検体番号①については 1-03 の上に非特異バンドが検出される株であった（図 1）。

2. 地域共有データベース

各地研におけるデータ登録及びデータ閲覧の利便性を考慮し、クラウドデータベースサービスである kintone（サイボウズ、東京）を利用した IS-PS の情報共有システム構築を行った。登録

情報としては施設名称、菌株の分離年月日、IS-PS の結果、及びその他の項目として非特異バンドを入力可能とした。登録したデータは直ちに反映され、各ユーザーが確認可能となる。また、IS-PS の遺伝子型は視認性向上のため、8 桁毎に 10 進法に変換したコード番号を付与し、運用している。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

1. IS-PS 精度管理

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

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

各施設における各施設における PCR 実施環境を表 1 に示す。各地研で様々なサーマルサイクラーが使われていた。電気泳動装置については Mupid ブランドのミニゲル電気泳動装置が多かったが、一部バイオラドの Sub cell GT を使用している地研も見られた。アガロースについては添付文書どおりとした地研が 7 カ所と最も多かった。

2. 地域共有データベース

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

D. 考察

1. IS-PS 精度管理

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

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

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

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

2. 地域共有データベース

4月から運用開始され、EHECシーズンをカバーすることができた。平成 29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもある

ことから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

E. 結論

1. IS-PS 精度管理

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

2. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-PS の情報共有を試みた。データベースの活用法などに課題が残る。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1 精度管理に用いた IS-PS 泳動図

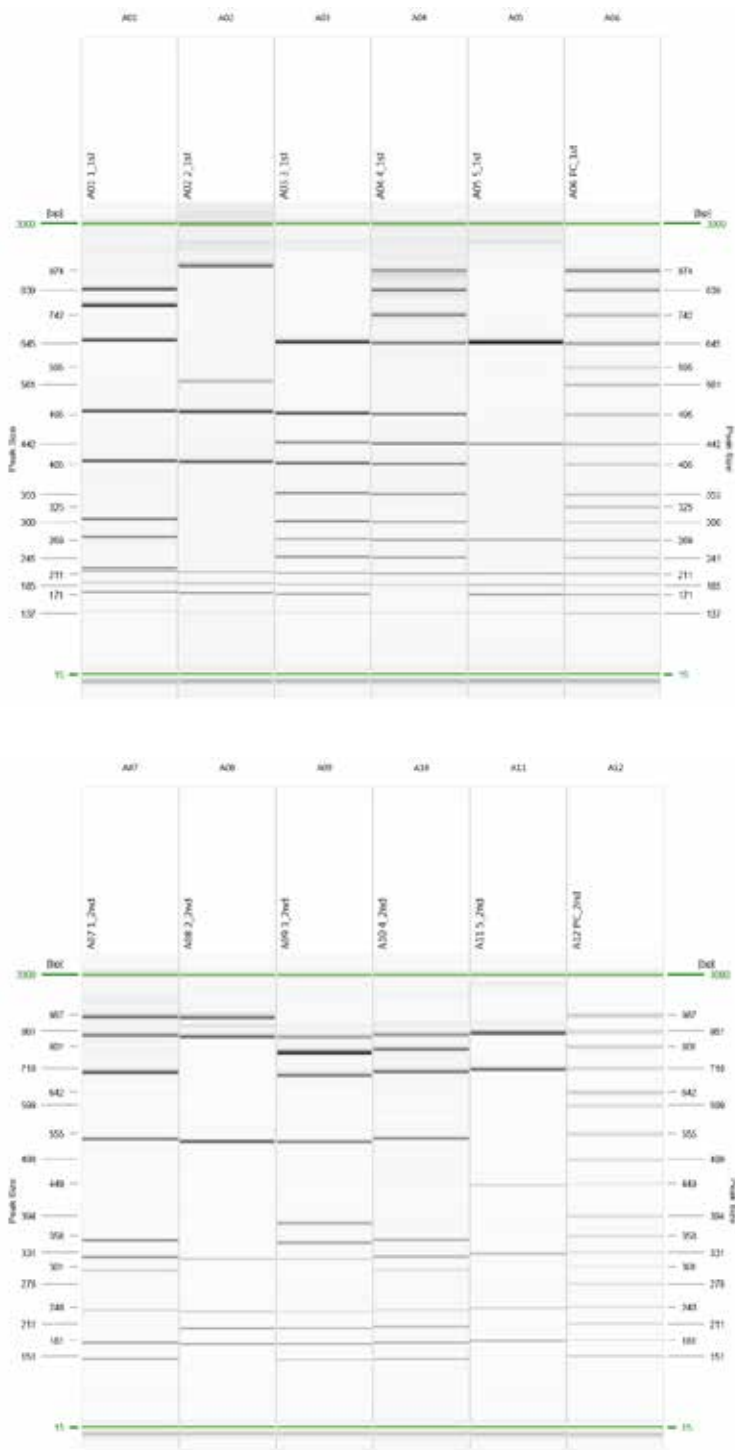


表 各種試験におけるPCの電流消費					
試験	A	B	C	D	E
テラプレート作成方法	5ヶキップスで熱抽出	アルカ熱抽出 (6mm Wafer) 標準			
サーマルサイクル試験種名	Venti	T100 サーマルサイクル (ハイオク・ラジ)	添付文書と併用 Applied Biosystems Venti	添付文書と併用 2720 thermal cycler (48)	添付文書と併用 PDPシステムProFlex
IS-printing PCの反応ボリューム	20µl	20µl L	50µl L	50µl	50µl
アガロースの濃度及び速度	3% Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1	3% Agareso KANTO HD in 0.5x TBE	3% Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1	ゲル濃度3% Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1	3%アガロース/Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1
電気泳動槽の構造	Mupid ミニゲル泳動槽	i-Mupid ミニゲル泳動槽 (コストモイオ)	Mupid-exu	Mupid-21 ミニゲル泳動槽 (コストモイオ)	コストモイオ槽 i-MuRunII
電気泳動槽容量・時間	50V 50min, 100V 90min	100V, 60分前後 (Gelの泳動状況で変動)	100V 70分	100V 75min	135V 135分
泳動バッファ	0.5x TBE	0.5x TBE	0.5x TBE	0.5x TBE	0.5x TBE
その他		T-Makerの8x Dyeの使用			
試験	F	G	H	I	J
テラプレート作成方法	送付されたサンプルをそのままアガロースコロニーから熱抽出もしくはアガロースDMを				
サーマルサイクル試験種名	Applied Biosystems Venti 200	BIO-RAD C1000 Thermal Cycler	添付文書と併用 Applied Biosystems Venti	添付文書と併用 PDPシステムProFlex	Applied Biosystems Venti 46 well Thermal Cycler
IS-printing PCの反応ボリューム	50µl L	25µl	添付文書と併用	50µl	20µl
アガロースの濃度及び速度	Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1 3%	Nusieve 3:1 Agareso, 3%	添付文書と併用	3%アガロース/Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1	Nusieve 3:1アガロース 3%
電気泳動槽の構造	Mupid	BIO-RAD MINI-SUB CELL GT	ADVANCE Mupid-exu	コストモイオ槽 i-MuRunII	CosmoBio MuRun
電気泳動槽容量・時間	100V 75分	100V 40分	100V 40分	135V 135分	100V 120min
泳動バッファ	0.5x TBE	0.5x TBE	添付文書と併用	0.5x TBE	0.5x TBE Buffer
その他					サンプルは必ずボジションIIにて泳動

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
平成 29 年度分担研究報告書

近畿ブロックにおける食品由来感染症の病原体情報の解析および
共有化システムの構築に関する研究

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

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子型別法である IS-printing System (IS) 法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法について精度管理を実施するとともに、近畿 IS データベースを活用して、流行株の探知や複数の自治体にまたがる事例の解析を行った。IS 法の精度管理では全 12 施設が正確な判定を行ったが、1 施設は 5 株中 3 株でエキストラバンドを検出した。結果には影響しなかったものの、誤判定につながる可能性が考えられた。PFGE 法の精度管理については 1 施設を除き概ね良好な結果であった。画像によっては解析困難な部分があり、分離されたバンドの位置が不明瞭な点を解消することが課題である。近畿 IS データベースへの登録は 2 年続けて減少したが、5 月には感染研 IS パターン番号 AA831 が、8 月には AA756 が集中して分離された。ブロック内の情報交換により、それぞれ全株または多くの株で MLVA complex の一致が確認され、いずれも同一の感染源が疑われた。一方で、AA023、AA063 および AA031 は分離時期が長期にわたっており、複数の MLVA 型が含まれることが判明した。

A. 研究目的

食品由来感染症において原因菌の分子疫学解析は行政対応に重要なツールである。近畿ブロックの地方衛生研究所（地衛研）では、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の遺伝子型別法として、IS-printing System (IS) 法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法を共通の解析手法として使用している。本研究では、その信頼性を確保するため精度管理を実施するとともに、近畿 IS データベースを活用した流行株の探知や複数の自治体にまたがる事例の解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

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

2. IS 法の精度管理

IS 法は、IS-printing System Version 2（東洋紡）を使用し、マニュアルに従い、表 2 の条件で実施した。判定表に、プライマーごとに増幅の有無とエキストラバンドがある場合はそのサイズを記入し、電気泳動画像とともに提出を求めた。

3. 近畿 IS データベース

施設毎に EHEC O157 を収集して IS 法を実施し、その結果を施設内データベースに登録した。更新した施設内データベースは、レファレンス用データとして地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所森ノ宮センター（森ノ宮 C）に送付し、森ノ宮 C では各

施設から送付されたデータをもとにレファレンス・データベースを更新して、最新版を研究協力者に電子メールで送信した。

4. PFGE 法の精度管理

平成 15 年度から使用している「PFGE New Protocol-Kinki」に従って実施した。電気泳動画像は、サイズマーカー（*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断）の Band 9 と Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、かつ Band 16 が認識できることを条件とした。

画像解析は、BioNumerics ver. 6.1（Applied Maths）を使用し、ソフトウェアの自動バンド認識を目視で補正した後、類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

（倫理面への配慮）

本研究で取り扱う菌株および感染者情報は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に基づく調査によって得られたもので、個人情報には研究参加施設において匿名化し、厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. IS 法の精度管理

IS 法の精度管理には 12 施設が参加し、良好な結果が得られた（図 1）。菌株 4 はセット 1 でプライマー 1-12 と 1-13 の間にエキストラバンドが増幅されるが、すべての施設でエキストラバンドと正しく判定された。また、施設 8 や施設 10 では、増幅レンジよりも大きなバンドをエキストラバンドと判定していた（図 1）。

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

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

2. 近畿 IS データベース 2017 年分離株の傾向

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

複数の MLVA 型が含まれていた。

3. EHEC O157 の PFGE 精度管理

PFGE の精度管理には 11 施設が参加した。得られた PFGE 画像は、概ねサイズマーカーについての条件は満たしていたが、施設 5 の画像は菌株によってバンドの分離が悪く、バンド自体が不明瞭なものもあった (図 4)。また、バンド (特に、低分子量のバンド) がやや不明瞭な施設 (施設 2) や、全体的にバンドがかなり薄く、不鮮明な施設 (施設 12) もみられた。

画像解析にあたっては、上記の薄いバンドのほか、バックグラウンドの汚れがバンドとして認識されることもあり、自動バンド認識を目視で補正した。トレランス値 1.2% でデンドログラムを作成したところ (図 5)、施設 5 の 2 株を除き (05-2 および 05-3)、5 種類の菌株は施設に関係なく菌株毎にクラスターを作り、その近似度は 81.5~89.2% であった。

D. 考察

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

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

近畿 IS データベースを運用するにあたり、品質保証のために毎年精度管理を実施している。今年度も判定に注意が必要なエキストラバンドが増幅される株（菌株 4）を含む 5 株を 12 施設に配付した。この菌株 4 は 1-12（300 bp）は増幅されるが、1-13（269bp）は増幅されず、約 280bp のエキストラバンドが増幅されるため、1-13 との判別に注意を要する株である（図 1）。菌株 2 および 3 は 1-13 が陽性であり、隣接するレーンと比較すると泳動位置が異なることがわかるが、バンド間隔が狭いと誤判定されると考えられた。しかし、今年度はすべての施設でエキストラバンドと認識され、各施設で一定の泳動条件の最適化が実施されたと考えられた。しかし、施設 1 は、電気泳動画像において太く明瞭なバンドを陽性と判定し、細く薄いバンドを陰性もしくはエキストラバンドと判定する傾向が認められた（図 2）。他施設と比べ、細くて薄いエキストラバンドが多く観察されたことから、鋳型 DNA 量が多いあるいは泳動のためのアプライ量が多いといった原因が考えられた。また、判定に支障はなかったものの、バンド背景がやや高い（図 3）、画像のコントラストが低い（図示せず）といった判定の客観性を保つ上で問題があると考えられた施設もあった。これらについては、脱色が不十分、染

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

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

る必要性が考えられた。

E. 結論

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

近畿 IS データベースへの登録は昨年より減少したが、7～8月には感染研 IS パターン番号 AA756 が集中して分離され、同一感染源であることが強く疑われた。

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

F. 研究発表

1. 誌上発表

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

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

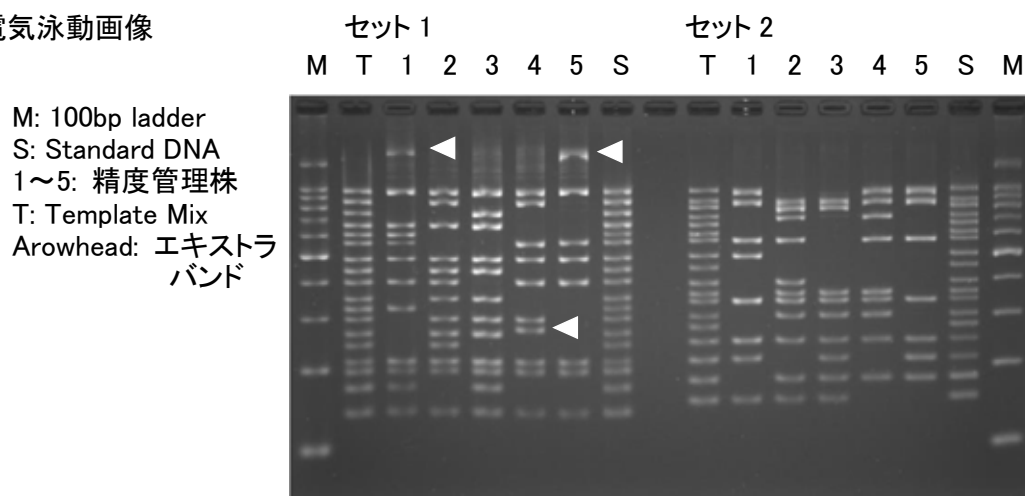
表 1 IS-printing System および PFGE の精度管理に使用した菌株

菌株 番号	菌種(毒素型)	分離年	近畿ISデータベース		感染研 MLVA type
			ISコード		
1	EHEC O157:H7 (VT1)	2017	162447	199757	17m0032
2	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2017	216957	117227	17m0034
3	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2017	183663	98543	14m0025
4	EHEC O157:H7 (VT2)	2017	203341	215274	17m0117
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2017	137741	198734	17m0223

表 2 IS-printing System 精度管理の実施条件

施設	ISキット Lot.	遺伝子増幅装置	電気泳動装置	泳動時間
1	6201A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	Mupid-exU	100V 180min
2	6210A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	Mupid-2plus	100V 60min + 50V 30min
3	6201A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	Mupid-2plus	50V 60min + 100V 45min
4	5001A	Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	Mupid	100V 40min + 50V 25min
5	6201A	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	QIAxcel (DNA High Resolution Cartridge)	5kV 35min
6	6201A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 / Applied Biosystems veriti ThermalCycler	Mupid-2plus	50V 45min + 100V 60min + 50V 35min
8	6201A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	i-Mupid J	135V 25min + 50V 37min
9	6201A	BIOER Life Touch	GelMate2000	100V 125min
10	6201A	Applied Biosystems Verti Thermal Cycler	Mupid	100V 60min + 50V 30min
11	6210A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-600	Mupid-exU	50V 45min + 100V 45min
12	6201A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	Mupid-exU	50V 120min
13	5001A	Agilent SureCycler 8800	Mupid-2plus	50V 60min + 100V 45min

1) 電気泳動画像



2) 判定

セット 1

プライマー サイズ(bp)	1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hlyA 137	エキストラ バンド(bp)
菌株1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	<1500
菌株2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
菌株3	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
菌株4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	280
菌株5	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	<1500

セット 2

プライマー サイズ(bp)	2-01 987	2-02 861	2-03 801	2-04 710	2-05 642	2-06 599	2-07 555	2-08 499	2-09 449	2-10 394	2-11 358	2-12 331	2-13 301	2-14 278	2-15 240	2-16 211	stx2 181	stx1 151
菌株1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
菌株2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
菌株3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
菌株4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
菌株5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0

1: 増幅あり, 0: 増幅なし

図1 IS-printing System の精度管理実施例(施設 8)

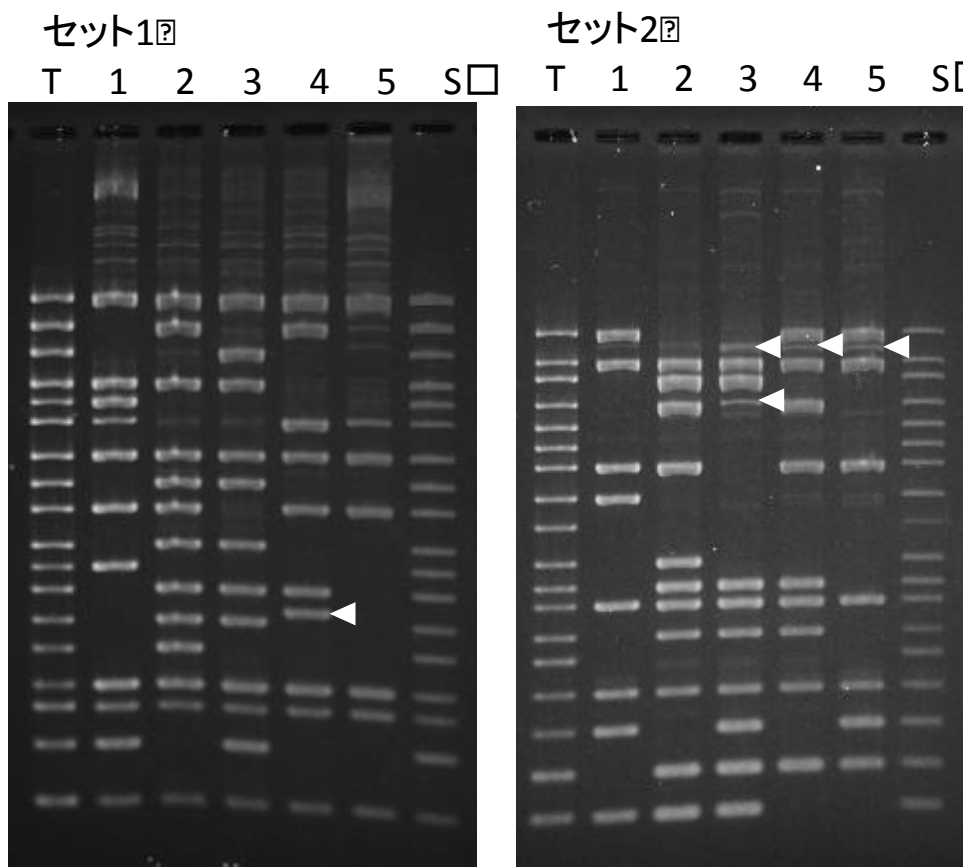


図2 IS-printing System の精度管理実施例(施設 1)

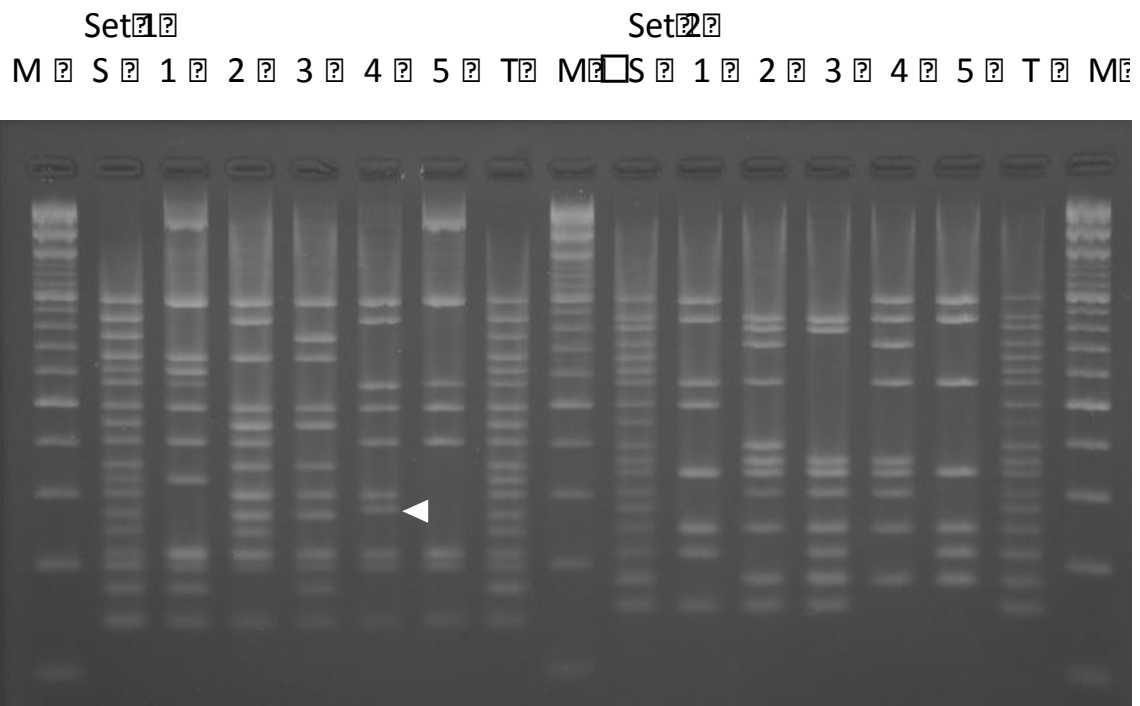


図3 IS-printing System の精度管理実施例(施設 3)

