

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 27～29 年度総合研究報告書

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…………… 1

研究代表者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所

2. 平成 27～29 年度分担研究総合報告書

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…………… 18

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
	石原 朋子	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
	坂本裕美子	札幌市保健福祉局衛生研究所
	阿部正太郎	札幌市保健福祉局衛生研究所
	武沼 浩子	青森県環境保健センター
	山上 剛志	青森県環境保健センター
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	鈴木 裕	山形県衛生研究所
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	木村 葉子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	森 直子	仙台市衛生研究所
	菊地 理慧	福島県衛生研究所

三瓶 歩	福島県衛生研究所
川瀬 雅雄	新潟県保健環境科学研究所
青木 順子	新潟県保健環境科学研究所
菊池 綾子	新潟市衛生環境研究所

(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	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	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
	山本 和則	茨城県衛生研究所
	桐谷 礼子	栃木県保健環境センター
	松井 重憲	群馬県衛生環境研究所
	小林 美保	群馬県衛生環境研究所
	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
	植松 香星	山梨県衛生環境研究所
	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
	関口 真紀	長野県環境保全研究所
	井川由樹子	長野県環境保全研究所
	