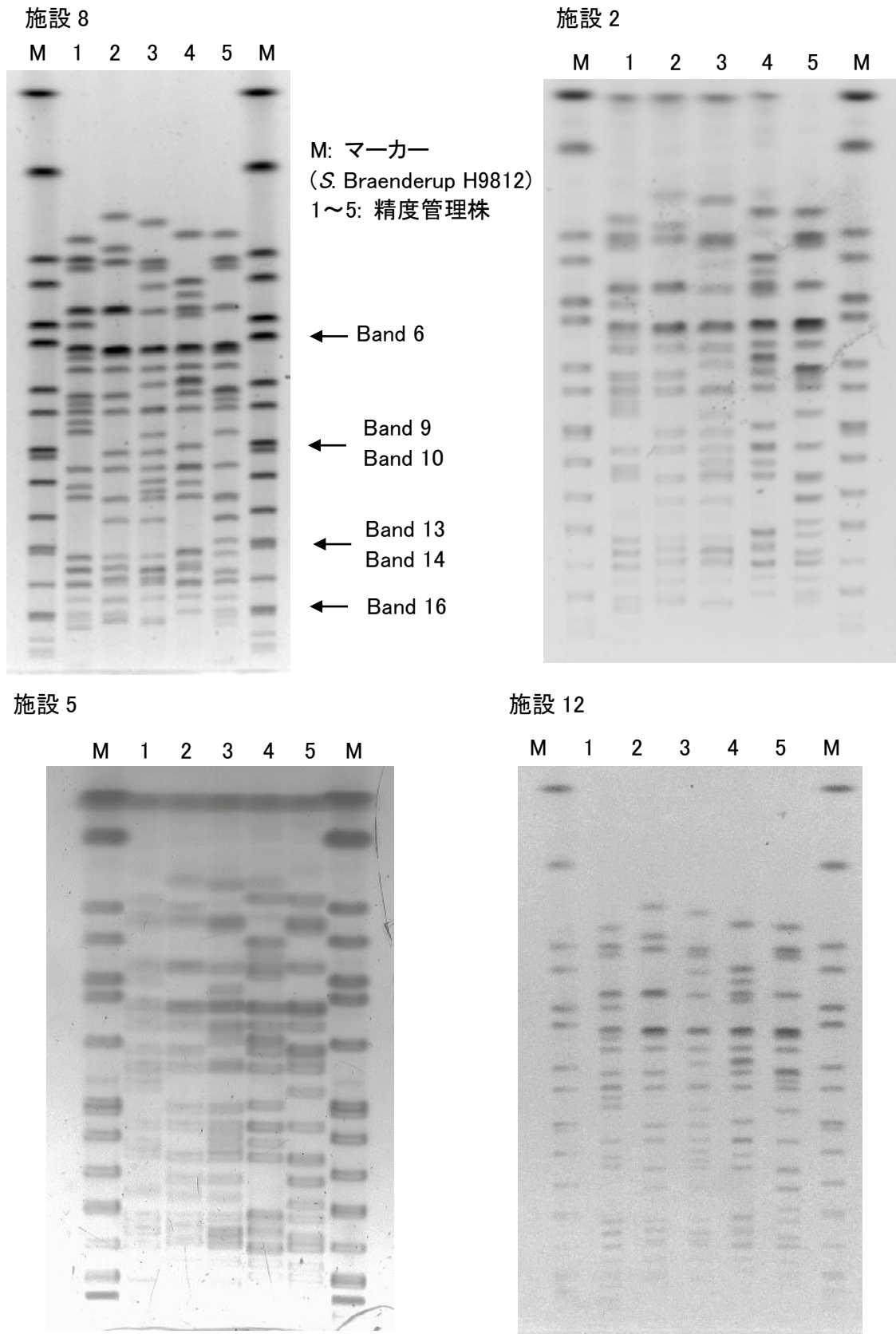


図4 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像例

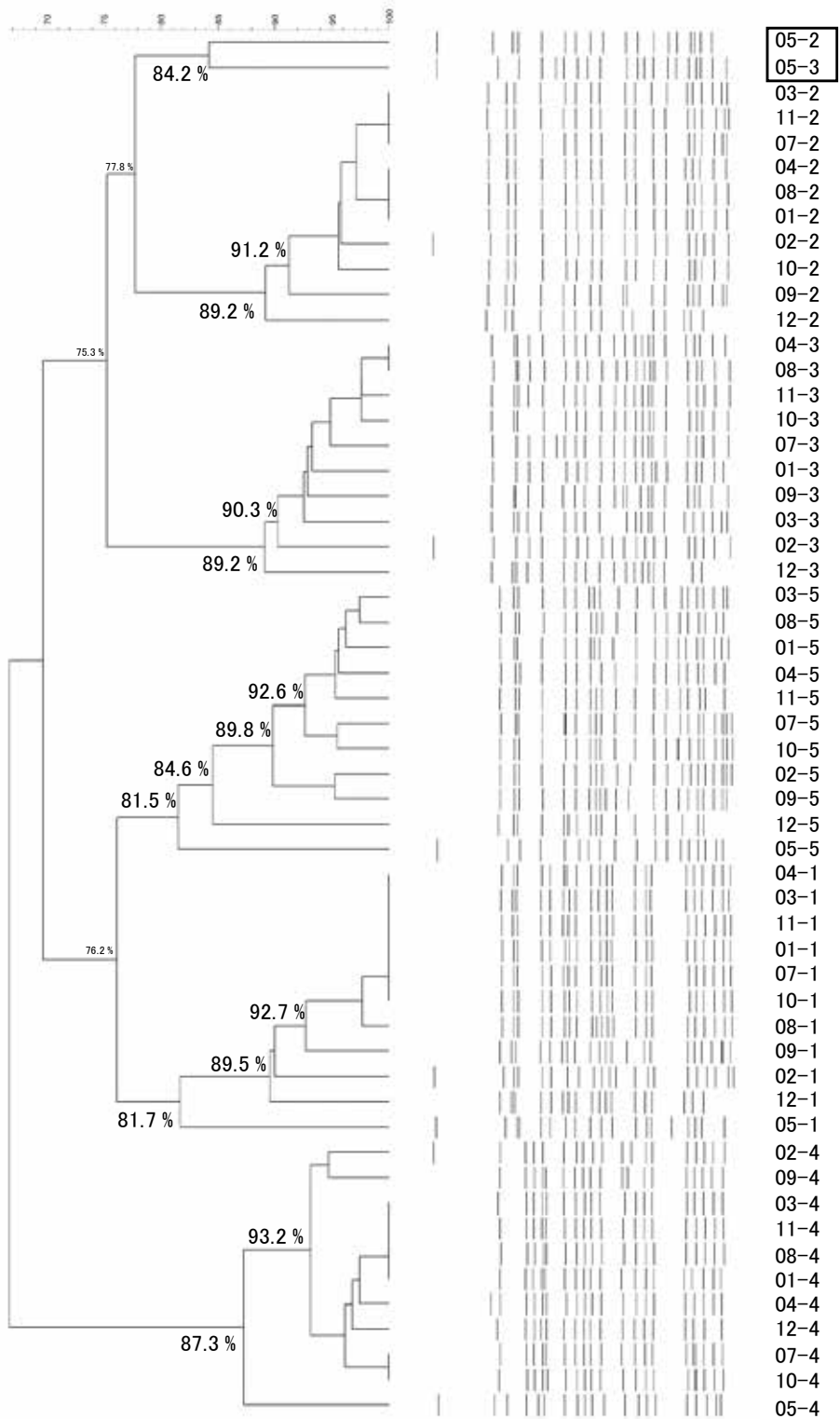


図5 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
平成 29 年度 分担研究報告書
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	河合 央博	岡山県環境保健センター
研究協力者	大友 麗	鳥取県衛生環境研究所
	福間 藍子	島根県保健環境科学研究所
	酒井 智健	〃
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田 加奈子	〃
	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 恭晴	〃
	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
	園部 祥代	愛媛県立衛生環境研究所
	阿部 祐樹	〃
	高木 春佳	高知県衛生研究所
	戸梶 彰彦	〃
	狩屋 英明	岡山県環境保健センター
	仲 敦史	〃
	中嶋 洋	〃

研究要旨

食品由来感染症の広域発生事例が発生した場合、各地域の事例間の関連性を明らかにするためには、事例由来株の分子疫学解析結果等を共有し、比較・解析を行うことが有用となる。その際、各地域の施設が実施した分子疫学解析結果を用いて解析等を行うため、各施設における分子疫学解析手法の技術維持や解析精度の向上が不可欠かつ重要となる。そこで、中四国ブロック内の施設を対象に、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、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では検査法の改良や判定方法を含めた技術の習熟が必要と思われた。

平成 29 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、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し解析した結果、同一の分子疫学解析結果である感染事例が複数の県で確認されたが、いずれの事例間でも関連は不明であった。

分子疫学解析結果を用いた広域な菌株データベースの構築は、広域事例発生の迅速な

探知、さらには感染源の究明、感染拡大防止対策の構築等、事例への対応に有益なものとなると考えられる。データベースをさらに有意義に活用するためには、分子疫学解析技術の維持や精度の向上はもちろんであるが、疫学情報をいかに収集し、データベースに組み込むかが今後の課題と思われる。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域事例が発生した場合、事例間の関連性を明らかにするためには、事例由来株の分子疫学解析結果の比較・解析が有用であり、適切に解析を行うには、技術の維持と解析精度の向上が不可欠かつ重要である。このため、全国6ブロックの各地域で各種解析手法の精度管理を実施している。中四国ブロックでは、平成27、28年度に引き続き平成29年度もIS-printing System（以下、IS-PSと言う）、パルスフィールドゲル電気泳動法（以下、PFGE法と言う）、multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis（以下、MLVA法と言う）について、腸管出血性大腸菌（以下、EHECと言う）O157株を用いた精度管理を実施するとともに、解析技術の問題点等を考察した。また、ブロック内でのEHEC発生事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し、関連性や流行株等を解析した。

B. 研究方法

1. 使用菌株（表1）

精度管理：ウシ直腸内容物由来EHEC O157株 菌株A,B,C,D,E(すべてH7, Stx1, 2) 5株を使用した。

EHEC感染事例解析：平成29年4月から10月までに中四国地域の8県で発生したEHEC感染事例の患者等由来株184株について、中四国地域の9施設で各々の収集株について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-PS (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化し（以下、ISコードと言う）、解析を行った。

(2) PFGE法

PFGE法は感染研ニュープロトコール（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、それぞれの施設のプロトコールにより実施した。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29年度は10施設 ((A) ~ (J)) 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、PFGE法は9施設 ((A)、(C) ~ (J))、MLVA法は4施設 ((D)、(E)、(F)、(I)) で実施した。IS-PSは、各primer setの増幅産物の有無から作成したISコード及び泳動像を、PFGE法は、泳動像と解析ソフトを使用して作成した dendrogram を回収し、解析した。また、MLVA法は各遺伝子座のリポート数を比較解析した。

3. 疫学情報の収集と解析

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疫学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、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。泳動像はいずれの施設もバンドが認識でき、概ね良好であった。IS コードは多くの施設が一致したが、3 施設 ((A), (H), (J)) では 1st set primer の IS コードが他施設とは異なった。これは、1st set primer の菌株 B の「1-06」、菌株 E の「1-10」、さらに「*hlyA*」の判定に違いが見られたことによるものであった。

(2) PFGE 法による解析

PFGE 法の精度管理は、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、結果をまとめたものを表 3 に示した。

泳動像は、鮮明さ(解像度)等の影響もあるが、一部の施設(施設(D))で、54.7Kb(マーカーの上から 15 本目のバンド)付近より下側の低分子量側のバンドが不明瞭であったが、その他の施設は概ね良好であった。目視によりバンドパターンを比較したところ(54.7Kb 以上のバンドで比較)、若干異なる菌株があった。菌株 B では、施設(I)で他施設では見られない 336.5Kb(マーカーの上から 5 本目のバンド)付近のバンドが見られた。菌株 D では、施設(E)で他施設では見られない 138.9Kb(マーカーの上から 11 本目のバンド)付近のバンドが見られ、さらに施設(I)では、逆に他施設で見られる 167.1bp(マーカーの上から 10 本目のバンド)付近のバンドが見られなかったが、いずれの菌株でも 1 バンドの差異であった。他の菌株ではすべての施設で同一のバンドパターンを示した。また、デンドログラム解析を実施した 8 施設の結果では、類似度の最大値は 94.5%、最小値は 55%であった。類似度の順序は、各施設さまざまに 6 パターンとなった。

(3) MLVA 法による解析

MLVA 法は 4 施設で実施した。3 施設は O157 株の 17 カ所の遺伝子座を、1 施設

は 9 カ所の遺伝子座について、リピート数を解析した。その結果を、表 4 に示した。菌株 C の「O157-34」では施設(D)が、そして菌株 C 及び E の「O157-9」では施設(I)が他施設とは異なるリピート数となった。その他の遺伝子座では、リピート数は一致した。

2. 中四国地域の EHEC 感染事例発生状況と解析結果

中四国地域のうち 8 県で、平成 29 年 4 月～10 月に発生した EHEC 感染事例の患者等由来株について、IS-PS の実施結果及び MLVA 型等を含む疫学情報を収集した。このうち、情報を収集した時点で MLVA 型が決定されていた 184 株(内訳は、O26 株が 74 株、O91 株が 2 株、O103 株が 4 株、O111 株が 11 株、O121 株が 5 株、O157 株が 87 株、O165 株は 1 株)を対象に解析を行った。

その結果、O26 株では、同一の MLVA 型 17m2005 及び MLVAcomplex 17c201 の株が、c 県及び f 県の 2 つの県で検出された(表 5)。O157 株についても、同一の MLVA 型及び MLVAcomplex の菌株が複数の県で検出された。「17m0130、17c013」(MLVA 型、MLVAcomplex の順、以下同じ)の菌株が b 県と f 県で、「17m0121、17c013」及び「17m0129、17c044」が b 県と c 県、そして、「17m0143、17c027」が d 県と h 県で検出された。また、MLVA 型は異なるが同一の MLVAcomplex となった菌株が 3 種類(17c013、17c044、17c027)、複数の県で検出された。その他の O 血清群では、複数の県で同一の MLVA 型等となる菌株は検出されなかった。一方、O157 株の IS-PS では、同一の IS コードとなった菌株が 6 種類(①205457-211242、②317477-611756、③317557-211757、④317577-211756、⑤317577-211757、⑥717557-611657)が複数の県から検出された(表 6)。グループ③内の菌株はすべて同一の MLVAcomplex となったが、その他のグループでは、異なる MLVA 型あるいは MLVAcomplex の菌株が含まれた。

D 考 察

平成 29 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あったが、一部の施設で他施設と異なる結果となり、解析技術や精度の維持、向上が必要であると思われた。IS-PS では、3 施設が 1st set primer の IS コードが他施設とは異なる結果となった。これは、増幅産物の増幅が弱いバンドの判定(取捨)の違いやバンド位置の確認ミス等の原因が考えられた。増幅が弱いバンドの判定については、IS-PS の取扱説明書では、他に比べて明らかに増幅が弱いバンドはエキストラバンドであり結果判定の際に考慮に入れないとなっている。しかし、増幅の弱さの判断基準は検査実施者によって異なることも考えられる。このため、特に、他施設間の IS-PS 結果の比較等解析時は、バンドの有無や IS コードの情報だけで比較するのではなく、泳動像と合わせた確認が必要であると考えられた。併せて、本来明確に出現するバンドが、増幅が弱いバンドとなることも考えられる。これを防ぐためには、テンプレート調製の際、鮮明なバンドが出現するよう適切な濃度調製を行う必要もあると思われた。また、バンド位置の確認では、サンプルの増幅バンド位置と、Standard DNA あるいは Template Mix の増幅バンド位置との異同判定が困難となる場合がある。このようなケースに対応するため、泳動距離が長いゲルを使用する等工夫し、正確に判定する必要があると考えられた。

PFGE 法による解析は、多くの施設が良好な泳動像を示したが、一部の施設で他施設と異なるバンドが出現した菌株があった。検査を始めるまでの菌株の保管中に変異した等の要因が考えられたが不明であった。また、デンドログラム解析結果では、類似度の順番が施設によって異なり、施設間で違いが見られた。これは、先述したとおり異なるバンドが出現した菌株があったこと、さらに一部施設で低分子量側のバンドが不明瞭であったこと

や、検査実施者によるバンド位置の指定の差や、濃く太いバンドを 1 バンドとするところと 2 バンドとするところと違いが見られたことによるものと考えられた。PFGE 法はバンドの位置の指定等が異なることで解析結果に影響するため、サンプル菌液の濃度調製や制限酵素による消化反応、さらには染色を確実に行う等、明瞭なバンドが出現するよう技術を習熟し、慎重な解析が必要と思われた。

MLVA 法は、実施した 4 施設のうち 2 施設で結果が異なったが、その要因は不明であった。MLVA 法は、各遺伝子座のリポート数を基に型別する方法であるため、今後、特に多施設の MLVA 法の結果を集約したデータベースを構築するには、解析技術等の問題点・改善点の洗い出しを行い、精度の向上が必要と思われた。MLVA 法は分離能が PFGE 法とほぼ同等で高く、解析時間が PFGE 法と比べて短時間である等のメリットがある。また、本年度より、国立感染症研究所では、O157、O26、O111 に加え、O91、O103、O121、O145、O165 の血清群について解析を実施しており、多くの血清群について MLVA 法による解析が可能となり、今後ますます MLVA 法の利用度が高くなることが予想される。このようなことから今後 MLVA 法の導入を検討する施設も増加することが考えられ、精度維持や向上のためには導入検討施設に対する技術的支援も重要であると思われた。

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 株は 1 種類、O157 株は 3 種類の同一 MLVA 型あるいは MLVAcomplex の菌株が複数の県から検出された。これらの中には、本年度、関東地方を中心に広域的に発生した EHEC O157 による感染症や食中毒事例の MLVAcomplex 17c013 もあり、また、17c027 及び 17c044 も同様に広域で見られた MLVAcomplex であったが、同一 MLVA 型等での事例間での関連は不明であった。一方で、O157 株の IS-PS では、複数の県から検出された同一 IS コードの

菌株は6種類となったが、同一ISコードとなった事例間の関連も不明であった。同一ISコードの菌株間でも、MLVA型あるいはMLVAcomplexは異なる型が存在し、また逆に、同一のMLVA型あるいはMLVAcomplexの菌株であってもISコードが異なるケースもあった。しかし、疫学的関連性のある家族内事例では、ISコード、MLVA型あるいはMLVAcomplexが同一となった。IS-PS法の分離能は、MLVA法やPFGE法に比べやや劣ると言われている。しかし、手技が非常に簡便で迅速に解析が行えるといった利点があり、疫学的関連がある場合、迅速スクリーニング法として用いるには有効であると思われる。

今回、複数の県で分子疫学解析結果が同一となる事例がいくつか見られたが、疫学情報が少なく、これらの事例間での関連は不明であった。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ため、構築するデータベースに疫学情報をいかに組み込むかが今後の課題と思われる。

E 結論

1. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 株を用いて、IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。いずれの方法においても、概ね良好な結果が得られたが、一部の施設で結果が異なった。
2. IS-PS では、増幅が弱いバンドの判定の違いやバンド位置の確認ミスが見られた。また、PFGE 法では、低分子量側バンドが不明瞭となったところや施設間でバンド位置の指定の違いが見られた。いずれの方法でも、鮮明な泳動像が得られるよう検査技術の習熟や工夫が必要である。
3. MLVA 法は、解析技術等の問題点・改善点の洗い出しを行い、精度の向上が必要と思われた。
4. 中四国地域の複数の県で MLVA 型等分子疫学解析結果が同一となる事例がいくつか見られたが、事例間での関連は不

明であった。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ため、構築するデータベースに疫学情報をいかに組み込むかが今後の課題である。

F. 研究発表

なし。

表1 精度管理使用 EHEC 菌株

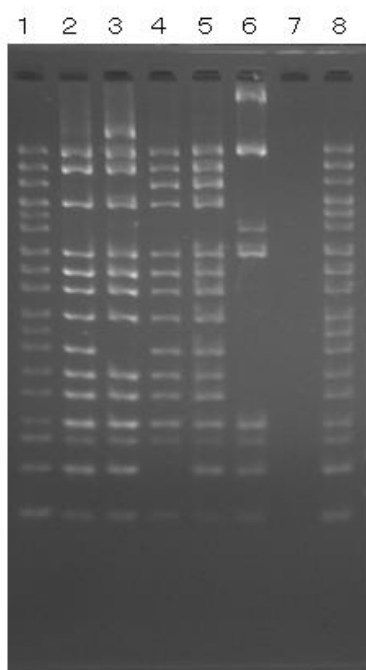
菌株No	血清型		Stx型	備考
	O群	H型		
A	157	7	1, 2	平成12年分離 ウシ直腸内容物由来株
B	157	7	1, 2	平成12年分離 ウシ直腸内容物由来株
C	157	7	1, 2	平成12年分離 ウシ直腸内容物由来株
D	157	7	1, 2	平成23年分離 ウシ直腸内容物由来株
E	157	7	1, 2	平成24年分離 ウシ直腸内容物由来株

表2 IS-PS による解析結果

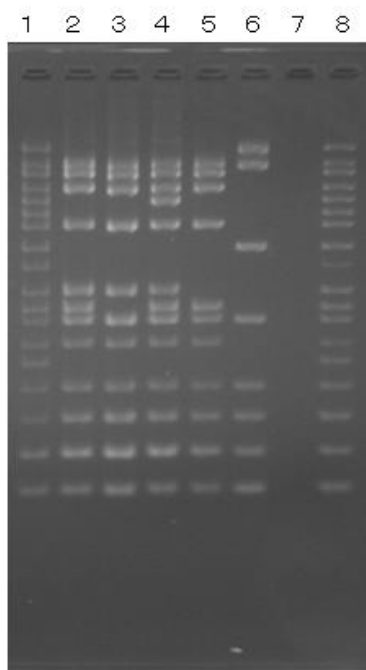
施設名	菌株A		菌株B		菌株C		菌株D		菌株E	
	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code
(A)	317573	611757	317173	611557	717575	631757	717573	611657	141043	302447
(B)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(C)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(D)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(E)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(F)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(G)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(H)	317577	611757	357177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(I)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(J)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141147	302447

(C)

1st



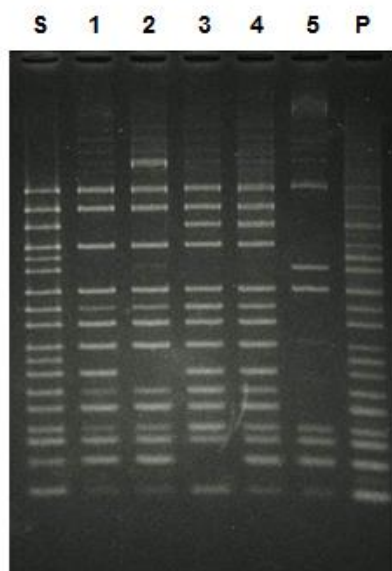
2nd



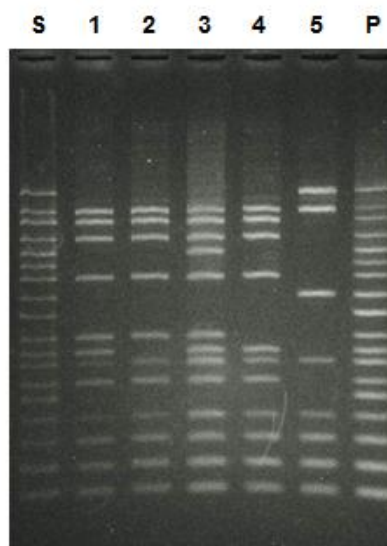
レーン	
1	Std
2	A
3	B
4	C
5	D
6	E
7	NC.
8	P.C.

(D)

[1st set]

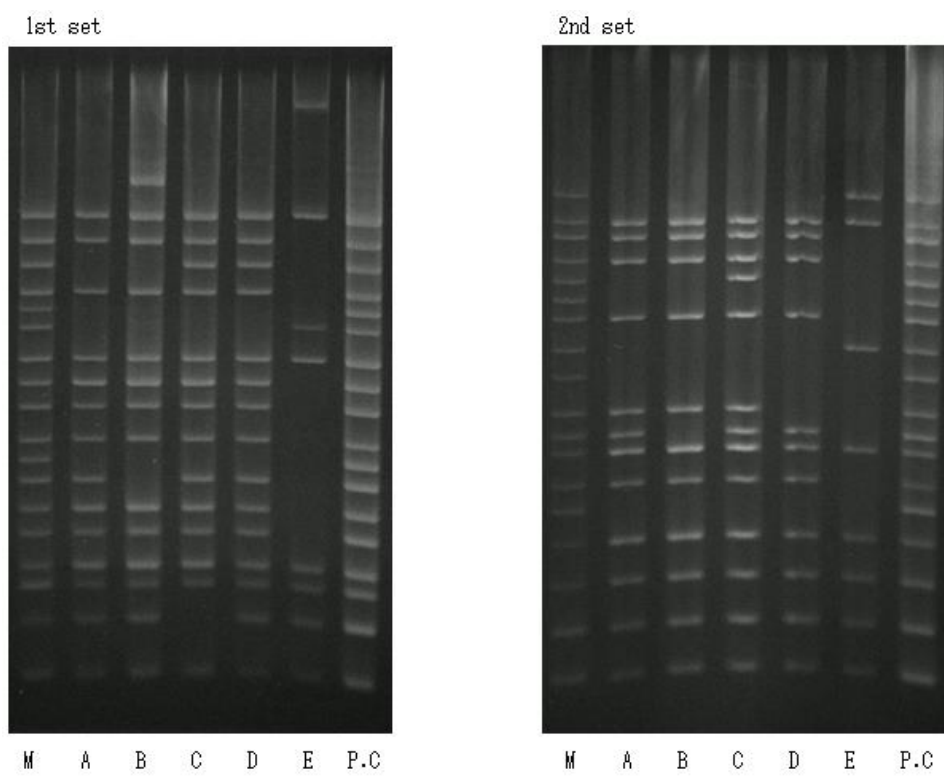


[2nd set]

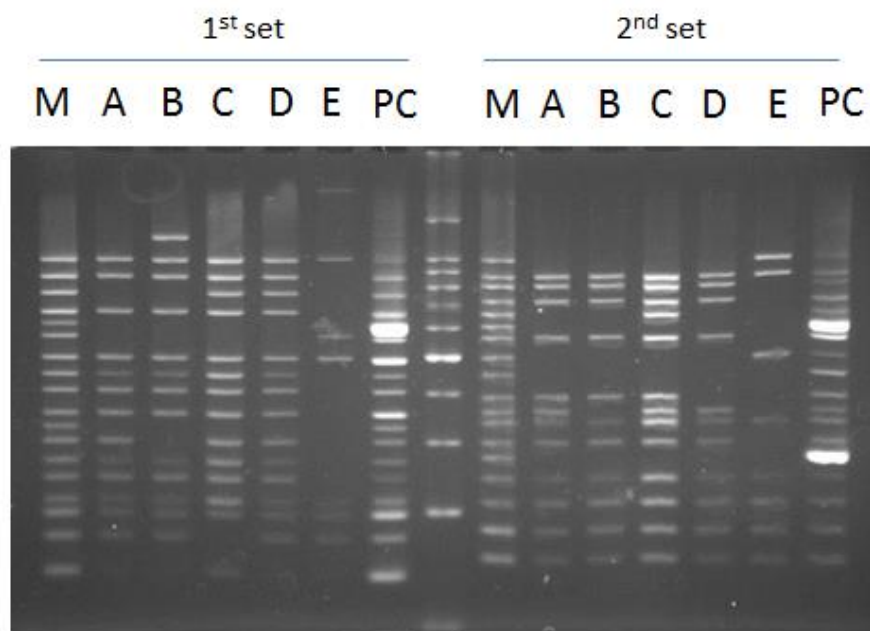


S	: Standard DNA
1	: A
2	: B
3	: C
4	: D
5	: E
P	: PCR Template DNA

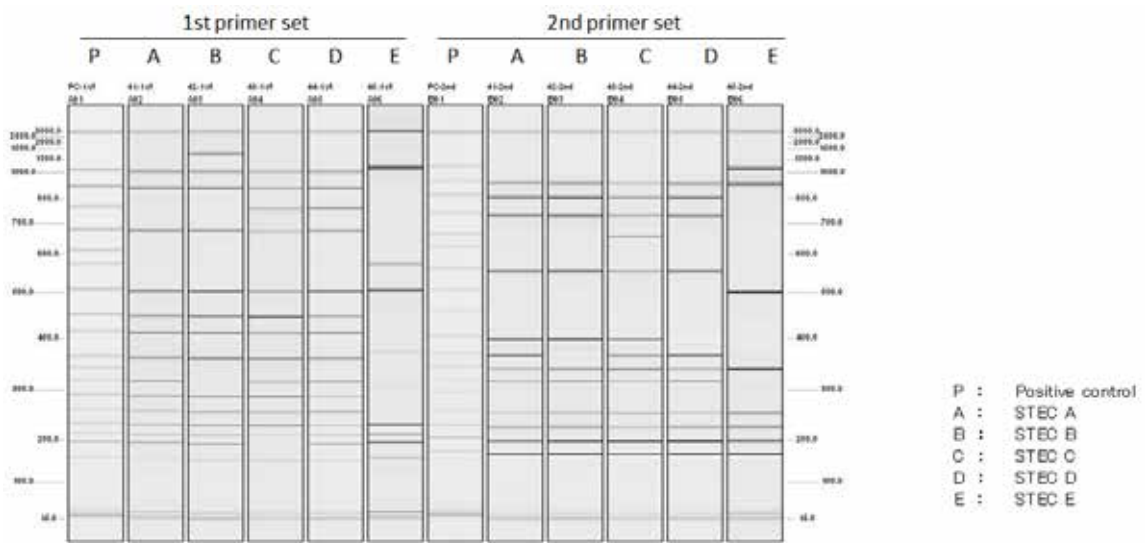
(E)



(F)



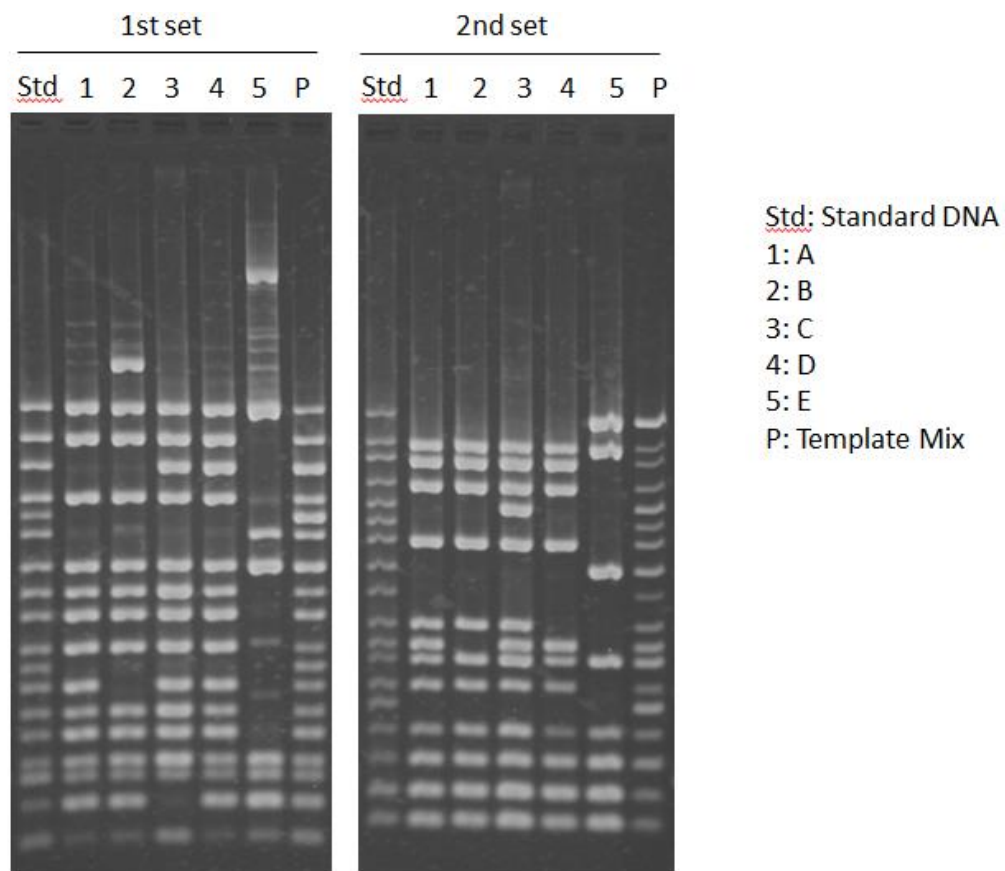
(G)



(H)



(I)



(J)

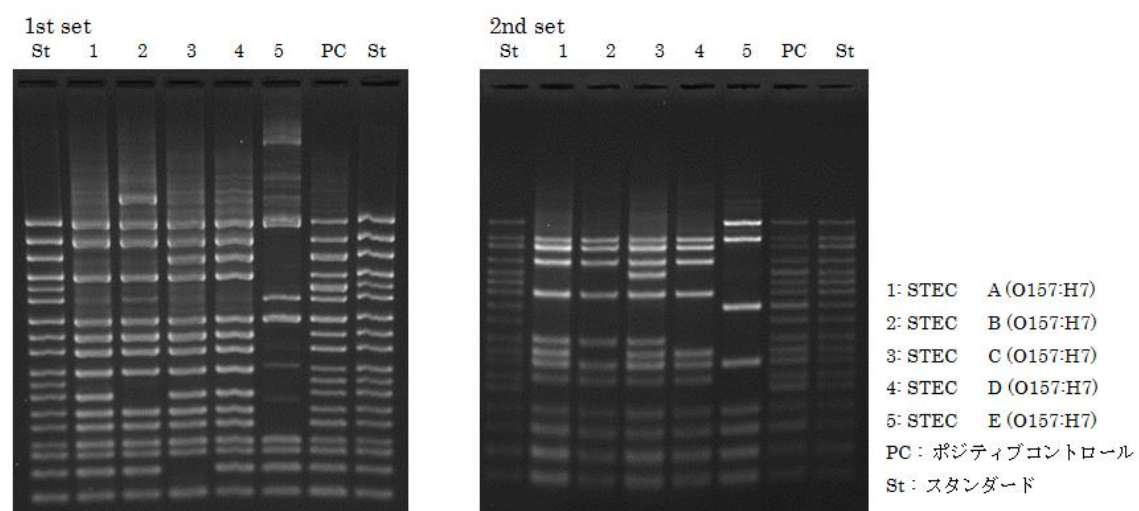
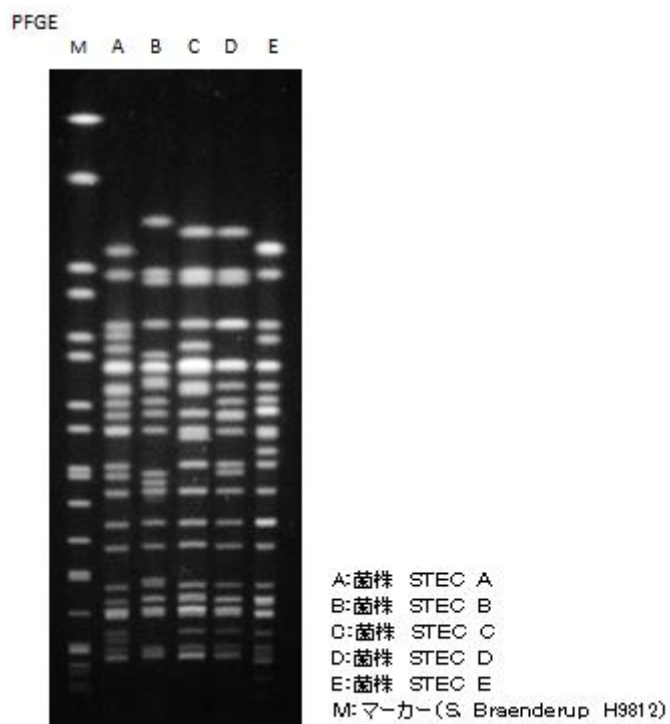
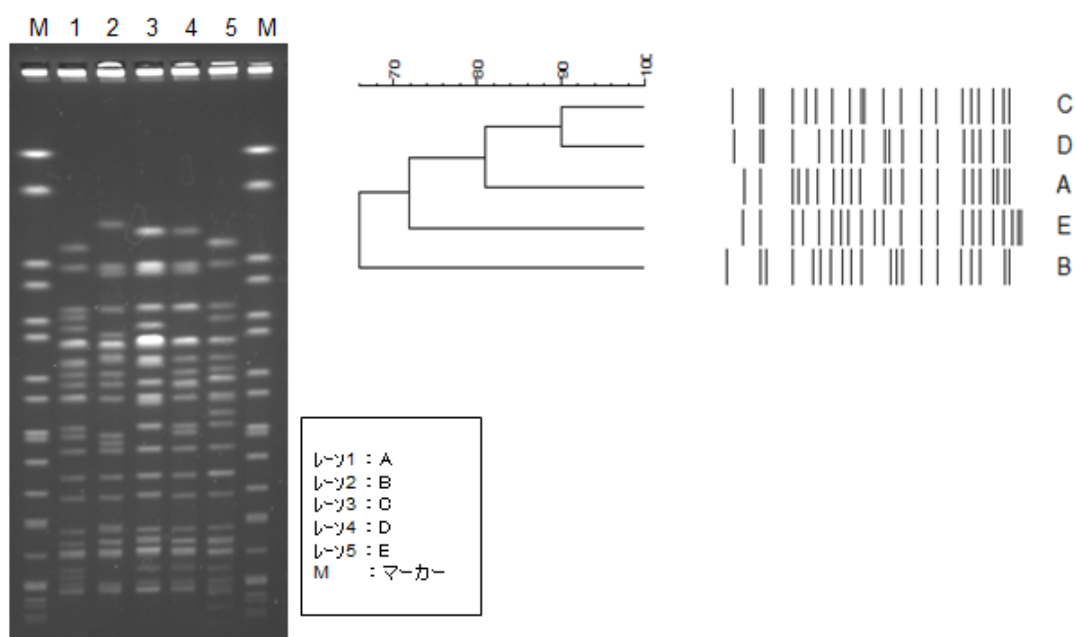


図2 PFGE 法による泳動像とデンドログラム解析結果

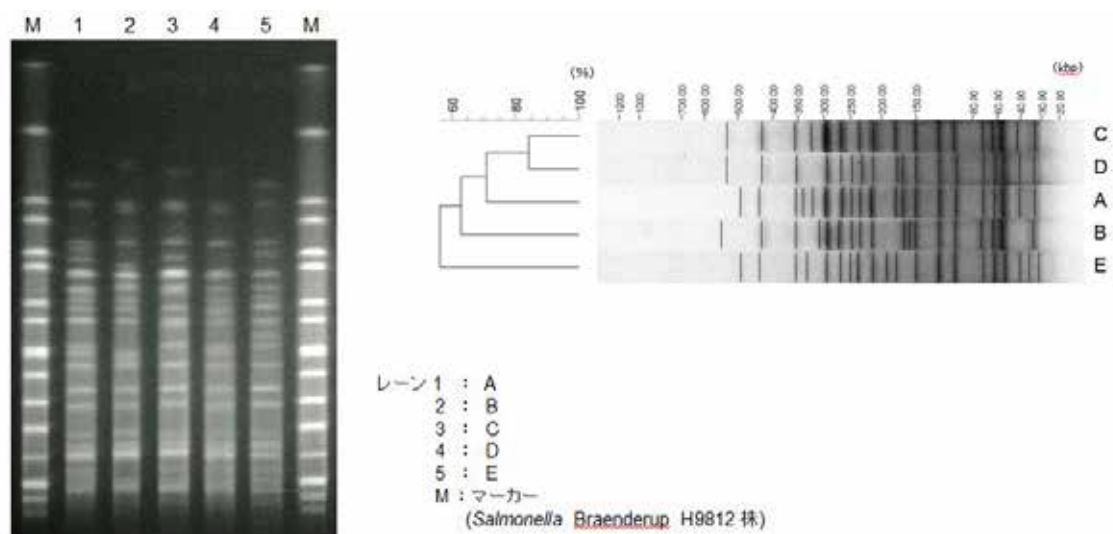
(A)



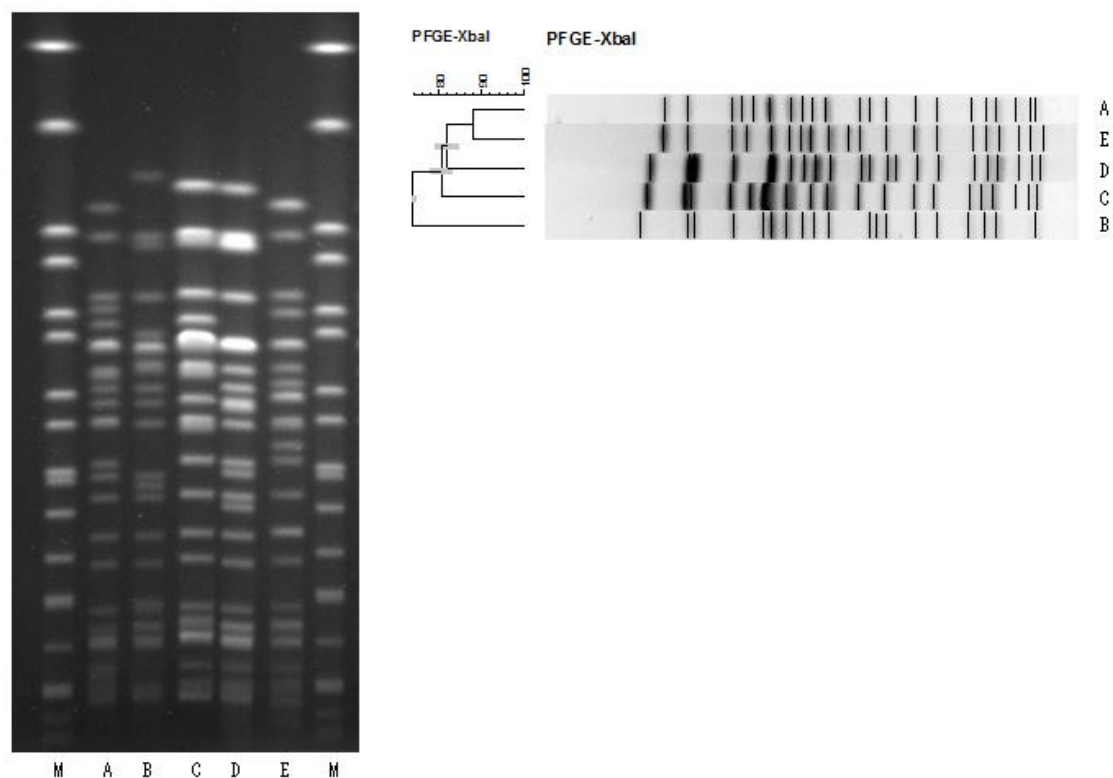
(C)



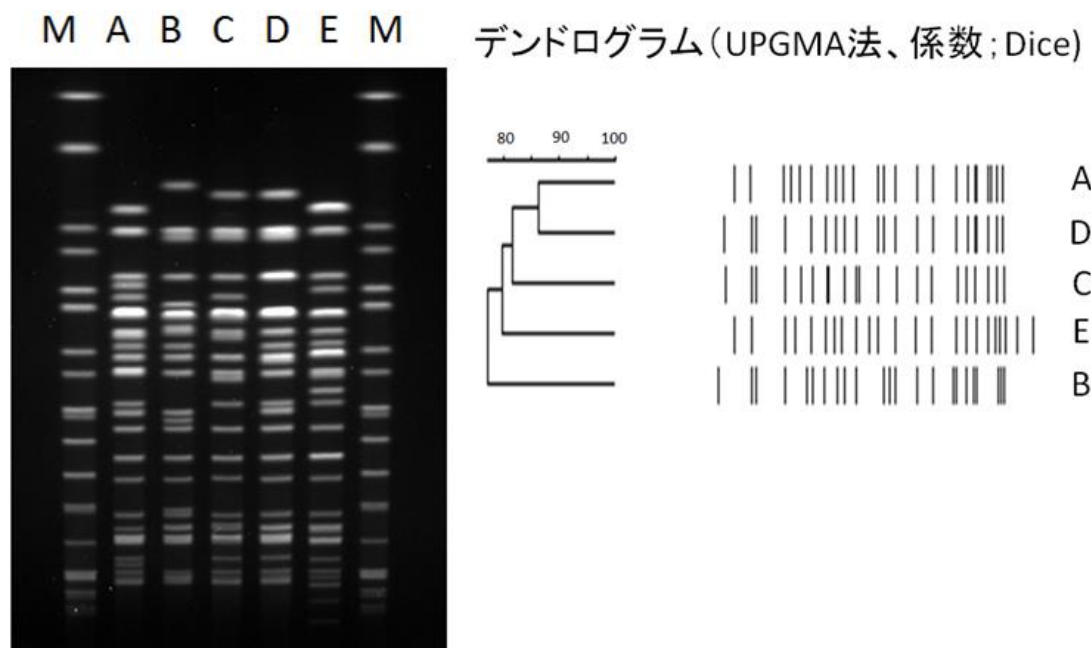
(D)



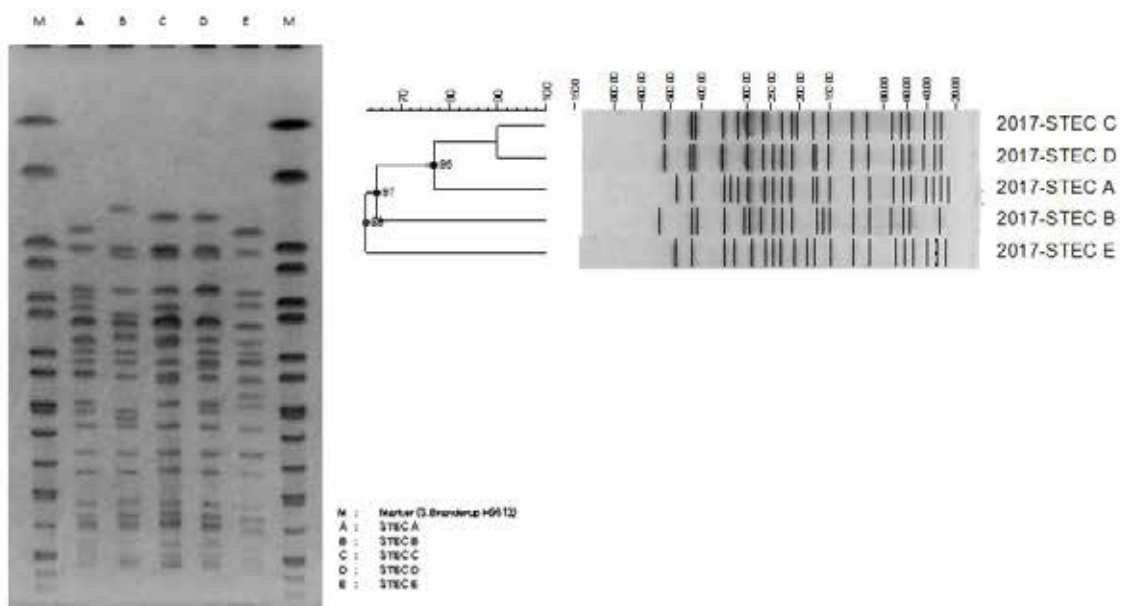
(E)



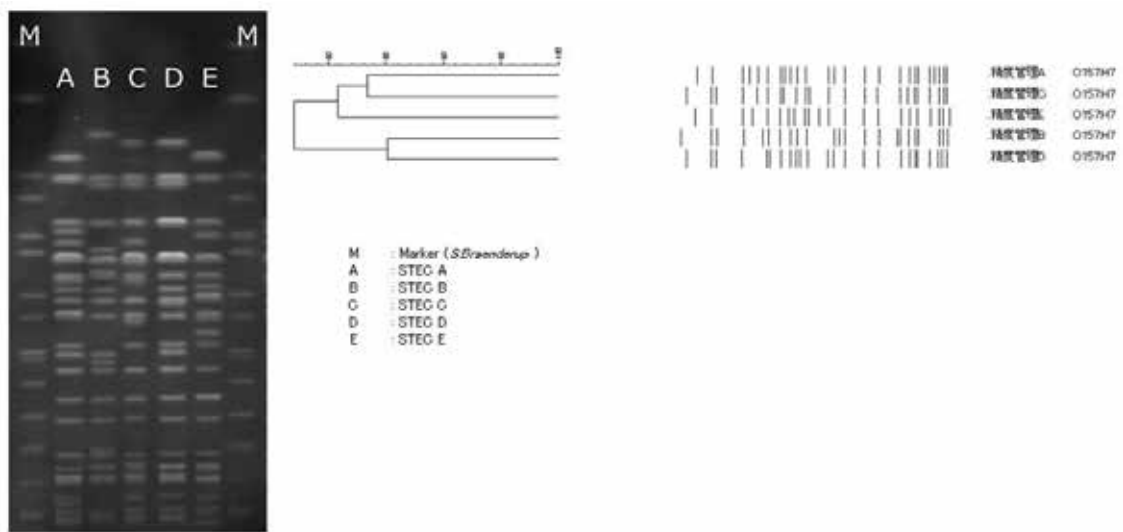
(F)



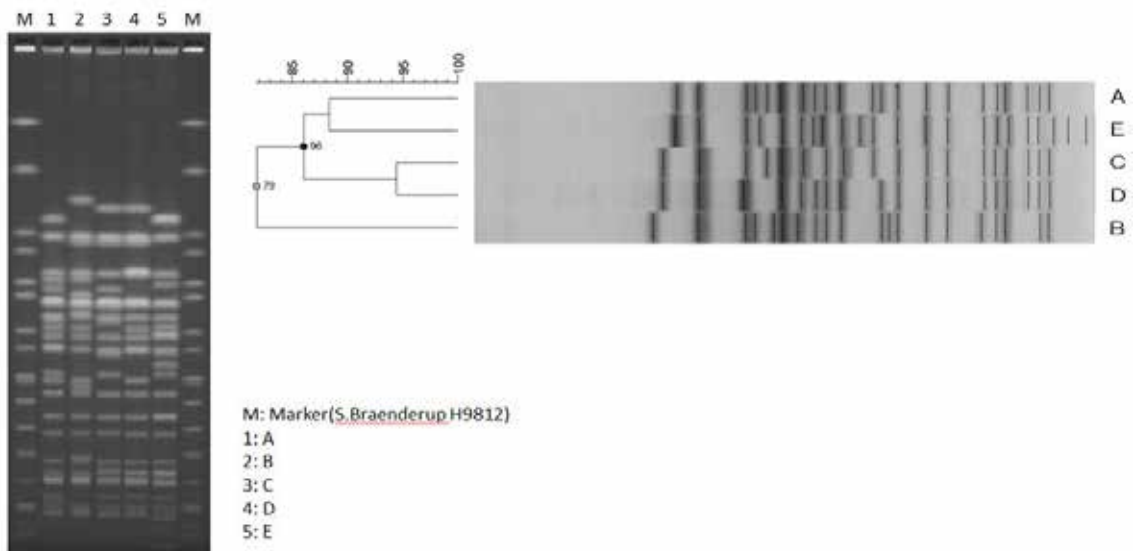
(G)



(H)



(I)



(J)

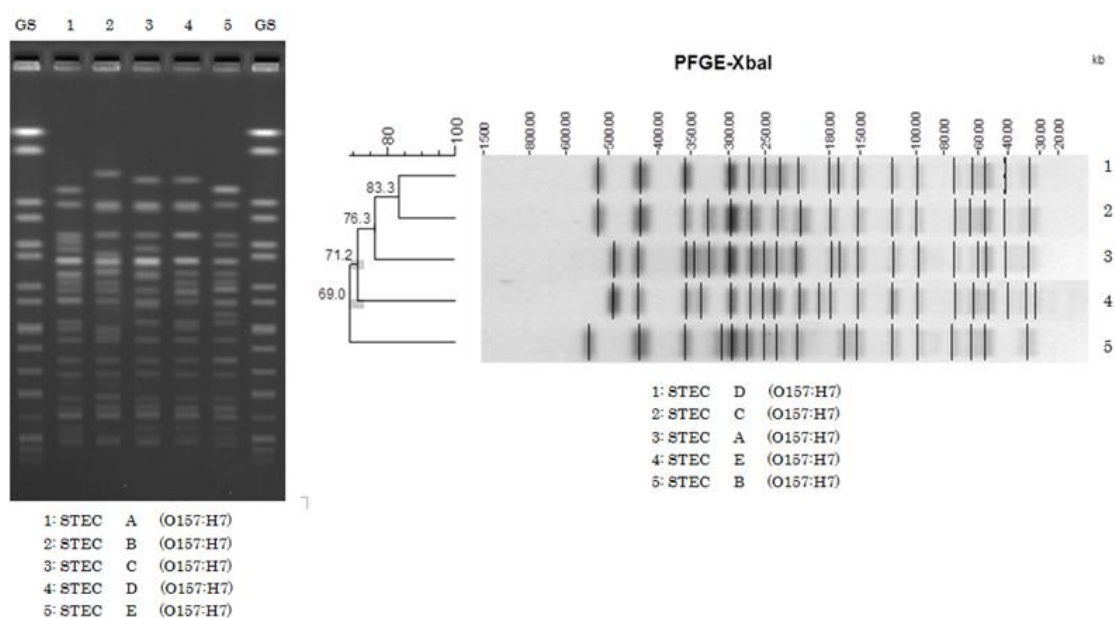


表3 PFGE法によりデンドログラム解析結果

施設名	デンドログラム解析結果
(A)	デンドログラム解析せず
(B)	PFGE法実施せず
(C)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株E ⇒ 菌株B (90→66%)
(D)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株B ⇒ 菌株E (85→55%)
(E)	菌株A - 菌株E ⇒ 菌株D ⇒ 菌株C ⇒ 菌株B (88→74%)
(F)	菌株A - 菌株D ⇒ 菌株C ⇒ 菌株E ⇒ 菌株B (86→78%)
(G)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株B ⇒ 菌株E (90→63%)
(H)	菌株A - 菌株C ⇒ 菌株E ⇐ 菌株B - 菌株D (85→77%)
(I)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A - 菌株E ⇒ 菌株B (94.5→82%)
(J)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株E ⇒ 菌株B (83.3→69.0%)

-:左右の菌株でグループ形成、 ⇒:矢印の方向へ類似度が低くなる

表 4 MLVA 法による解析結果

菌株	施設		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	O157-10
	(D)	(E)																		
菌株A	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	4	-2	-2	10	11	17	4	8	6	9	6	6	23
	(E)	(F)	2	-2	1	4	-2	4	-2	10	9*	17	4	8	6	9	6	9	6	6
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	4	-2	10	11	17	4	8	6	9	6	9	6	6
	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	4	-2	10	11	17	4	8	6	9	6	9	6	6
菌株B	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	11	12	3	6	6	13	7	7	5
	(E)	(F)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	9*	12	3	6	6	13	7	7	5
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	11	12	3	6	6	13	7	7	5
	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	11	12	3	6	6	13	7	7	5
菌株C	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	13	11	4	8	4	10	7	26
	(E)	(F)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	10*	11	4	8	4	10	7	26
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	12	11	4	8	4	10	7	26
	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	12	11	4	8	4	10	7	26
菌株D	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	7
	(E)	(F)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	9*	13	7	7	5	3	7	26
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	26
	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	26
菌株E	(D)	(E)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	8
	(E)	(F)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	7*	9	4	3	5	5	8	31
	(F)	(D)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	31
	(D)	(E)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	31

*:ODCプライマー使用のため、2ずつ異なっている。

表5 複数県で発生した EHEC の同一 MLVA 型あるいは MLVAcomplex 株による事例

グループ	県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	Stx型	MLVA型	MLVA complex	備考(疫学的関連など)
I	c	17006	4	26	11	1	17m2006	17c201	
	f	EHI7-8	6	26	11	1	17m2006	17c201	EHI7-8の家族
		EHI7-9	7	26	11	1	17m2006	17c201	
II	b	2027	8	157	7	2	17m0130	17c013	
	f	EHI7-13	8	157	7	2	17m0130	17c013	
	b	2017	8	157	7	2	17m0144	17c013	2026の家族
		2026	8	157	7	2	17m0144	17c013	
	b	2023	8	157	7	2	17m0121	17c013	2023の家族
		2033	8	157	7	2	17m0121	17c013	
	c	EHI7-12	8	157	7	2	17m0121	17c013	
	c	EHI7-13	8	157	7	2	17m0121	17c013	EHI7-13の家族等(家族及びいこ)
		EHI7-14	8	157	7	2	17m0121	17c013	
		EHI7-15	8	157	7	2	17m0121	17c013	
		EHI7-16	8	157	7	2	17m0121	17c013	
EHI7-17		8	157	7	2	17m0121	17c013		
	EHI7-18	8	157	7	2	17m0121	17c013		
III	b	2035	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	2035の家族
		2038	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	
	b	2032	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	
	c	17013	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	
	e	9	9	157	7	1, 2	17m0340	17c044	
IV	b	2022	8	157	7	1, 2	17m0210	17c027	
	b	2043	8	157	7	1, 2	17m0210	17c027	
	b	2046	8	157	7	1, 2	17m0210	17c027	
	d	17Y08	8	157	7	1, 2	17m0143	17c027	
	h	他24	9	157	7	1, 2	17m0143	17c027	

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

グループ	県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	Stx型	IS-PS		MLVA型	MLVA complex	備考(疫学的関連など)
							1st primer code	2nd primer code			
①	b	2027	8	157	7	2	205457	211242	17m0130	17c013	
	f	EHI7-13	8	157	7	2	205457	211242	17m0130	17c013	
	b	2017	8	157	7	2	205457	211242	17m0144	17c013	2026の家族
		2026	8	157	7	2	205457	211242	17m0144	17c013	
	b	2023	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	2023の家族
		2033	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
	c	EHI7-12	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
	c	EHI7-13	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	EHI7-13の家族等 (家族及びいとこ)
		EHI7-14	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-15	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-16	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-17	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-18	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
b	2049	10	157	7	2	205457	211242	17m0438	17c056	2049の家族	
	2050	10	157	7	2	205457	211242	17m0438	17c056		
	2052	10	157	7	2	205457	211242	17m0439	17c056		
②	d	17Y02	6	157	7	1, 2	317477	611756	17m0070		
	b	2028	8	157	7	1, 2	317477	611756	17m0227		
③	b	2035	8	157	7	1, 2	317557	211757	17m0129	17c044	2035の家族
		2038	8	157	7	1, 2	317557	211757	17m0129	17c044	
	b	2032	8	157	7	1, 2	317557	211757	17m0129	17c044	
	e	9	9	157	7	1, 2	317557	211757	17m0340	17c044	
④	b	1994	5	157	7	1, 2	317577	211756	17m0017		
	c	EHI7-11	8	157	7	1, 2	317577	211756	16m0374		
⑤	b	2022	8	157	7	1, 2	317577	211757	17m0210	17c027	
	b	2043	8	157	7	1, 2	317577	211757	17m0210	17c027	
	d	17Y08	8	157	7	1, 2	317577	211757	17m0143	17c027	
	h	他24	9	157	7	1, 2	317577	211757	17m0143	17c027	
	f	EHI7-17	8	157	7	1, 2	317577	211757	16m0085		
⑥	b	2000	6	157	7	1, 2	717557	611657	17m0078	17c008	2000の家族
		2001	6	157	7	1, 2	717557	611657	17m0079	17c008	
	b	2004	6	157	7	1, 2	717557	611657	17m0186		
	d	17Y20	10	157	7	1, 2	717557	611657	14m0028		

島根県で分離された腸管出血性大腸菌 O26 の分子疫学的解析

研究協力者 島根県保健環境科学研究所

福間 藍子 酒井 智健

研究要旨

2017年に島根県で分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）O26 7株について、PFGE法による解析を行い、MLVA法の解析結果との比較を行った。その結果、これら7株はPFGE法では1バンド以内の相違、MLVA法では1遺伝子座以内の相違を示し、2つの分子疫学的解析から共に密接な関連性が示唆された。また疫学情報からも関連性が認められたことから、今回解析した7株は同一集団感染事例由来株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には、従来から実施されているパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法の他に、近年開発されたIS-printing System（IS）法やMulti-locus variable number tandem repeat analysis（MLVA）法がある。IS法は、迅速かつ簡便性に優れた方法であるが、実用化されているものはまだO157のみで、その他の血清型についてはまだ研究段階である。国立感染症研究所（感染研）におけるMLVA法による解析は、これまでのEHEC O157, O26, O111に加え、2017年よりO103, O121, O145, O165, O91が追加された。

本研究では、2017年に島根県内で分離されたO26 7株について、PFGE法とMLVA法による分子疫学的解析から、これら7株の関連性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株（表1）

2017年に島根県で届出のあったO26感染症7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

感染研の方法に準拠した¹⁾。制限酵素はXba I（Takara）を用い、電気泳動はBIO-RAD CHEF MAPPER（Bio-Rad）を用いて6V/cm、パルスタイム2.2-54.2秒、14℃の条件で19時間行った。PFGE法において、感染研の示した分類では、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た²⁾。

(2) MLVA法

菌株を感染研に送付し、解析を依頼した。MLVA法においては、相違する部位数が0の場合は一致、1の場合は密接に関係、2の場合は関係する可能性がある、3以上は不一致と解釈した²⁾。

C. 研究結果

(1) PFGE法（図1）

EHEC O26 7株は、PFGE法により2パターンに分類された（図1）。SE17007及びSE17009は同一パターンを示し、SE17008, SE17010～SE17013も同一パターンを示し

た。SE17007 及び SE17009 のパターンと SE17008, SE17010～SE17013 のパターンは、1 バンドの相違を示したことから、これら 7 株は密接な関係が示唆された。

(2) MLVA 法 (表 1)

EHEC O26 7 株の MLVA 法による解析結果は表 1 に示した。SE17007～SE17013 (SE17010 を除く) の 6 株の MLVA 型は 17m2162 で一致していた。SE17010 株の MLVA 型は 17m2163 で、1 遺伝子座違いであった。そして、これら 7 株はすべて同一の MLVA complex 17c219 に分類された。

D. 考察

2017 年に島根県内で分離された EHEC O26 7 株について、PFGE 法及び MLVA 法による解析を行った。今回解析した 7 株のうち、PFGE 法で 1 バンドの相違を示した株 (SE17007, SE17009) と、MLVA 法で 1 遺伝子座違いを示した株 (SE17010) は、異なる株であった。しかし、これら 7 株は、PFGE 法で 1 バンド以内の相違、また MLVA 法で 1 遺伝子座違い以内の相違を示していたことから、密接な関連性が示唆された。

またこれら 7 株はすべて同時期に A 保育園を利用した人またはその家族から分離された株であり、疫学情報からも関連性が認められた。

今回解析した O26 7 株は、分子疫学的解析及び疫学情報から共に密接な関連性が認められたことから同一集団感染事例由来株と考えられた。

PFGE 法は、手技は煩雑で、時間を要するなどの問題点はあるが、識別能が高く、今回のような県内における集団感染事例などの

場合には有用な方法である。

MLVA 法は、迅速かつ簡便で、広域集団感染事例などの場合において、異なる施設間の比較が可能な方法である。しかし、現在、当所では MLVA 法は実施しておらず、感染研に解析を依頼しているため、解析結果が得られるまでに要する時間は感染研に依存するなどの課題がある。今後、当所においても MLVA 法の導入を検討する必要があるかもしれない。

E. 結論

今回解析した O26 7 株は、分子疫学的解析及び疫学情報から共に密接な関連性が認められたことから同一集団感染事例由来株と考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) 寺嶋敦 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) 病原微生物検出情報: 腸管出血性大腸菌の分子型別. Vol. 35 No.5 (2014.5), 129-130.

表 1. 腸管出血性大腸菌 O26 の菌株の概要と MLVA 法による解析結果

菌株番号	血清型	毒素型	MLVA 型	MLVA complex	届出日	発症日	年齢	患者性別	疫学情報	症状
sE17007	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/1	2017/8/26	1	F	A 保育園利用者	水溶性下痢、発熱、咳、鼻水、膿痂疹
SE17008	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/9	2017/8/25	1	M	A 保育園利用者	発熱、下痢、咳、嘔吐
SE17009	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/11	2017/8/26	0	F	A 保育園利用者	軟便
SE17010	O26:H11	VT1	17m2163	17c219	2017/9/14		1	M	A 保育園利用者	咳、鼻水
SE17011	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/16		31	F	A 保育園利用者	なし
SE17012	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/16		39	F	SE17009 の家族	なし
SE17013	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/16		3	F	A 保育園利用者	なし

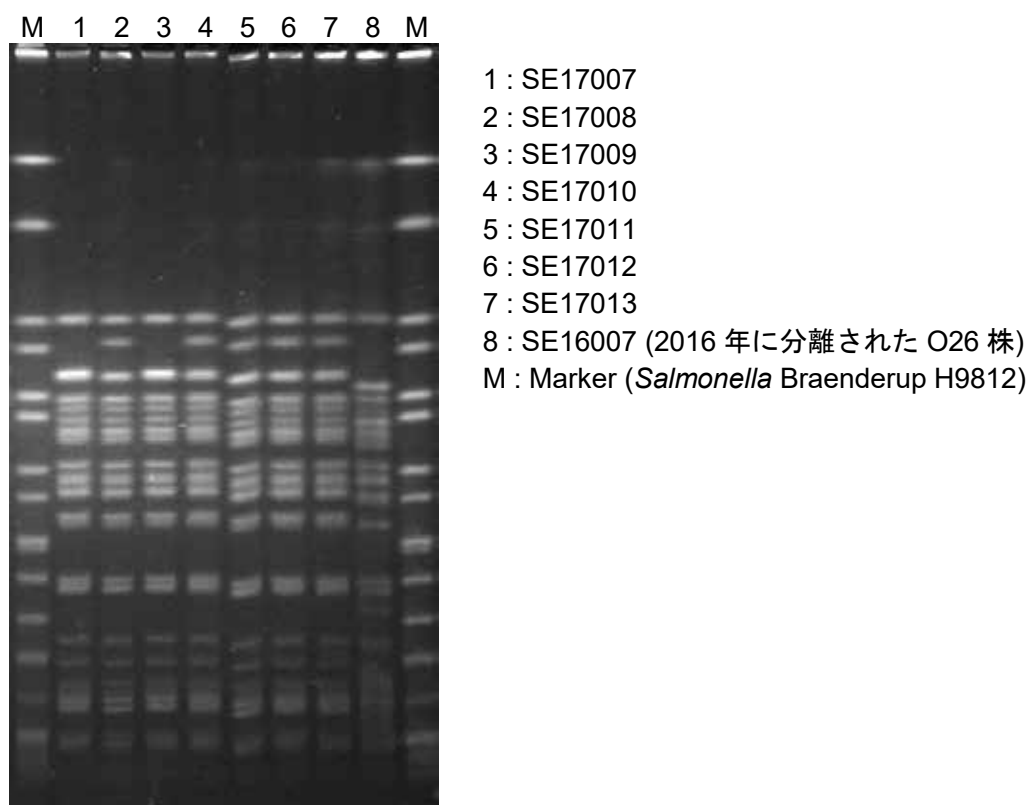


図 1. 腸管出血性大腸菌 O26 の PFGE 法による解析結果

腸管出血性大腸菌 O26 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

平塚 貴大 増田 加奈子

研究要旨

2017年に広島県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 について、分子疫学解析手法として、MLVA 法を実施した。家族内感染事例で分離された菌株は、各事例で同じ MLVA 型を示したが、集団感染事例で分離された菌株は5つの型に分かれた。一方この集団感染事例で分離された菌株について PFGE 法を実施した結果、すべての株で1バンド以内の相違であった。MLVA 法、PFGE 法ともに集団感染を特定するために有用な手法であるが、MLVA 法では、同一の集団感染事例の中でも多型がみられる場合があることが示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症のうち、2017年に広島県内で最も発生届の多かった血清型は O26 であり、3例の家族内感染と、県内の保育所で発生した1例の集団感染事例が含まれていた。今年発生した腸管出血性大腸菌感染症のうち、当所に搬入された O26 の菌株について分子疫学的関連性を明らかにするため、MLVA 法及び PFGE 法を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

広島県内で分離され、2017年に当所へ搬入された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26 28株(菌株番号17-01~42)を用いた。各菌株及び患者の概要を表1に示した。

2. 方法

(1) MLVA 法

Izumiyama らの¹⁾の方法に従い、O157-10を除いた17ヶ所の遺伝子座について解析した。QIAGEN Multiplex PCR Kit

(QIAGEN)を用いて各菌株で2セットの PCR 反応を実施し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 及び 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) を用いてシークエンスを行い、各遺伝子座のリピート数を確認した。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 (MST) 解析を行った。

(2) PFGE 法

国立感染症研究所の方法²⁾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。バンドパターンは, BioNumerics Ver.6.6 を用い, Dice 及び 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。

C. 研究結果

1. MLVA 法

MLVA 法によって解析を行った菌株の各遺伝子座のリピート数(MLVA 型)を, 表 2 に示した。すべての遺伝子座のリピート数が一致した株を MLVA グループとして分類した(G1~G6) (表 2, 図 1)。家族内感染事例と思われる 3 例(事例 A~C)については, 各事例ですべての株の MLVA 型が一致した(表 2)。また, G6 は 17-01 と 2 遺伝子座でリピート数の違いがあったが, 疫学的な関連性はなかった。

集団感染事例(事例 D)で分離された 18 株(17-24~41)は, 大きく 3 つのグループ(G1~G3)と, どのグループにも属さない 2 株(17-30, 17-33)に分類された(図 1)。17-30 は G2, G3 と 2 か所の遺伝子座でリピート数が異なり, 17-33 は G1, G3 と 2 か所の遺伝子座でリピート数が異なっていた。また, 事例 D の中には 4 例の家族内感染が含まれていたが, これらのうち, 3 例(17-24,25,26,27,28/17-31,36/17-32, 37)については各家族内で MLVA 型が一致したが, 1 例(17-33,38,39,40,41)については 17-33 のみが 2 遺伝子座(O157-37, EHC-6)でリピート数が異なった(表 2)。17-33 のリピート数は O157-37 で 5, EHC-6 で 7 であり, 他の 4 株ではどちらもピークが検出されず, 遺伝子座が存在

しないことが予測された。

2. PFGE 法

事例 D で分離された 18 株について, PFGE 法を行った。17-32 以外の 17 株は同一のバンドパターンを示し, 17-32 とは 1 バンドの差があった(図 2)。

D. 考 察

MLVA 法による解析の結果, 家族内感染事例と思われる 3 例(事例 A~C)については, 各事例で MLVA 型が一致した一方で, 集団感染事例(事例 D)で分離された菌株については 5 つの型がみられた。これらの型は最も近い型と 2 遺伝子座以内の違いであったため, 集団感染の一部と考える基準の範囲内であった。一方で, G6 と 17-01 のように, 疫学情報では共通事項がみられない株でも 2 遺伝子座以内の違いになる場合もあるので, MLVA 法による集団感染事例の判断は, 疫学情報を基にして行わなければならない。

集団感染事例中の家族内感染について, 1 つの家族内(17-33,38,39,40,41)で 2 遺伝子座のリピート数が異なっており, 17-33 は他の 4 株には存在しない遺伝子座を保有していた。O157-37, EHC-6 はプラスミド上にあることが知られており¹⁾, 17-33 のみがプラスミドを保有していたため, 家族内で 1 株だけ異なるリピート数であったと考えられた。同一の集団感染事例の中で MLVA 型に多型がみられるひとつの理由として, プラスミドの獲得や脱落によるリピート数の変化があることが考えられた。

PFGE 法では, 事例 D に関係する 18 株

のうち、17-32 が1バンド異なるのみで、他の株は同一のバンドパターンを示したことから、これらの株が同一の集団感染事例の患者から分離されたことが強く示唆された。PFGE 法の結果では、MLVA 法でみられたような多型がみられず、判断が容易であった。

E. 結論

2017年に広島県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 28 株について、MLVA 法、PFGE 法により分子疫学解析を実施した。家族内感染事例及び集団感染事例で分離された株は、関連性を示した。ただし、集団感染事例では MLVA 法の結果に多型がみられたため、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) Izumiya H. et al. (2010): Microbiol Immunol, 54: 569- 577.
- 2) 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.

表1 2017年に分離された腸管出血性大腸菌 O26

菌株番号	性別	年齢	地域	血清型	毒素型	事例番号	疫学情報
17-01	男	18	F	O26:H11	VT1		
17-04	女	12	WE	O26:H11	VT1	A	
17-05	女	43	WE	O26:H11	VT1	A	17-04の家族
17-06	男	3	F	O26:H11	VT1	B	
17-07	女	1	F	O26:H11	VT1	B	17-06の家族
17-09	男	62	F	O26:H11	VT1		
17-19	女	40	E	O26:H-	VT1	C	
17-20	女	1	F	O26:H11	VT1	B	17-06と同一人物
17-23	男	4	E	O26:H-	VT1	C	17-19の家族
17-24	男	2	F	O26:H11	VT1	D	
17-25	女	63	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-26	男	38	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-27	男	5	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-28	男	1	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-29	女	2	F	O26:H11	VT1	D	
17-30	男	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-31	男	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-32	男	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-33	女	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-34	女	22	F	O26:H11	VT1	D	
17-35	女	49	F	O26:H11	VT1	D	
17-36	男	33	F	O26:H11	VT1	D	17-31の家族
17-37	女	42	F	O26:H11	VT1	D	17-32の家族
17-38	女	41	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-39	男	40	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-40	男	10	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-41	女	9	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-42	女	27	F	O26:H11	VT1		

表2 MLVA法による各遺伝子座のリポート数 (MLVA型)

菌株番号	事例	MLVA型	各遺伝子座のリポート数																	
			O157	O157	O157	O157	EH157	EH111	EH111	EHC	EHC	EHC	O157	O157	O157	O157	EH26	EH111	EHC	
17-24			-3	-9	-25	-34	-12	-11	-8	-1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-25			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-26			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-27			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-28			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-35			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-38			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-39			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-40			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-41	D		-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-29			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-31			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-34			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-36			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-32			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	7
17-37			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	7
17-30			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	4	-2	-2	1	19
17-33			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	5	-2	-2	1	7
17-06			-2	13	2	1	2	2	1	6	20	9	-2	1	-2	1.5	-2	-2	1	11
17-07	B	G4	-2	13	2	1	2	2	1	6	20	9	-2	1	-2	1.5	-2	-2	1	11
17-20			-2	13	2	1	2	2	1	6	20	9	-2	1	-2	1.5	-1	-2	1	11
17-19			-2	13	2	1	2	2	1	6	15	12	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-23	C	G5	-2	13	2	1	2	2	1	6	15	12	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-04			-2	13	2	1	2	2	1	11	14	-2	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-05	A	G6	-2	13	2	1	2	2	1	11	14	-2	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-01			-2	8	2	1	2	2	1	11	19	-2	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-09			-2	13	2	1	2	2	1	6	16	15	-2	1	-2	1.5	-2	-2	1	10
17-42			-2	13	2	1	2	2	1	8	12	-2	-2	1	-2	2	-2	-2	1	13

実線...2遺伝子座以内の相違を示した集団
破線...同一のMLVA型を示した集団 (MLVAグループ)

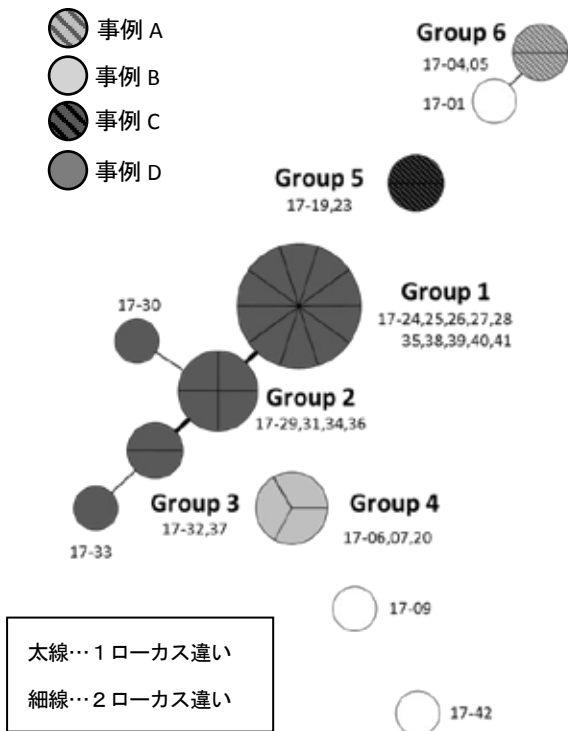


図1 腸管出血性大腸菌 O26 の MLVA 法による
Minimum Spanning Tree

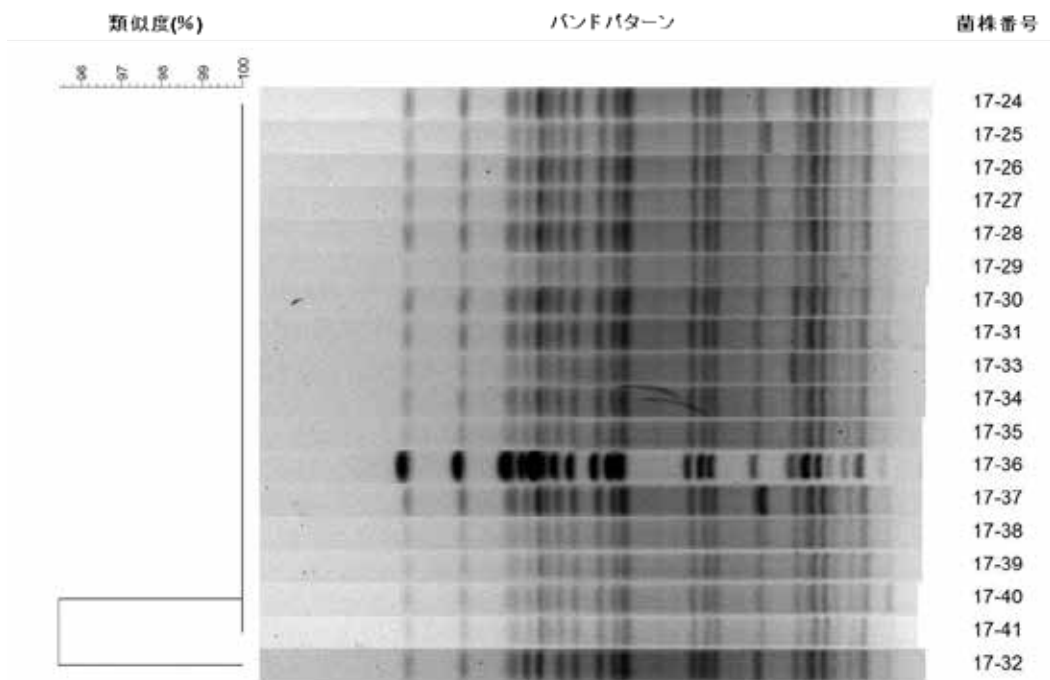


図2 腸管出血性大腸菌 O26 の PFGE 法による解析結果

2013～2017年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O26 : H11(VT1 産生)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

2013～2017年に分離された腸管出血性大腸菌 O26 : H11(VT1 産生)株 22 事例 32 株について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法(7 座位)を用いて分子疫学的解析を実施した。複数の事例間で PFGE 法、MLVA 法共に一致したものの中には、疫学調査による関連性が不明なものもあったが、2017年に発生した 2 事例に関しては、疫学的関連性の可能性が認められた。分子疫学的解析結果は疫学情報と照らし合わせて総合的に解釈することが重要であると言える。

また、多年にわたり MLVA 法で型が一致した 6 事例では PFGE 法でバンドパターンが異なったことから、当所での現行の MLVA 法(7 座位)を実施する際は留意が必要であると考えられた。

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)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法(7 座位)を用いて、2013～2017年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O26:H11(VT1 産生)株を解析し、感染事例間での疫学的関連性を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2013～2017年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 O26:H11(VT1 産生)感染症事例から分離された菌株 32 株を用いた。内訳は、2013年分離菌株 10 株、2014年分離菌株 3 株、2015年分離菌株 7 株、2017年分離菌株 12 株である。分離菌株の事例概要を表 1 に示した。

2. 方法

(1) PFGE 法

制限酵素 *Xba*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、BioNumerics Ver. 7.5(Applied Maths 社)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) MLVA 法

MLVA 解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)及び Gene Mapper(Applied Biosystems 社)を用い、表 2 の 7 ヶ所の 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。また、BioNumerics Ver. 7.5(Applied Maths 社)を用いて MST(Minimum Spanning Tree)解析を行った。

C. 研究結果

2013～2017年に分離された O26 菌株 32 株の PFGE バンドパターン及び MLVA リピート数(Repeat Number,以下 RN)を図 1 に、MLVA 解析結果に基づく MST 系統樹を図 2 に示した。PFGE バンドパターンにおいて類似度 95%以上のものを同一 PFGE クラスタ(図 1 の A～F)とし、MLVA RN が完全に一致したものを同一 type(図 1 及び図 2 の a～d)とした。

1. PFGE 法

事例 2014-1 の 14001 株及び事例 2014-2 の 14002 株は、類似度 95.0%で同一クラスタ(A)を示した。

事例 2013-4 の 13014 株及び 13015 株は、バンドパターンが 100%一致し同一クラスタ(B)を示した。

事例 2013-3 の 13012 株及び事例 2013-5 の 13016 株においても同一クラスタ(C)を示した。

事例 2015-4 の 3 株(15009、15010 及び 15012)及び事例 2015-3 の 2 株(15008 及び 15011)では共にバンドパターンがそれぞれ 100%一致し、これら二つの事例間の類似度は 95.5%で同一クラスタ(D)を示した。

事例 2013-7 の 13022 株及び事例 2013-9 の 13024 株ではバンドパターンが 100%一致し、これら 2 株と事例 2013-6 の 13021 株との類似度は 95.7%で同一クラスタ(E)を示した。

事例 2017-5 の 4 株(17031、17032、17033 及び 17034)及び事例 2017-6 の 2 株(17036 及び 17037)はバンドパターンが 100%一致し、これら 6 株と事例 2017-5 の 17035 株との類似度は 97.9%を示した。事例 2017-3 の 17008 株及び 17009 株ではバンドパターンが 100%一致し、これら 2 株と事例 2017-5、2017-6 の 7 株との類似度は 95.2%

で同一クラスタ(F)を示した。

2. MLVA 法

事例 2013-4 の 13014 株及び 13015 株は、MLVA RN が 7 座位全て一致し、同一 type(a)であった。

事例 2013-3 の 13012 株及び事例 2013-5 の 13016 株は同一 type(b)であった。

事例 2015-4 の 3 株(15009、15010 及び 15012)、事例 2015-3 の 2 株(15008 及び 15011)、事例 2013-7 の 13022 株、事例 2013-9 の 13024 株、事例 2013-6 の 13021 株、事例 2017-3 の 2 株(17008 及び 17009) 及び事例 2015-1 の 15001 株は同一 type(c)であった。

事例 2017-5 の 5 株(17031、17032、17033、17034 及び 17035)及び事例 2017-6 の 2 株(17036 及び 17037)は同一 type(d)であった。

なお、PFGE で同一クラスタ A を示した 2 株については、MLVA type が 3 座位で異なった。

D. 考 察

2013 年の事例(2013-3 及び 2013-5)は、共に患者は高齢であるが発生区が異なり、疫学的関連性も認められていないが、両解析方法で完全に一致した(PFGE 法でクラスタ C、MLVA 法で type b)。

2015 年の事例(2015-3 及び 2015-4)は、発生区が同じであり、発生時期も近いが疫学的関連性は認められていない。しかしこれらの株は PFGE 法で類似度が高く同一クラスタを示し(クラスタ D)、MLVA 法で一致した(type c)。

これら 2013 年の事例(2013-3 及び 2013-5)や 2015 年の事例(2015-3 及び 2015-4)のように、疫学調査から関連性が認められていないが PFGE 法で同一クラスタかつ同一 MLVA type を示した例もあった。こ

これらの株は、類似の遺伝子を持つ可能性、又は疫学的関連性のない株間で遺伝子のパターンが偶然一致した可能性が考えられる。しかし 2013 年の事例(2013-3 及び 2013-5)の 2 株(13012 及び 13016)に関しては、PFGE クラスターのみならずバンドパターンも 100%一致したことから、疫学的関連性を示唆している可能性もあると考えられる。

2017 年の事例(2017-5 及び 2017-6)は、PFGE 法ではほぼ一致し、MLVA 法でも一致した(type d)。この二事例は両家族の交流が聞き取り調査から認められ、疫学的関連性が示唆された。

2013 年から 2017 年までに発生した O26(VT1 産生)感染症の家族内感染事例 6 事例(2013-4、2015-3、2015-4、2017-3、2017-5 及び 2017-6)由来株は、各事例で両解析方法共に高い一致性が認められた。一方、今回の MLVA 解析から type c とした事例が多年にわたり認められたが、年が異なると PFGE 法ではバンドパターンが異なることから、当所の現行の O26 用 MLVA 法を使用する際には留意が必要であると考えられた。

E 結論

1. 疫学的関連性の認められていない事例間で PFGE 法及び MLVA 法の両法共に一致する場合もある。これらの株は、類似の遺伝子を持つ可能性、又は疫学的関連性のない株間で遺伝子のパターンが偶然一致した可能性が考えられるが、今回、潜在的な疫学的関連性を示している可能性があると考えられる事例もあった。

2. 同一 MLVA type の株が多年にわたって認められたが、年が異なる株同士では PFGE バンドパターンが異なった。このことから、当

所での現行の MLVA 法(7 座位)を使用する際には留意が必要であると考えられた。

3. 今回、異なる事例間ではあるが PFGE 法、MLVA 法共にほぼ一致し、疫学情報から関連性の可能性が認められた例もあった。これらの例から、改めて、分子疫学的解析の結果は、疫学情報と照らし合わせて総合的に解釈することが重要である。

F. 研究発表

なし。

G. 参考文献

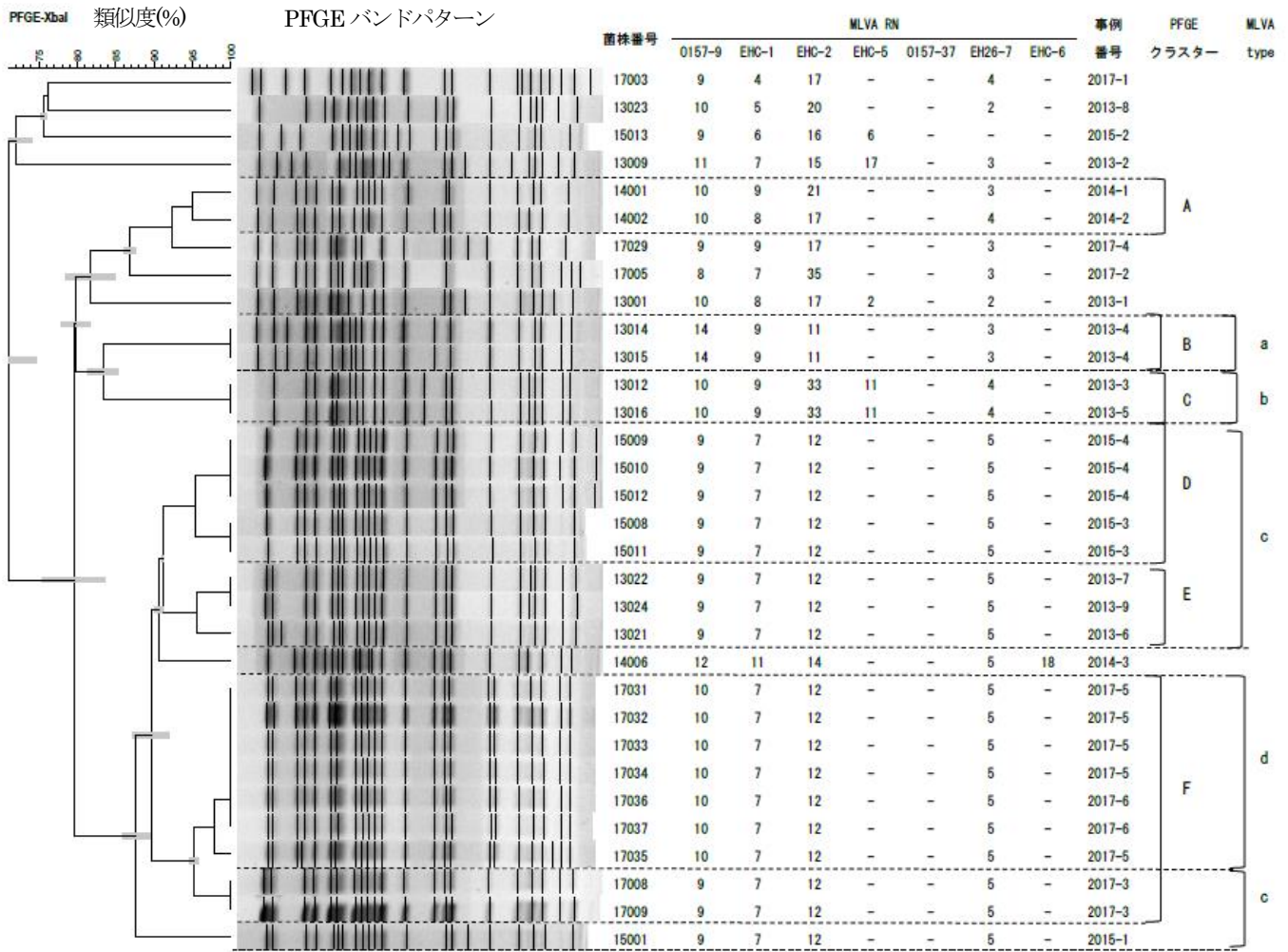
- 1) 病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究 平成 26 年度総括・研究分担報告書及び平成 24～26 年度総合研究報告書
- 2) 食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究 平成 28 年度総括・研究分担報告書
- 3) Hidemasa Izumiya et al. (2010): New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol Immunol* 54:569-577
- 4) 高橋ら: Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis による腸管出血性大腸菌(EHEC)O26 遺伝子型別法の検討 岩手県環境保健研究センター年報第 11 号, 67-69, 2011

表1 2013~2017年腸管出血性大腸菌 O26:H11(VT1 産生)分離菌株の事例概要

事例番号	菌株番号	診断の種類	発症年月日	発生区	性別	年齢	備考
2013-1	13001	患者	20130605	ア	女	21	
2013-2	13009	患者	20130707	イ	女	12	
2013-3	13012	患者	20130816	イ	女	71	
2013-4	13014	患者	20130822	ウ	女	7	同一家族事例
	13015	無症状病原体保有者			女	38	
2013-5	13016	患者	20130902	エ	女	64	
2013-6	13021	患者	20130916	オ	男	16	
2013-7	13022	患者	20130924	ウ	男	10	
2013-8	13023	患者	20130925	イ	男	5	
2013-9	13024	患者	20130929	エ	女	7	
2014-1	14001	患者	20140619	ウ	女	82	
2014-2	14002	患者	20140626	イ	女	2	
2014-3	14006	患者	20140830	オ	男	2	
2015-1	15001	患者	20150508	カ	女	5	
2015-2	15013	無症状病原体保有者		ウ	女	59	
2015-3	15008	患者	2015(月日は不明)	ウ	男	32	同一家族事例
	15011	患者	20150629		女	2	
2015-4	15009	患者	20150624	ウ	男	35	同一家族事例
	15010	無症状病原体保有者			女	8	
	15012	患者	20150624		女	5	
2017-1	17003	患者	2017(月日は不明)	キ	女	23	
2017-2	17005	患者	20170406	ク	男	19	
2017-3	17008	無症状病原体保有者		ウ	女	34	同一家族事例
	17009	患者	20170528		女	15	
2017-4	17029	患者	20171005	イ	女	12	
2017-5	17031	無症状病原体保有者		カ	男	37	同一家族事例
	17032	無症状病原体保有者			女	37	
	17033	無症状病原体保有者			女	7	
	17034	無症状病原体保有者			女	5	
	17035	患者	20171009		女	1	
2017-6	17036	無症状病原体保有者		カ	男	8	同一家族事例
	17037	患者	20170925		女	5	

表2 Primer set と Locus の概要

PCR mix	Locus	Dye	Sequence (5'-3')	Repeat size (bp)	Offset
Mix 1	O157-9	F	VIC GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	6	466
		R	TTCATTAATAAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTTG		
	EHC-1	F	VIC GTGCGTAACCTGCTGGCACA	6	75
		R	CGCGGCTGCCGGAGTATC		
	EHC-2	F	VIC CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	6	214
		R	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT		
EHC-5	F	NED ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	6	109	
	R	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC			
Mix 2	O157-37	F	PET AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	6	84
		R	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG		
	EH26-7	F	PET CCCCTATCAAAACTGATACCCGATAAG	22	292
		R	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT		
	EHC-6	F	NED ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	9	387
		R	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC		



-はPCR産物なし

図1 2013~2017年分離菌株の *Xba* I 処理による PFGE クラスタ及び MLVA RN 解析結果

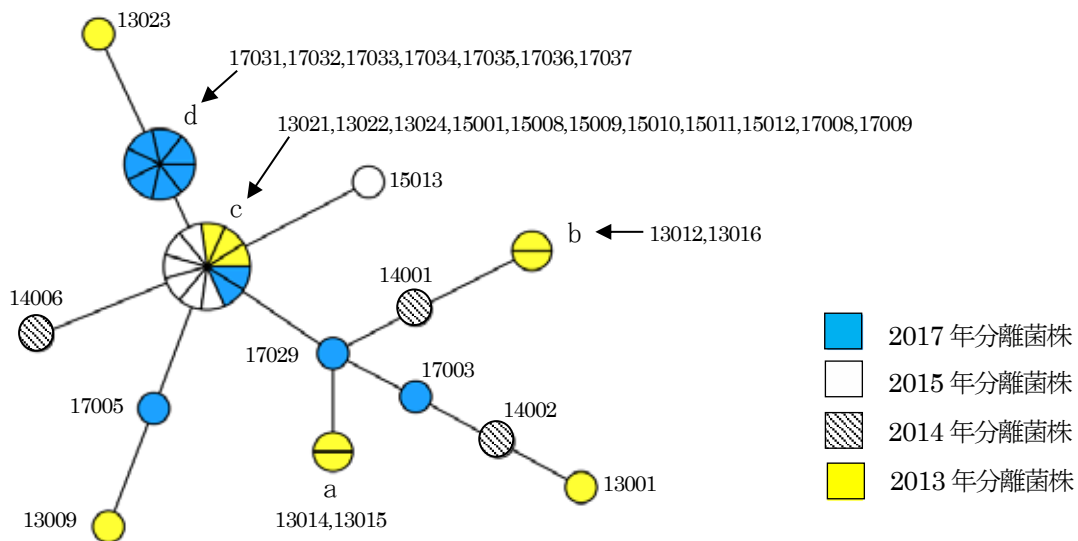


図2 2013~2017年分離菌株 32 株の MLVA 解析結果(7 座位)に基づく MST 系統樹

2017年に発生した腸管出血性大腸菌 O157、O26 における
MLVA 解析結果の迅速な還元の試み

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 恭晴

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157（以下 O157）の分子疫学的解析法において、簡便で迅速な IS-printing System 法(IS)は、地衛研で活発に実施されている事は周知のことである。

しかし、O157 以外の血清群では疫学的調査において時間的、距離的集積、共通食等の関連性を疑う情報がないと散発事例として処理され、早急に解析されないのが実情である。

さらに、解析結果も時期を逸すると活かされず、diffuse outbreak の解明は難しくなる。

昨年、県内で発生した O26 を解析し、集団・散発事例を含む 6 事例中 4 事例において菌株が同一株あるいは極めて類似していたことを報告した。密な関連性が疑われたが、追加疫学的調査とはならなかった。

これを踏まえ、2017 年は迅速性、解像度にも優れる Multi-locus variable-number tandem repeat analysis 法(MLVA)を通常検査で実施し、早急に解析結果を担当部署に還元出来るか試みた。

その結果、時間的集積の見られた O157 の散発事例 3 事例や、O26 の家族感染事例 2 事例について関連性のないことを早急に報告した。

また、O26 において MLVA 同リピート数の株が、2015 年から毎年検出されていることを確認した。2 種類の制限酵素によるパルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)により、これらの菌株において遺伝的関連性のあることが示唆された。

A.研究目的

山口県では腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析法として、IS-printing System 法(IS)、パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) を実施してきた。加えて昨年度までに、迅速性、解像度にも優れる MLVA による解析手法を検討してきた。

分子疫学的解析は、疫学的調査の裏づけや、新たな感染経路、感染源の掘り起しに役立ち diffuse outbreak の探知が可能となることがある。このためには、速やかに解析結果を担当部署へ還元する必要がある。

MLVA の検査体制が整った今年度は、県内で発生した O157、O26 について菌株受領後 MLVA 解析等が速やかに実施可能か、予備的に

検討した。

また、同一遺伝子型を示す株が特定の地域で複数年にわたって検出される事例が他県で報告されている (Emerging 現象)。本県においても MLVA 同リピート数を示す O26 株が、2015 年以降 3 年間続けて検出されていることを確認し、PFGE による詳細な解析を行い、遺伝的関連性があるか検証した。

B.研究方法

1.供試菌株

2017 年 6 月～9 月に山口県内で発生した O157 8 株、O26 10 株を供試した。

2.解析方法

(1) DNA 抽出

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) IS 法

IS-printing System (東洋紡) を用い、取扱説明書に従い実施した。

解析は、2 種類のプライマーセット

(1stSet、2ndSet) と陽性コントロールの 18 本のバンドの増幅を調べ、増幅ありは「1」増幅なしは「0」とした。サイズの大きいバンドから順に 3 バンド毎に「1」、「2」、「4」の係数を加算し、12 桁の IS コードとした。

(3) 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)、*Bnl* 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。

(4) 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)]以内の場合を、同一コンプレックスとした。

解析結果の還元において、MLVA リピート数が一致した場合「菌株の遺伝的関連性が考えられる」ことを知らせることとした。

C.研究結果

1.MLVA 解析終了までの経過日数

O157、O26 18 株の検体受領から MLVA 解析終了までの経過日数を図 1 に示す。

18 検体中 9 検体 (50%) について、検体受領後 7 日以内に終えることができた。

7 検体は、解析終了に 10 日以上を要した。

2.O157 の解析

(1)IS 法、MLVA 法 (表 1)

O157 の 8 株は、全て散発事例であった。

17Y09、17Y21 は IS コードが一致、MLVA も SLV でコンプレックス(a)を形成した。

その他の株はいずれの方法でも、全て不一致であった。

(2)PFGE 法 (図 2)

PFGE により 7 パターンに型別され、2 つのクラスターを形成した。

17Y09、17Y21 は 3 バンド以内の相違、類似度 94.7%でクラスター (A) を形成した。17Y02、17Y08 は一致、さらに 17Y11 と 3 バンド以内の相違、類似度 94.7%でクラスター (B) を形成した。

3.O26 の解析

(1)MLVA 法 (表 2)

O26 の 10 株は、3 件の家族感染によるものであった。

同一事例由来の株は、リピート数が全て一致した。事例ごとのリピート数は、3 ヶ所以上異

なっていた。

(2)PFGE 法 (図 3)

同一事例由来の株のパターンは一致した。家族感染 (17Y15~19) において、17Y17 は相違があったが 3 バンド以内であり、類似度 97.8% で同一事例とクラスター(III)を形成した。

4.県内に蔓延する O26 株の解析

2017 年に発生した家族感染事例由来 3 株 (17Y12~14) の MLVA リピートパターン ii (以下、MLVA ii 型) と同型の株が、2015 年から 3 年間続けて検出され、県内に蔓延していることを確認した。

(1)MLVA ii 型の県内における発生概要と、全国での発生状況(表 3)

MLVA ii 型は県内において、約 1 年間隔で発生していた。

全国において、MLVA ii 型が続けて発生している自治体は山口県のみであった。

(2)PFGE 法

MLVA ii 型と同型であった 2017 年家族感染の 3 株 (17Y12~14) と、2015 年家族感染の 3 株 (15Y28~30)、2016 年保育園集団感染の 12 株 (MLVA ii 型: 16Y19~21、23~28、30、SLV: 16Y22、29) 計 18 株の、制限酵素 Xba I による PFGE の結果を図 4 に示す。

18 株中 17 株は一致し、16Y19 は 2 バンド以内の相違で同じクラスター (IV) を形成した。

さらに、2015、2017 年の各 3 株と、2016 年の 12 株中 MLVA ii 型 2 株 (16Y19、20) と、SLV であった 2 株 (16Y22、29) を抽出し 10 株について、制限酵素 Bln I による PFGE 解析結果を図 5 に示す。

2016、2017 年の 7 株は 3 バンド以内の相違で同じクラスター(V)形成し、2015 年は 4 バンドの相違でクラスター(VI)を形成した。

D.考察

解析結果について、IS は散発事例においても迅速法として有用であるが、解像度が低いため PFGE または MLVA により確認が必要とされる³⁾。MLVA は PFGE に比べ迅速に結果を還元できるメリットがある。

このため MLVA を積極的に活用し、早い段階で菌株の異同結果について報告することは、行政判断の材料として貢献できる可能性がある。

当センターでは O157 等の EHEC 菌株を受領後、コンタミネーションの有無を確認し、生化学的性状試験、血清型別及びベロ毒素産生能、vt 遺伝子の検出を行い、検査終了まで通常 5~7 日程度を要する。

今年度は MLVA をこの通常検査に追加し、迅速な解析結果の還元が可能か検討した。

検体の半数において、菌株受領後 7 日以内に解析し結果を還元することが可能であった。ただ、発生届日から当センターに検体が搬入されるまで平均 6.2 日、患者発症から検体搬入までとなると平均 12.5 日経過していた。菌株の送付方法や、当センターでの検査工程の見直しをすることで、さらなる検査期間の短縮が可能と考える。

また、解析に 10 日以上要した検体もあった。これは、当センターに設置してあるシーケンサーが 8 本キャピラリータイプであるため運用効率を考え、ある程度検体数をまとめる必要があった。そのため、年度初発検体や、同一事例株がすでに解析済みの検体、IS コードが不一致等から他の株と遺伝的関連性が低いと判断した検体をまとめて検査したことが、長期間要した理由である。

O157 において、1 週間の内に発生した散発 3 事例 (17Y08、09、10) は、IS コードは不一致、MLVA で 5 ヶ所異なることから関連性はないことを早急に報告した。その後の、PFGE 解析でも関連性は見られなかった。

17Y09、21 について、当初疫学的調査からは

関連性が疑われる情報はなく IS コード一致、その後 MLVA で SLV、PFGE も 3 バンド以内の相違で遺伝的関連性があることが示唆された。

17Y21 の解析結果の還元において、17Y09 と IS コードの一致は確認できたが、MLVA が SLV であり、管轄保健所が異なったこと、2 か月間の発症間隔があることから、追加疫学的調査の必要性を報告しなかった。

疫学的関連性がある MLVA で SLV の場合、密接に関連性があると解釈されるが⁴⁾疫学的関連性のない事例間において客観的なクラスター形成があった場合も、追加疫学的調査の必要性を報告すべきであった。

17Y02、08 について PFGE が一致したが、当初 IS コード不一致、MLVA のリピート数が 9 ヶ所異なり、疫学的調査からも 17Y08 は他県での感染が強く疑われるため関連性はないと報告した。

O26 について、3 件の家族感染事例毎に MLVA リピート数は一致し、PFGE も同じクラスターを形成した。

発症日の近い 2 事例について、MLVA により関連性がないことを早急に報告した。

事例 (17Y12~14) の MLVA ii 型が、2015 年より続けて検出される蔓延株であることを確認した。この蔓延株について制限酵素 Xba I、Bln I による PFGE でも、これら菌株の遺伝的関連性に可能性があると解釈された。また、全国において MLVA ii 型の株が 3 年続けて発生している自治体は他になく、山口県内に蔓延している O26 株の可能性が示唆された。

E. 結論

2017 年に山口県で分離された O157、O26 について通常検査期間内に MLVA を実施し、解析結果を担当部署に還元できた。時間的集積がみられた O157 の散發事例、O26 の家族感染事例

について早急に事例間の関連性がないことを報告した。

厚生労働省は 2017 年 8 月の EHEC 広域発生事例を受け、早期探知のため解析法を MLVA に統一するとした⁵⁾。今後も、MLVA を積極的に活用し、事例間の関連性を解明する科学的データとして解析結果の共有、還元を行っていく。

F. 研究発表 なし

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)
- 2) Izumiya H, et al : Microbiol.Immunol,54,569-577(2010)
- 3) 伊豫田淳：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(課題番号：H24-新興-一般-005)平成 26 年度総括・分担研究報告書及び平成 24~26 年度同号研究報告書,190-198(2015)
- 4) 病原微生物検出情報(IASR)35 : 129-130(2014)
- 5) 薬事・食品衛生審議会(平成 29 年 11 月 17 日開催)：食品分科会資料

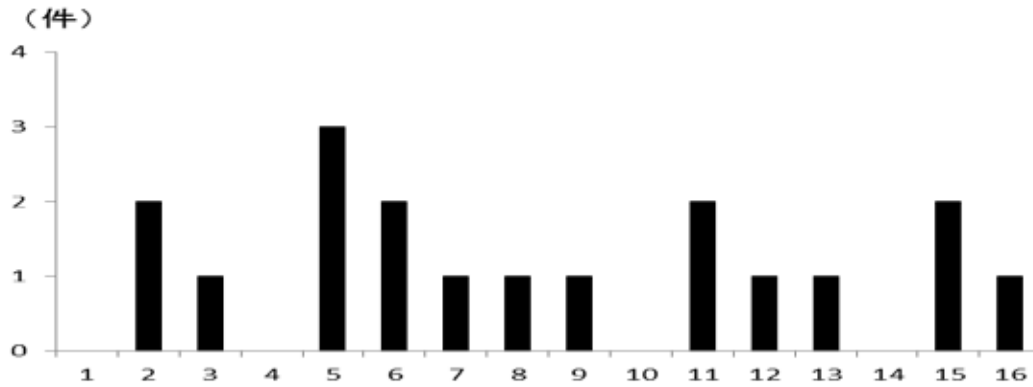


図1 検体受領から MLVA 解析終了までの経過日数

表1 O157のIS、MLVA、PFGEの解析結果

菌株番号	届出日	疫学的 関連性	血清型	IS-Printing法		MLVA (NID-17 loci)																MLVA complex	PFGE クラスター	
				1st	2nd	O157-	EHC-	EHC-	O157-	EHC-5S		O157-	O157-	EH111-	EH157-	EH111-	EH111-	O157-	O157-	EHC-	O157-			EH26-
						34Y	1Q	2C	9M	3W	25J	8O	12N	14BB	11T	17Z	36AA	19L	6U	37V	7D			
17Y01	2017/6/21	散発	O157:H7	114057	303443	9	8	5	12	2	7	3	1	1	-2	2	3	7	5	-2	6	-2		
17Y02	2017/6/28	散発	O157:H7	317477	611756	13	6	5	17	12	10	5	1	4	-2	2	11	6	7	-2	8	-2		B
17Y08	2017/8/12	散発	O157:H7	317577	211757	12	6	4	10	-2	11	5	1	4	-2	2	7	8	6	-2	6	-2		B
17Y09	2017/8/12	散発	O157:H7	317555	301755	12	6	4	11	2	9	5	1	3	-2	2	8	6	6	-2	6	-2	a	A
17Y10	2017/8/18	散発	O157:H7	617555	611647	12	5	4	13	-2	8	8	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2		
17Y11	2017/9/5	散発	O157:H7	317577	611756	12	6	4	12	6	10	5	1	4	-2	2	7	6	6	-2	7	-2		B
17Y20	2017/10/19	散発	O157:H7	717557	611657	12	5	4	12	-2	8	7	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2		
17Y21	2017/10/25	散発	O157:H7	317555	301755	12	6	4	11	2	9	5	1	3	-2	2	8	6	6	-2	6	-2	a	A

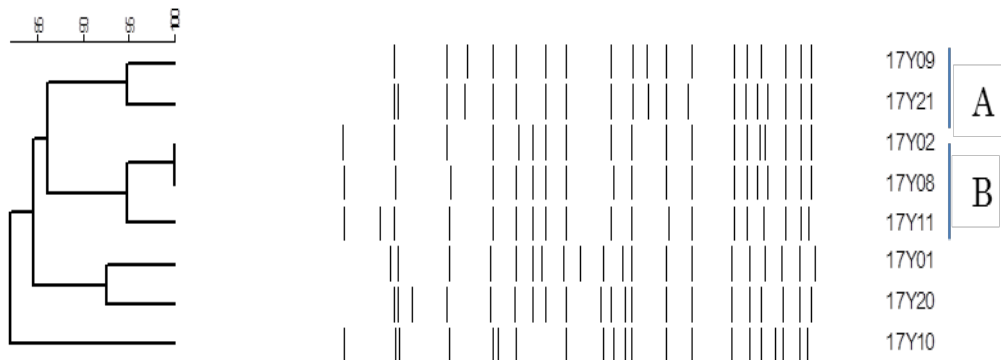


図2 O157のPFGE(Xba I)による解析結果

表2 O26のMLVA、PFGEによる解析結果

菌株番号	分離日	疫学的 関連性	血清型	MLVA(NIID-17 loci)														MLVA クラスター	PFGE クラスター			
				O157-34Y	EHC-10	EHC-2C	O157-9M	EHC-5S	O157-3W	O157-25J	EH111-8O	EH157-12N	EH111-14BB	EH111-11T	O157-17Z	O157-36AA	O157-19L			EHC-6U	O157-37V	EH26-7D
17Y05	2017/6/23	家族 事例	O26:H11	1	11	17	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	2	i	I
17Y06	2017/6/23		O26:H11	1	11	17	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	2		
17Y12	2017/9/8	家族 事例	O26:H11	1	12	14	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	ii	II
17Y13	2017/9/8		O26:H11	1	12	14	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y14	2017/9/5		O26:H11	1	12	14	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y15	2017/9/15	家族 事例	O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	iii	III
17Y16	2017/9/22		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y17	2017/9/22		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y18	2017/9/28		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y19	2017/9/28		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		

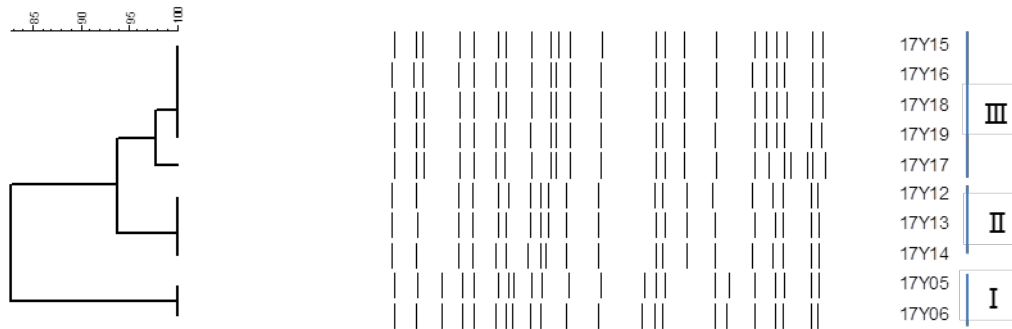


図3 O26のPFGE(Xba I)による解析結果

表3 MLVA ii型の山口県における発生概要と、全国での発生状況

発生状況	2015年	2016年	2017年
	11/2~6発生	8/1~9/11発生	9/5~8発生
	家族感染	保育園集団感染	家族感染
	No 年齢	No 年齢	No 年齢
山口県	15Y28 2	16Y19 0~4	17Y12 34
	15Y29 41	~30	17Y13 93
	15Y30 67	(うち2株はSLV)	17Y14 2
	山口県(3)	山口県(10)	山口県(3)
全 国	石川県(2)	三重県(2)	兵庫県(4)
	福井県(1)	岡山県(1)	熊本県(1)
	福岡県(1)		
	大阪府(2)		
	宮城県(2)		

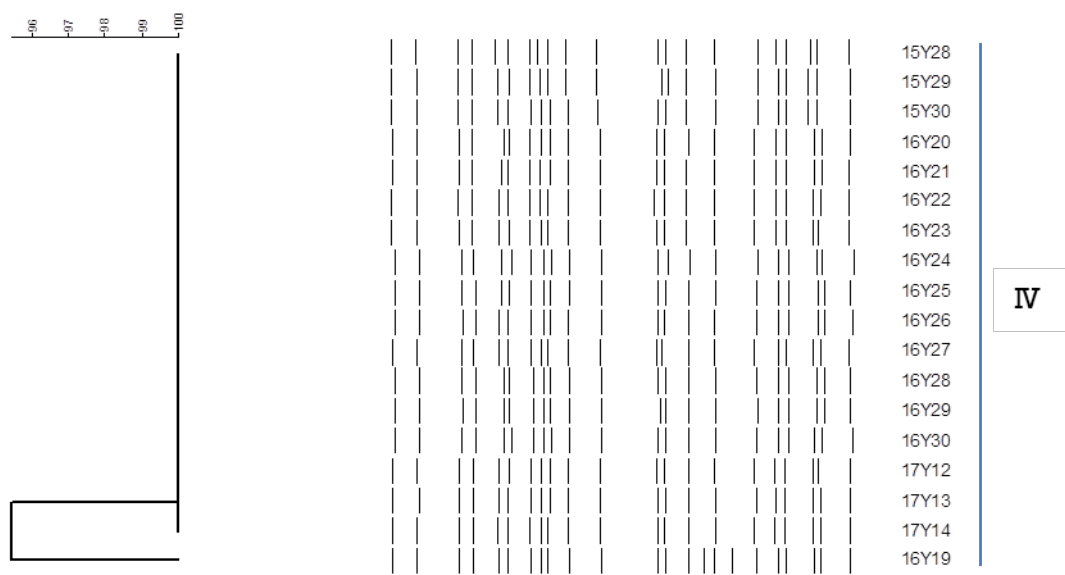


図 4 蔓延株の PFGE (Xba I) による解析結果

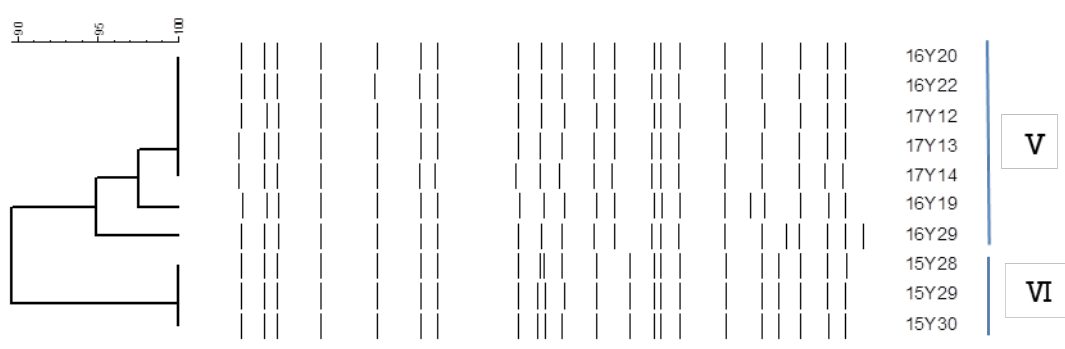


図 5 蔓延株の PFGE (Bnl I) による解析結果

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 29 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及び精度管理 (PFGE
及び ISPS) —

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	阿部有利	福岡市保健環境研究所
	有川衣美	北九州市保健環境研究所
	緒方美奈子	佐賀県衛生薬業センター
	高木由美香	長崎県環境保健研究センター
	小嶋裕子	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
	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
	小原敦美	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
	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
	中山志幸	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」という。)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」という。) 検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約及び 4. 精度管理 (PFGE 及び ISPS) の 4 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」という。) の IS 型別の登録数は平成 30 年 2 月 14 日現在で 1731 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、平成28年度 199件及び平成29年度 128件)であり、毎年200件前後の登録で推移していたが、平成29年度は0157EHECの検出数が少なかったため減少した。九州地区で平成29年度に収集されたEHECは397株であった。その内訳は、0157EHECが156株、026EHECが119株、0111EHECが40株、0103EHECが32株、0121EHECが13株、091EHECが7株、0115EHECが7株、その他の血清型が11株及び血清型別不能が12株であった。九州地区は非0157EHECの占める比率60.7%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29年度の0157EHEC及び非0157EHECによる集団発生事例は13事例であった。その内訳は、0157EHECによるものが4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PFGE及びISPSについて実施した。PFGEの精度管理において、泳動は概ね良好に行われており、対象菌株の関連性は参加した11地研全てにおいて一致した。ISPSの精度管理では、エクストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。また、PFGE及びISPSの両方において、菌株を輸送中又は保存中に変異したと考えられる事案が発生した。今後、精度管理に使用する菌株をより慎重に選定する必要があると考えられた。

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。平成26年度以降、国立感染症研究所から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、MLVAを実施している地衛研はなく、EHECの分子疫学的解析はパルスフィールド・ゲル電気泳動法(以下「PFGE」

という。)を用いて実施されている。また、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。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

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検出状況及びEHECによる集団発生事例については、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。

精度管理については、PFGE用に026EHECを4株(PFGE用1から4)、ISPS用に0157EHECを3株(ISPS用5から7; 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)。試験方法については、PFGE及びISPS共に各地衛研が通常行っている方法にて行った。

C. 研究結果及び考察

1. IS型別データベースの運用

平成22年4月から平成30年2月14日までの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0157EHECのIS型別の登録数は平成30年2月14日現在で1731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、平成28年度199件及び平成29年度128件)であり、毎年200件前後の登録で推移していたが、平成29年度は例年と比較して少なかった(表2)。

平成22～29年度に登録された1731件の0157EHECのIS型別数は311型に分類された。最も多く登録されている0157EHECのIS型別は「66324257743」で164株(9.5%)が九州地区の全ての地衛研から登録された(表3)。また、8年間で21株以上登録された0157EHEC

のIS型別数は202種類で、それに属する株は合計847株(48.9%)であった。また、MST解析の結果から、IS型別の0157EHEC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29年4月から平成30年2月14日12月までに397株のEHEC菌株が収集され(表4)、その内訳は0157EHECが156株(39.3%)、非0157EHECが241株(60.7%)。そのうちO群血清型別不能EHECが12株であった。非0157EHECは14種類のO群に型別され、その内訳は026EHECが119株(30.0%)、0111EHECが40株(10.1%)、0103EHECが32株(8.1%)、0121EHECが13株(3.3%)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、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC及び0121EHECなどで全体の9割を占めている。九州地区は本研究で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考えられる。

3. EHECによる集団発生事例数

平成29年度のEHECによる集団発生事例は13事例であった(表5)。その内訳は、O157EHECによるものが4事例で、O26EHEC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、児童福祉施設及び老人施設であった。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 (PFGE、ISPS)

PFGEの精度管理には11地衛研が参加した。平成29年度は4株を配布し、そのうちの1株に対する関連性をPFGEにより明らかにするように問題を作成した(図2)。PFGEの写真を見ると一部制限酵素による消化が不十分と考えられる地衛研があったが、概ね電気泳動像は明瞭で手技自体は良好に行われていると考えられた(図3.1から3.11)。参加した11地衛研全てにおいて、関連性に対する回答は全て一致した(表6)。

ISPSの精度管理には12地衛研が参加した。ISPS用5は無作為に選択した菌株、ISPS用6は、Set-1の1-02と1-03の間、Set-1の1-14と1-15の間、Set-2の2-01の上部にエクストラバンドが現れる株を選択した。ISPS用7はSet-2の2-01の上部にエクストラバンドが現れる株を選択した(図4)。ISPSの精度管理の結果、一部の地衛研において、検体の取り違い及び誤判定が認められた(表7.1から7.3)。

PFGE及びISPS両方で一部の地衛研において、菌株の輸送中又は各地衛研での保存中に変異が生じたと考えられる事例が認められた(図5.1及び図5.2)。各地衛研に配布した菌株の保存状況と検査実施日に特に差は認

められなかった(表8)。

D. 結論

九州地区におけるO157EHECのIS型別の登録数は毎年200件前後の登録で推移していたが、平成29年度は128件と少なかった。この原因はO157の検出数が例年と比較して少なかったためと考えられる。平成22～29年度に登録された1731株のO157EHECのIS型別数は311型に分類され、8年間で21株以上登録されたO157EHECのIS型別は202型でそれに属する株は合計847株(48.9%)であった。最も多く登録されているO157EHECのIS型別は「66324257743」で164株(9.5%)が12地衛研から登録された。

九州地区12地衛研にて平成29年4月から平成30年1月までに397株のEHEC菌株が収集され、その内訳はO157EHECが156株(39.3%)、非O157EHECが241株(60.7%)そのうち0群血清型別不能EHECが12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、O157EHEC、O26EHEC、O111EHEC、O103EHEC及びO121EHECなどで、全体の9割を占めていた。

平成29年度のEHECによる集団発生事例は13事例であった。その内訳は、O157EHECによるものが4事例、O26EHEC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PFGE及びISPSについて行った。PFGEの精度管理には11地衛研が参加し、全ての地衛研において菌株の関連性は一致した。ISPSの精度管理には12地衛研が参加した。一部の地衛研で検体の取り違いやエクストラバンドの誤判

定が認められた。精度管理に使用した菌株において、輸送中又は各地衛研で保存中に変異したと考えられる事例が認められた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) 上野詩歩子、黒岩祥子、若松倫子、熊本サチ子、永岡貴美子、長岡章次、寺松孝二、畔野征子、梅崎みどり、吉田まり子、松尾美智代、濱崎光宏、中山志幸、世良暢之；保育所で発生した腸管出血性大腸菌 O26:H11 による集団感染事例-福岡県。病原微生物検出情報 2017, 38: 148-149.
- 2) 吉田弘、高橋雅輝、濱崎光宏、山下育孝、四宮博人、山下照夫、皆川洋子、岸本剛、調恒明；エンテロウイルス検査の信頼性確保について。病原微生物検出情報 2017, 38: 199-200.

2. 学会発表

- 1) Hiroaki Shigemura, Koichi Murakami, Tamie Noda, Mari Matsui, Satowa, Suzuki, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Nobuyuki Sera; Decrease in extended-spectrum cephalosporin-resistant Salmonella from chicken meats in Japan. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2017)、15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Singapore)
- 2) 濱崎光宏、市原祥子、中山志幸、世良暢之、吉田弘；環境水中の腸管系ウイル

ス量と感染症発生動向調査事業における患者報告数との関連について。第76回日本公衆衛生学会総会（2018年10月，鹿児島県）

- 3) 吉田弘、滝澤剛則、小澤広規、高橋雅輝、筒井理華、中田恵子、濱崎光宏、世良暢之、堀田千恵美；環境サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題。第76回日本公衆衛生学会総会（2018年10月，鹿児島県）
- 4) 江藤良樹、重村洋明、世良暢之；原因不明食中毒疑い事例の患者糞便からの多殻目粘液胞子虫遺伝子の検出状況について。第38回日本食品微生物学会学術総会（2017年10月，徳島県）
- 5) カール由起、重村洋明、中山志幸、村上光一、世良暢之；肉用鶏、鶏肉及びヒトから分離した *Campylobacter jejuni* の薬剤耐性状況について 第10回日本カンピロバクター研究会総会（2017年11月，宮崎県）
- 6) 濱崎光宏、中山志幸、世良暢之、上野詩歩子、梅崎みどり；保育所で発生した腸管出血性大腸菌 O26:H11 による集団感染事例-福岡県。第91回日本細菌学会総会（2018年3月，福岡県）
- 7) 江藤良樹、濱崎光宏、世良暢之；福岡県で分離された稀な血清型の志賀毒素産生性大腸菌が保有する志賀毒素遺伝子の亜型について。第91回日本細菌学会総会（2018年3月，福岡県）
- 8) カール由起、重村洋明、中山志幸、大石明、村上光一、世良暢之；福岡県における鶏肉及びヒトから分離し

た *Campylobacter jejuni* の薬剤耐性
状況について 第91回日本細菌学会
総会（2018年3月，福岡県）

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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	MLVA型 (感染研)
PFGE用1	16EC038	2016	保菌者	O26:H11	<i>stx</i> ₁	16m2154
PFGE用2	16EC038	2016	保菌者	O26:H11	<i>stx</i> ₁	16m2154
PFGE用3	16EC034	2016	患者	O26:H11	<i>stx</i> ₁	16m2159
PFGE用4	16EC084	2016	保菌者	O26:H11	<i>stx</i> ₁	13m2015
ISPS用5	16EC026	2016	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₂	16m0446
ISPS用6	16EC087	2016	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	16m0447
ISPS用7	16EC093	2016	保菌者	O157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	17m0001

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	平成29年度	
1	112	48	61	26	28	46	29	26	376
2	50	53	44	24	32	42	35	23	303
3	30	15	12	15	38	46	10	11	177
4	12	12	17	52	28	15	40	16	192
5	23	18	11	28	26	10	25	17	158
6	6	5	4	8	2	7	2	2	36
7	13	16	24	18	11	14	31	14	141
8	16	10	5	30	25	0	0	7	93
9	5	3	7	2	4	5	3	1	30
10	20	17	16	4	3	4	5	1	70
11	19	25	21	15	8	15	16	9	128
12	6	7	7	2	1	0	3	1	27
合計	312	229	229	224	206	204	199	128	1731

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	10進数による IS型別	登録数																			合計	
		登録年度									登録地衛研											
		22	23	24	25	26	27	28	29	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
1	66324257743	22	32	4	11	33	50	9	3	27	18	61	7	12	1	16	6	2	5	8	1	164
2	57733536074	3	15	23	8	16	10	27	12	22	24	4	17	18	12	9	2	1	4	1		114
3	30671622280	33	11	1	7	11	2	2	3	31	7	4		11	3	2		1	6	5		70
4	56643812046	31	14	3	13	3				19	17	7	3	6	2	8			1	1		64
5	66457435083	6	2	9	10	1	5	9	11	11	9	4	3	2	1	10		1	4	8		53
6	30653010185	9	4	4	14	6	3	2	4	7	5	4	4	8		2	8		5	2	1	46
7	57733470538		2	12	1	16	5	4	1	12	5		18	3		1		1		1		41
8	22081687688	12			2	16			10	15	9	9		3				2	1	1		40
9	27384601163	26	3		7					8	1	4		8	6		2	3	2	2		36
10	66324192207	3	7	7		3	10	3	2	12	9	3	2	1		4			4			35

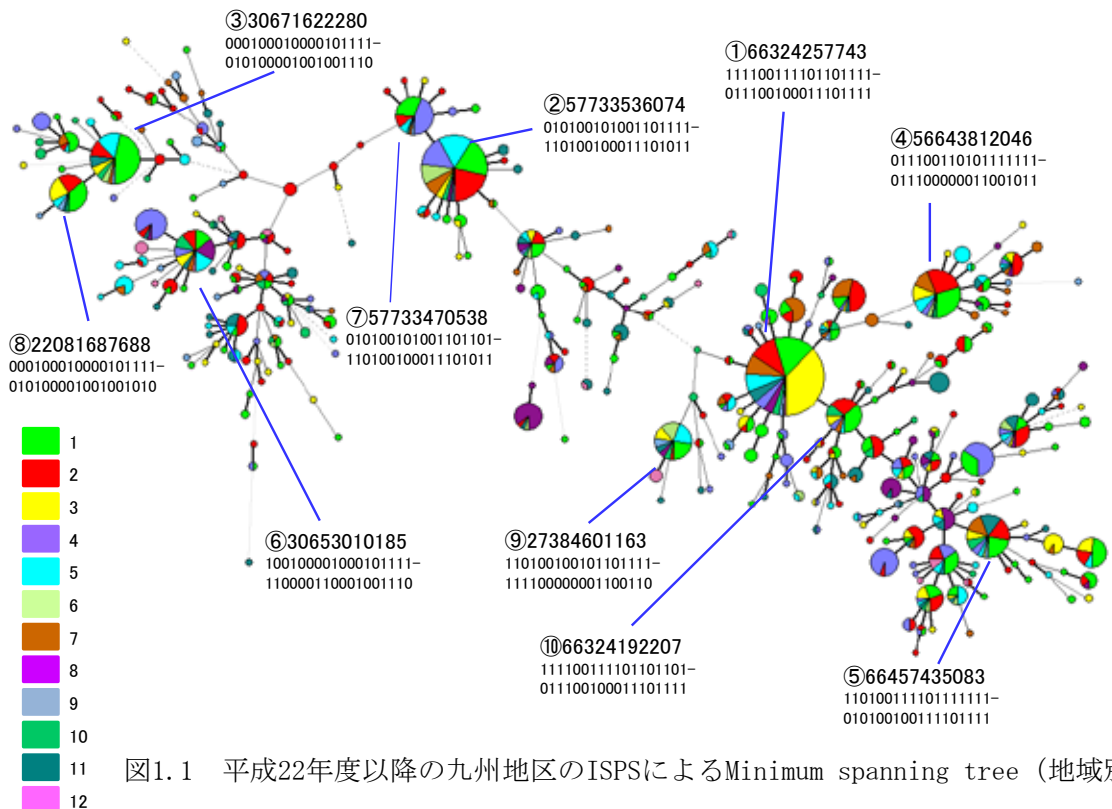


図1.1 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree (地域別)

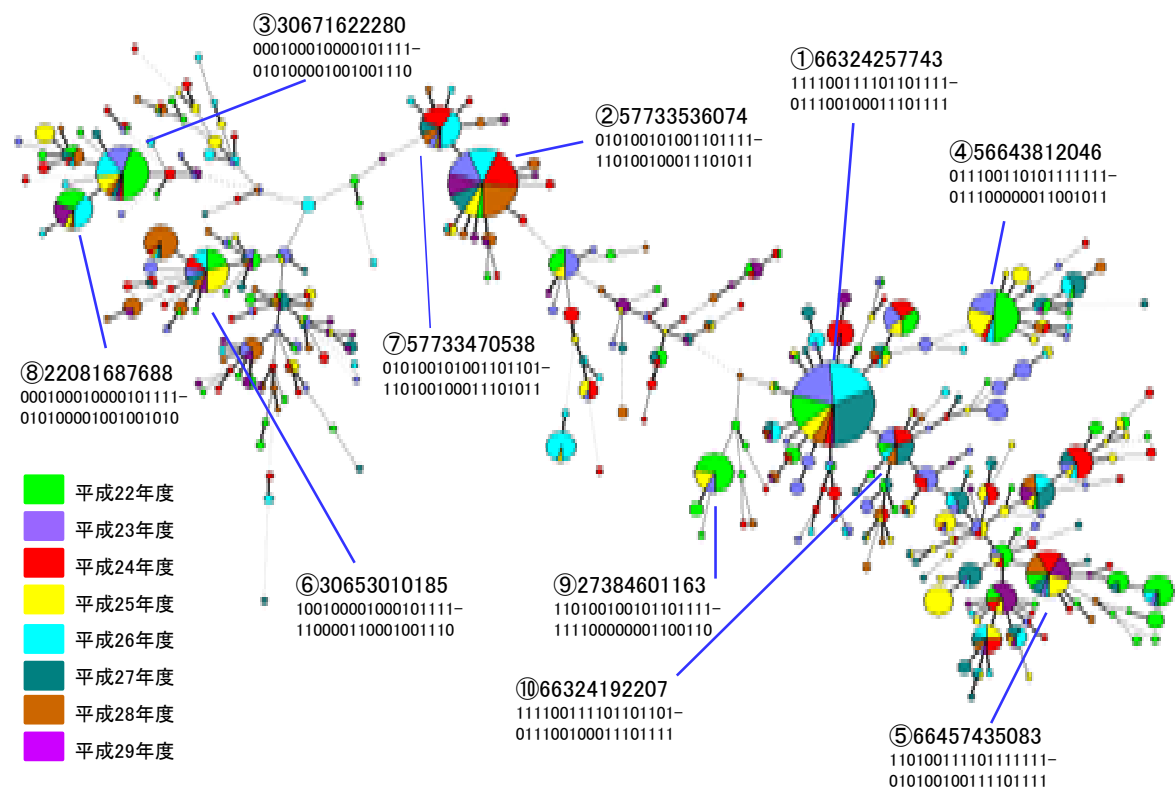


図1.2 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4 平成29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	0115	0145	0165	05	06	076	0119	086a	0125	OUT	
1	26	18	1	4		4	3								1	1	58
2	21	24		21	3	3	3	1		1						1	78
3	11	1			1												13
4	46	8									1						55
5	17	17	1	2	6		1									3	47
6	2	1															3
7	14	1	24		1			1					1			1	43
8	7	11		3						1	1					1	24
9	1	1			2											1	5
10	1	2							1							1	5
11	9	20	14	2					1					1		3	50
12	1	15															16
合計	156	119	40	32	13	7	7	2	3	1	1	1	1	1	1	12	397

表5 平成29年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例数

地衛研No.	事例No.	血清型	毒素型	発生場所
	1	026: H11	<i>stx</i> ₁	保育所
	2	0103: H2	<i>stx</i> ₁	保育所
	2	026: H11	<i>stx</i> ₁	保育所
	3	0157: H7	<i>stx</i> ₂	不明
	4	026: H11	<i>stx</i> ₁	保育園
	2	0157: H7	<i>stx</i> ₂	児童福祉施設
	7	0111: H-	<i>stx</i> ₁	保育園及び家庭
	8	026: H11	<i>stx</i> ₁	家庭内
	2	026: H11	<i>stx</i> ₁	介護老人施設
	3	0157: H-	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	有料老人ホーム
	4	0103: H2	<i>stx</i> ₁	家庭内
	5	0157: H7	<i>stx</i> ₂	保育園
	12	026: HUT	<i>stx</i> ₁	家庭内

事例

管内の施設で O26 : H11 を原因とする集団感染事例が発生した。また、同一地域において、当該施設と関連がないと考えられる患者からも O26 : H11 が検出されている。これらの事例において検出された O26 : H11 の関連性を PFGE により明らかにして頂きたい。

回答

該当するものを○で囲んでください。PFGE 用 1 と比較して異なるバンドの本数を記載してください。

問 1 PFGE 用 1 と PFGE 用 2 は (一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致)

その理由 : PFGE 用 1 と PFGE 用 2 は PFGE に於いて 本のバンドが異なる。

問 2 PFGE 用 1 と PFGE 用 3 は (一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致)

その理由 : PFGE 用 1 と PFGE 用 3 は PFGE に於いて 本のバンドが異なる。

問 3 PFGE 用 1 と PFGE 用 4 は (一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致)

その理由 : PFGE 用 1 と PFGE 用 4 は PFGE に於いて 本のバンドが異なる。

図2 PFGE精度管理の問題

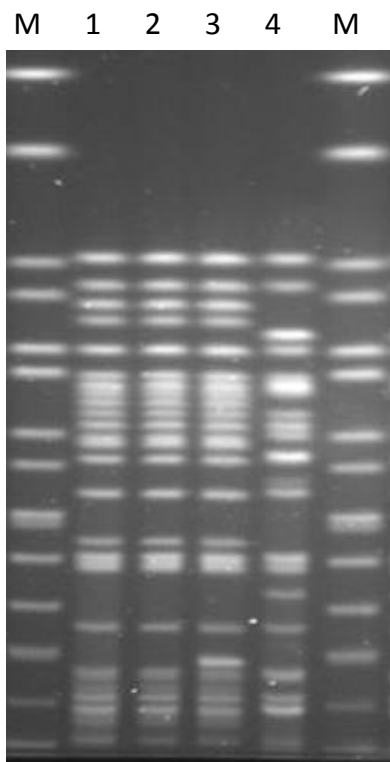


図3.1 地衛研1のPFGE電気泳動写真

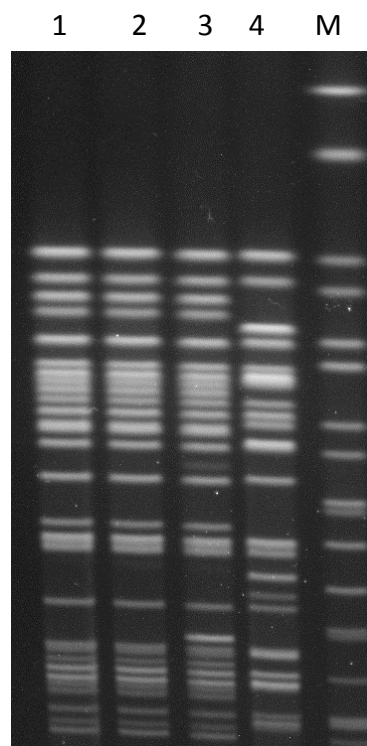


図3.2 地衛研2のPFGE電気泳動写真

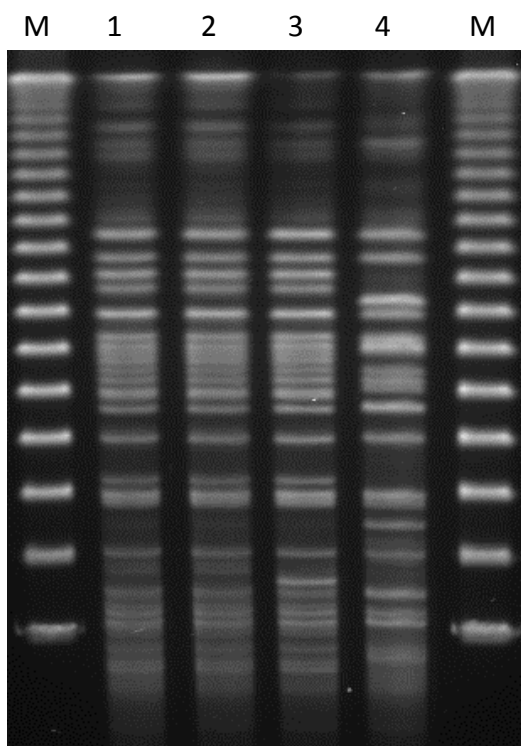


図3.3 地衛研3のPFGE電気泳動写真

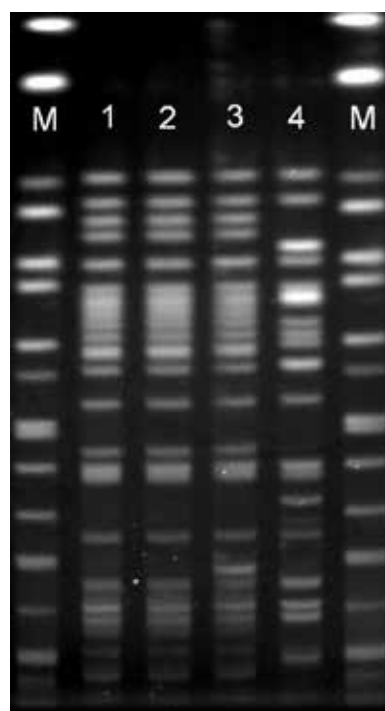


図3.4 地衛研4のPFGE電気泳動写真

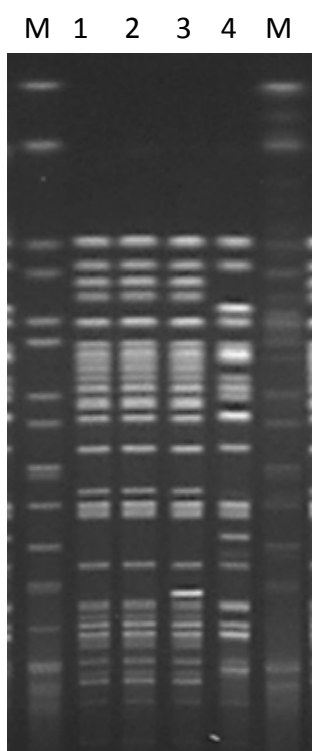


図3.5 地衛研5のPFGE電気泳動写真

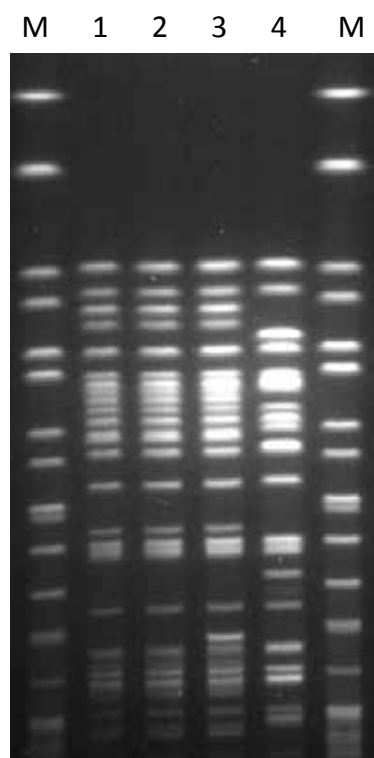


図3.6 地衛研6のPFGE電気泳動写真

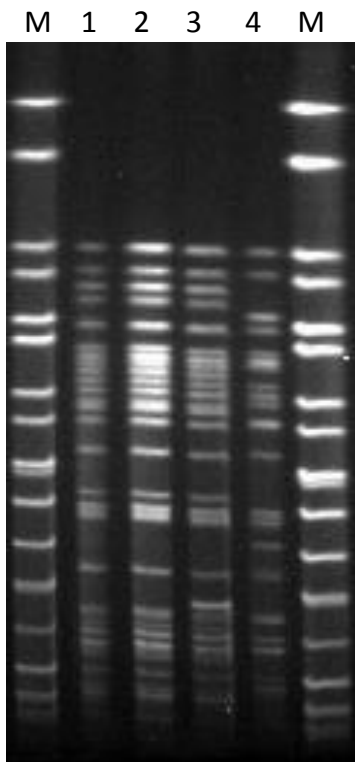


図3.7 地衛研7のPFGE電気泳動写真

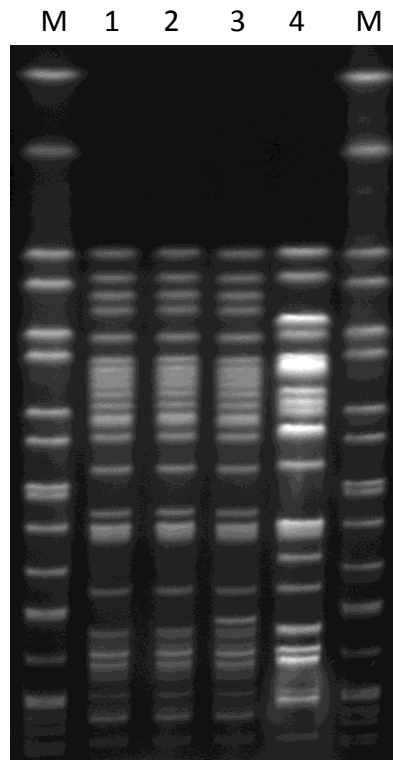


図3.8 地衛研8のPFGE電気泳動写真

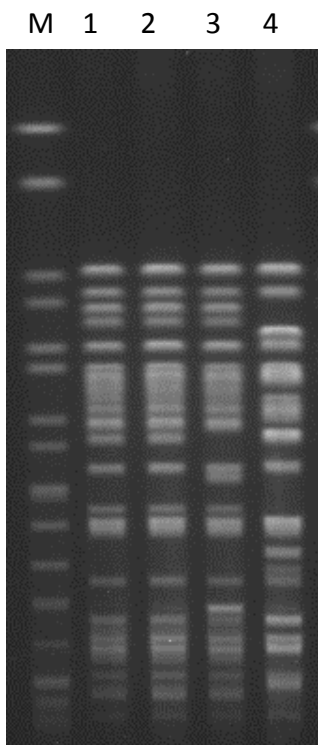


図3.9 地衛研9のPFGE電気泳動写真

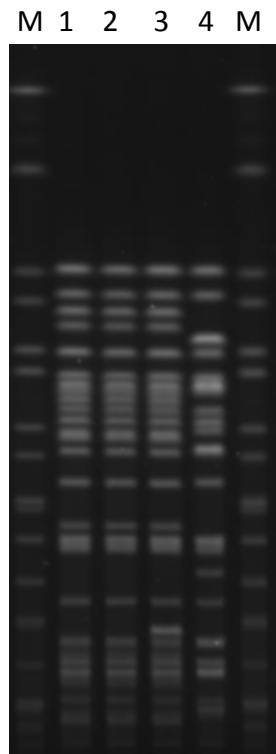


図3.10 地衛研10のPFGE電気泳動写真

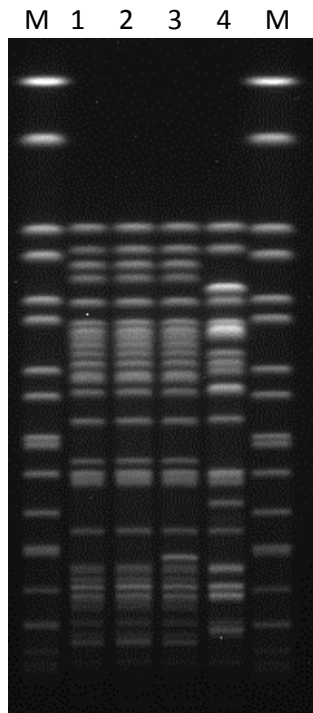
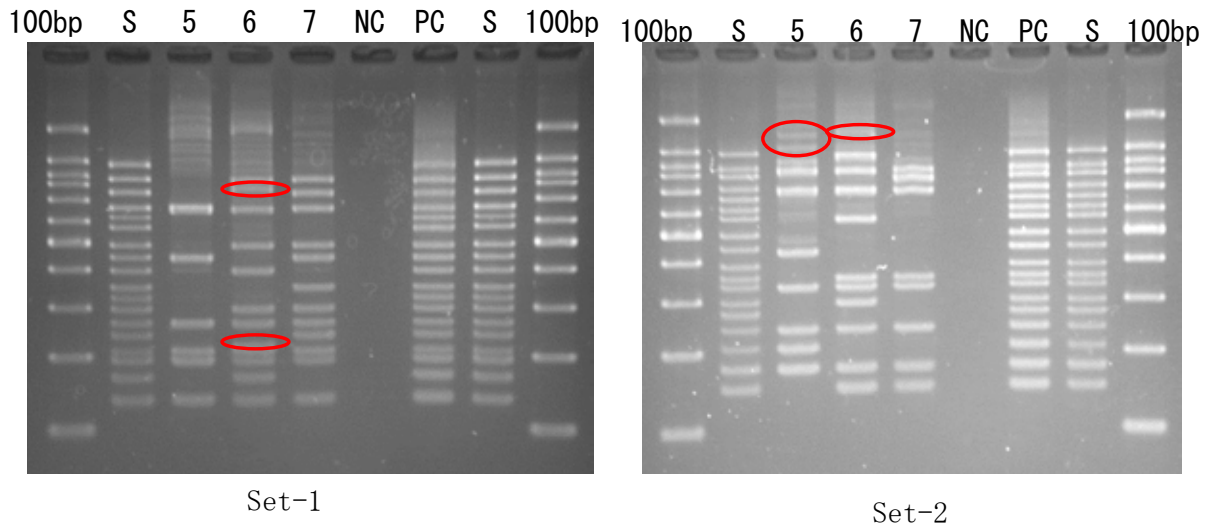


図3.11 地衛研12のPFGE電気泳動写真

表6 PFGE精度管理結果

地衛研	問1		問2		問3	
	関連性	異なるバンド数	関連性	異なるバンド数	関連性	異なるバンド数
1	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	11本
2	一致	0本	密接に關係	2本	不一致	15本
3	一致	0本	密接に關係	3本	不一致	20本
4	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	11本
5	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	14本
6	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	15本
7	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	11本
8	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	13本
9	一致	0本	密接に關係	3本	不一致	11本
10	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	10本
12	一致	0本	密接に關係	1本	不一致	16本



○ : エクストラバンドの位置

図4 ISPSの精度管理に使用した株の電気泳動写真

表7.1 菌株ISPS用5に対する各地衛研のISPS結果

地衛研	set-1												set-2																					
1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
4	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
5	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
6	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
7	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
8	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
9	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
10	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
11	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
12	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0

表7.2 菌株ISPS用6に対する各地衛研のISPS結果

地衛研	set-1												set-2																								
1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	
3	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1		
4	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
5	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
6	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1			
7	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1			
8	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1			
9	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1			
10	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1			
11	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1			
12	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1			

表7.3 菌株ISPS用7に対する各地衛研のISPS結果

地衛研	set-1														set-2																							
1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
2	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	
3	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1				
4	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
5	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
6	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
7	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
8	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
9	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
10	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
11	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0		
12	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0		

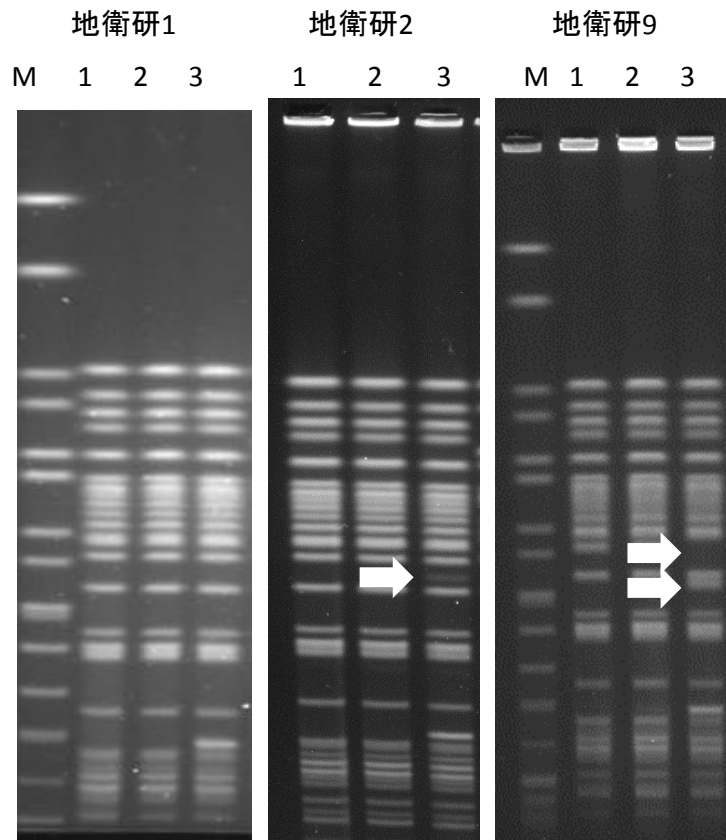


図5.1 変異した可能性があるPFGE写真

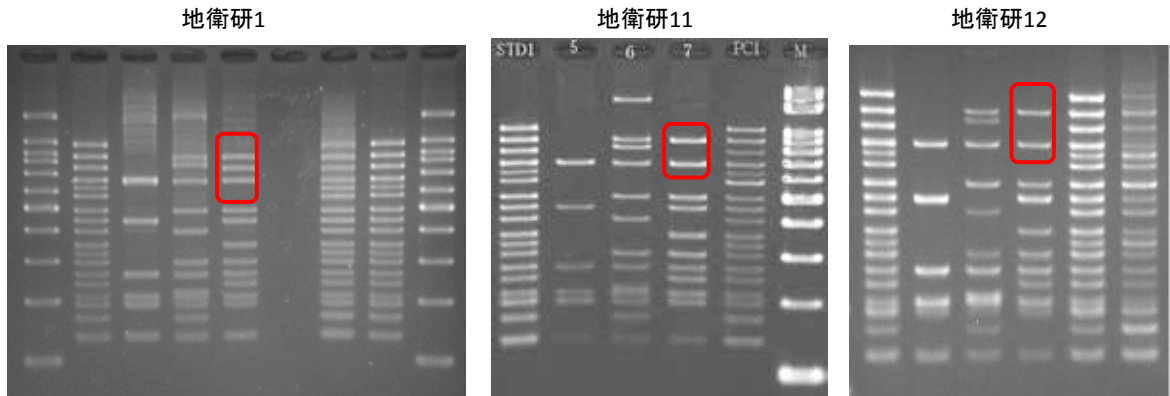


図5.2 *stx*ファージが脱落したと考えられる事例のSet1のISPS写真

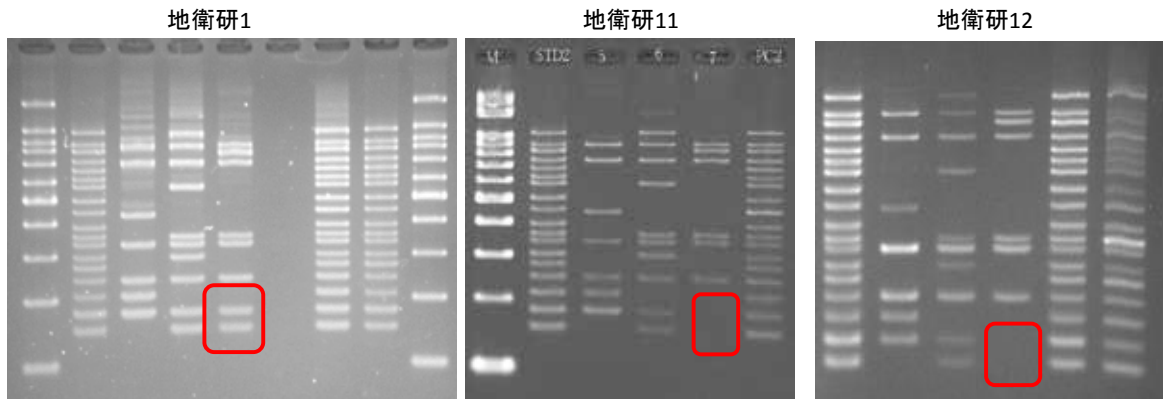


図5.3 *stx*ファージが脱落したと考えられる事例のSet2のISPS写真

表8 精度管理菌株の保存状況と精度管理検査実施日

地衛研	菌株到着日	保存状態	保存温度	検査開始日	
				PFGE	ISPS
1		そのまま保存	20℃	12月7日	12月19日
2	10月25日	そのまま保存	20℃	11月13日	10月31日
3	10月24日	そのまま保存	20℃	11月6日	11月27日
4	10月24日	そのまま保存	20℃	11月17日	11月13日
5	10月24日	そのまま保存	20℃	11月27日	12月4日
6	10月24日	そのまま保存	室温	10月30日	10月25日
7	10月24日	そのまま保存	20℃	12月4日	11月27日
8	10月24日	そのまま保存	室温	10月30日	10月25日
9	10月24日	そのまま保存	20℃	11月24日	11月13日
10	10月25日	そのまま保存	4℃	12月13日	11月21日
11		そのまま保存	20℃	実施なし	12月18日
12	10月30日	そのまま保存	室温 (10/30~12/13まで 23~26℃)	12月13日	11月29日

菌株調整日：10月16日
 使用培地：カジトン培地
 菌株発送日：10月23日

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）
「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 29 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・北里大学北里生命科学研究所・感染制御科学府ウイルス感染
制御学、ウイルス感染制御学 I
研究協力者 藤井克樹・国立感染症研究所、ウイルス第二部

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、昨年度に完成を見たマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA によるロタウイルス遺伝子型判定プログラムの β テストを実施した。

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マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA と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が完了した。本年度は型判別システムのパブリック β テストを行い、システムの稼働とその精度の確認を行った。

B. 研究方法

研究協力者の所有するロタウイルス陽性便検体を用いて MultiNA とバンドパターンによる流行株分類法を検証した。検体は、A 地域より 22 検体、B 地域より 9 検体、C 地域より 20 検体の合計 51 検体を用いて β テストランを行った。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を昨年度構築したソフトウェアに転送し、型判別を行った。

C. 研究結果および考察

A 地域の 22 検体中 16 検体からロタウイルスの遺伝子パターンが検出され、検出率は 72.7%であった。そのうち、シーケンスで確認された遺伝子型の正答率は 62.5%であった。B 地域の 9 検体中 6 検体からロタウイルスの遺伝子パターンが検出され、検出率は 66.7% 正答率 100%であった。以下同様に C 地域の 20 検体中検出されたのは 12 検体、検出率 60%、遺伝子型の正答率 33.3%であった。この 3 地域をまとめると、総検体数 51 検体の 34 検体からロタウイルスを検出し、検出率は 66.7%、遺伝子型の正答率は 58.8%であった。以下に正答率のばらつきの理由を調べるため、シーケンスによって確認した遺伝子型別の正答率をまとめた。

MultiNA タイピング法のテスト

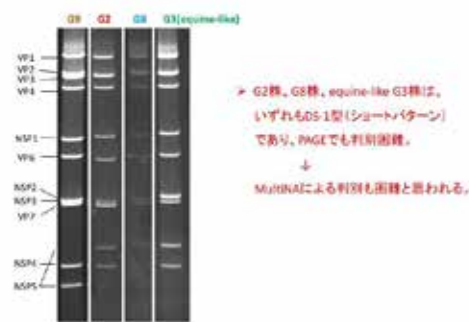
遺伝子型	検体数	正答数	(正答率)	備考
G1	7	6	(85.7%)	
G2	9	9	(100.0%)	
G9	4	4	(100.0%)	
G3(Wa)	8	1	(12.5%)	ハズレは全て G9 判定
G3(DS-1)	3	0	(0.0%)	全て G2 判定
G8	2	0	(0.0%)	全て G2 判定
Total	34	20	(58.8%)	

- ▶ 従来型の G3(Wa 型)は標準株の再検討で対応可能かもしれない。
- ▶ 近年流行し始めた equine-like G3(DS-1 型)は全て G2 判定となる。
- ▶ G8(DS-1 型)も標準株が存在せず全て G2 判定となる。

G1, G2, G9 など、基準泳動パターンのある遺伝子型の正答率は高かった。しかし、G3 セグメントを有する Wa ベースの遺伝子型は 8 例中 7 例が G9 型と判定されていた。G3 セグメントを有する DS-1 ベースの遺伝子型 3 例と、G8 セグメントを有する 3 例は、全て G2 と判定されていた。これらのうち、G3 セグメントを有する Wa ベースの遺伝子型は、基準泳動パターンが薄く不明瞭であったため、基準泳動パターン供給に用いる株（つまり、レファレンス株）を再検討することで対応が可能だと思われた。また、G8(DS-1 ベース)は、基準泳動パターンが無かったため、パターンの類似した G2 と判定されたと思われた。従って、G8(DS-1 ベース)株のレファレンス株を設定し、基準泳動パターンを供給することで、正しい判定ができるようになると思われた。

しかし、2 年ほど前から流行しはじめた G3 セグメントを有する DS-1 ベースの遺伝子型は、高解像度の RNA-PAGE を行った場合でも、バンドパターンで判別することが困難であった（一番右のレーン G3(equine like)株）。そのため、MultiNa を用いた本システムで型判定はできないと考えられた。

PAGEバンドパターンの比較



各地域のユーザーのコメントからは、全ゲノムセグメントを対象とした遺伝子型分類が、自動電気泳動後に、泳動パターンをウェブページ上のソフトウェアに送るだけである程度の精度をもって可能とする本システムについて、実用性はありそうとの回答を得ることができた。

現在、地方衛生研究所には MultiNa システムを有する研究所が多く、特殊な知識や技術が無くても、ロタウイルスの全ゲノムセグメントを対象とした簡易的な遺伝子型分類が可能

なウェブサイトは、ロタウイルスの疫学調査の底上げに十分対応可能だと考えられた。

E. 結論

MultiNA の 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、流行しているロタウイルスが、他の地域で流行しているロタウイルスと同じなのか、異なるのかをパターンをサーバーに送るだけである程度判別可能な本ウェブサイトは、ハードルの高かったロタウイルスの全ゲノムセグメントを対象とした分子疫学の底上げにつながる。また、今まで検出不可能であった食中毒事件の原因に成り得る C 群ロタウイルスの検出と鑑別にも対応可能な本システムの有用性は高い。引き続き β テストを続け小規模な改良を加え、来年度終了前には一般公開に踏み切りたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文)

1. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Onishi K, **Katayama K**, Kimura H. Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016–

2017. *Front. Microbiol.*, 18 January 2018 doi: 10.3389/fmicb.2018.00001. eCollection 2018.

2. Motoya T, Nagasawa K, Matsushima Y, Nagata N, Ryo A, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Morita Y, Suzuki Y, Sasaki N, **Katayama K**, Kimura H. Molecular Evolution of the *VP1* Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974-2015. *Front Microbiol.* 2017 Dec 5;8:2399. doi: 10.3389/fmicb.2017.02399. eCollection 2017.
3. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Ryo A, Fujita K, Oishi K, **Katayama K**, Kimura H. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17. *Emerg Infect Dis.* 2018 Jan;24(1):144-148. doi: 10.3201/eid2401.170284.
4. Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H,

- Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, **Katayama K**, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. *Infect Genet Evol.* **2017** Nov;*55*:209-217. doi: 10.1016/j.meegid.**2017**.09.013. Epub **2017** Sep 18.
5. Utsumi T, Lusida MI, Dinana Z, Wahyuni RM, Yamani LN, Juniastuti, Soetjipto, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Kimura H, **Katayama K**, Shoji I. Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia. *Infect Genet Evol.* **2017** Nov;*55*:1-7. doi: 10.1016/j.meegid.**2017**.08.020. Epub **2017** Aug 24.
6. Doan YH, Suzuki Y, Fujii Y, Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Someya Y, Nayak MK, Mukherjee A, Imamura D, Shinoda S, Chawla-Sarkar M, **Katayama K**. Complex reassortment events of unusual G9P[4] rotavirus strains in India between 2011 and 2013. *Infect Genet Evol.* **2017** Oct;*54*:417-428. doi:10.1016/j.meegid.**2017**.07.025. Epub **2017** Jul 25.
7. Kitamoto T, Takai-Todaka R, Kato A, Kanamori K, Takagi H, Yoshida K, **Katayama K**, Nakanishi A. Viral population changes during murine norovirus propagation in RAW 264.7 cells *Front Microbiol.* **2017** Jun *15*:8:1091. doi: 10.3389/fmicb.2017.01091. eCollection **2017**.
8. Kondo K, Tsugawa T, Ono M, Ohara T, Fujibayashi S, Tahara Y, Kubo N, Nakata S, Higashidate Y, Fujii Y, **Katayama K**, Yoto Y, Tsutsumi H. Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis.* **2017** Jun;*23*(6):968-972. doi: 10.3201/eid2306.160038.
9. Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara M, Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, **Katayama K**, Kimura H. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of

Human Norovirus Genotype GII.2
in Japan during 2004-2015.
Front Microbiol. 2017 Apr
25;8:705. doi:
10.3389/fmicb.2017.00705.
eCollection 2017.

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 29 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&配列検索システムを新サーバーシステムに移行した。これにより、NoroNet norovirus genotyping system へのリンク追加後の、データ量の急増と操作速度向上を実現した。さらにロタウイルスでは、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ソフトの搭載を実現し、本システムのβテストを開始した。

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のは難しい。昨年実装した、オートパイロットシステムの速度アップと、インターフェースの改良、NoroNet(国際標準のノロウイルスタイプングツールを搭載するウェブサイト・ノロウイルスの遺伝子型はここで決定されている。新規遺伝子型の報告、承認、遺伝子番号交付を行っている。)とのリンク、インターフェースの改良は、作業効率を大幅にアップさせた。今年度は、サブデータベースをサーバー内部に構築し、これを毎日自動更新することで、DDBJサーバー依存であった検索速度を改善することを目的として、OSの見直しを図った。さらに、新規に開発されるロタウイルス遺伝子型分類ソフトウェアを搭載し、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立ち上げを目的として活動した。

C. 研究結果および考察

【新サーバへの移行】

- 仮想サーバの導入により、データ保護、悪意のあるハッキングなどへの対応が可能となった。

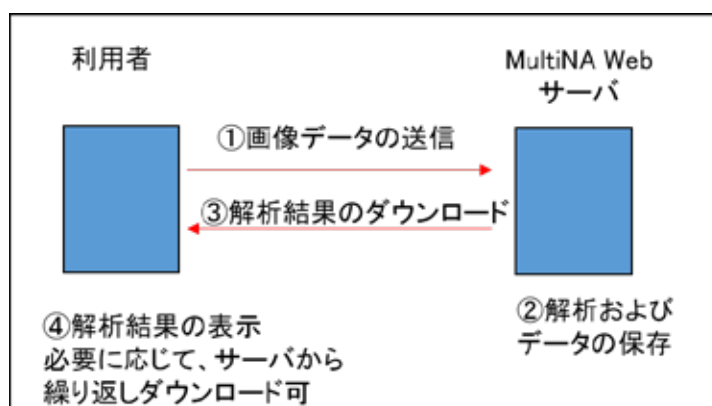
【ウイルスデータベース登録数】

	2017年 12月3 日現在	2017 年 1月 10日	2014 年 6月2 日
総登録数	107,953	97,035	62,648
Norovirus	35,472	31,272	20,192
Sapovirus	4,157	3,911	3,094
Lagovirus	1,824	1,557	1,154
Vesivirus	1,747	1,672	1,485
Rotavirus	65,987	58,623	38,023

【MultiNAWeb サーバの構築】

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、現在、デザインを含む公開用 WEB サーバ（仮称：MultiNAWeb サーバ）の最適化を検討中。2018年3月までに終了予定。

MultiNAWeb サーバの概念図



MultiNAWeb サーバの画面例
ログイン画面



ユーザー利用画面



解析結果ダウンロード画面

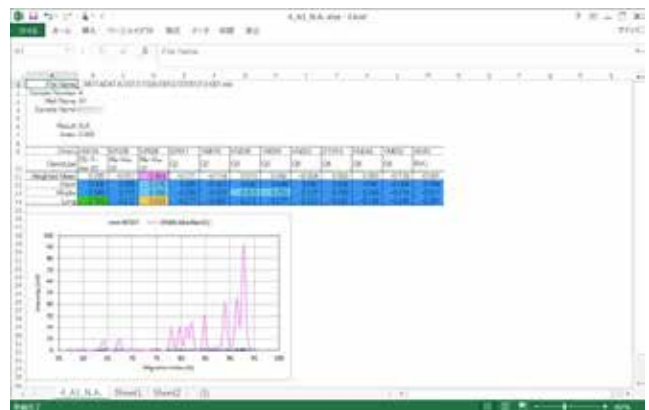


(zip 形式でダウンロード)

ダウンロードしたサンプル解析結果



データを Excel 形式に変換



①

E. 結論

ここから画像データをアップロードする

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

なし

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 29 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
Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Taku Wakui, Taichiro Ishige, Masaki Nakamura	<i>Escherichia coli</i> 0157 subclade 8b strains in Chiba Prefecture, Japan, produced larger amounts of Shiga toxin 2 than strains in subclade 8a and other clades.	PLOS ONE.	13	e0191834	2018
Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato MP, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, Maeda E, Piérard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee KI, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T	Population structure of <i>Escherichia coli</i> 026 : H11 with recent and repeated <i>stx2</i> acquisition in multiple lineages.	Microbial Genomics.	3		2017
Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Onishi K, Katayama K, Kimura H.	Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016-2017.	Front. Microbiol.	9	1	2018

Motoya T, Nagasawa K, Matsushima Y, Nagata N, Ryo A, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Morita Y, Suzuki Y, Sasaki N, Katayama K, Kimura H.	Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974-2015.	Front Microbiol.	8	2399	2017
Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H.	Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17.	Emerg Infect Dis.	24	144-148	2018
Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Oka T, Nagai M.	Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan.	Infect Genet Evol.	55	209-217	2017

Utsumi T, Lusida MI, Dinana Z, Wahyuni RM, Yamani LN, Juniastuti, Soetjipto, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Kimura H, Katayama K, Shoji I.	Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia.	Infect Genet Evol.	55	1-7	2017
Doan YH, Suzuki Y, Fujii Y, Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Someya Y, Nayak MK, Mukherjee A, Imamura D, Shinoda S, Chawla-Sarkar M, Katayama K.	Complex reassortment events of unusual G9P[4] rotavirus strains in India between 2011 and 2013.	Infect Genet Evol.	54	417-428	2017
Kitamoto T, Takai-Todaka R, Kato A, Kanamori K, Takagi H, Yoshida K, Katayama K, Nakanishi A.	Viral population changes during murine norovirus propagation in RAW 264.7 cells	Front Microbiol.	8	1091	2017
Kondo K, Tsugawa T, Ono M, Ohara T, Fujibayashi S, Tahara Y, Kubo N, Nakata S, Higashidate Y, Fujii Y, Katayama K, Yoto Y, Tsutsumi H.	Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014.	Emerg Infect Dis.	23	968-972	2017

Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara M, Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H.	Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004-2015.	Front Microbiol.	8	705	2017
泉谷秀昌、石原朋子、 李謙一、伊豫田淳、 大西真	2016年に分離された腸管出血性大 腸菌 0157、026 および 0111 株の MLVA 法による解析	IASR	38	100-101	2017
石原朋子、伊豫田淳、 泉谷秀昌、大西真	腸管出血性大腸菌 non-0157/026/0111 広域感染事例 の分子疫学解析	IASR	38	101-102	2017
李謙一、石原朋子、 泉谷秀昌、伊豫田淳、 大西真	全ゲノム配列解析を用いた腸管出 血性大腸菌の分子疫学解析	化学療法の領域	33	1467-1471	2017
上野詩歩子、黒岩祥 子、若松倫子、熊本 サチ子、永岡貴美子、 長岡章次、寺松孝二、 畔野征子、梅崎みど り、吉田まり子、松 尾美智代、濱崎光宏、 中山志幸、世良暢之	保育所で発生した腸管出血性大腸 菌 026 : H11 による集団感染事例- 福岡県	IASR	38	148-149	2017
吉田弘、高橋雅輝、 濱崎光宏、山下育孝、 四宮博人、山下照夫、 皆川洋子、岸本剛、 調恒明	エンテロウイルス検査の信頼性確 保について	IASR	38	199-200	2017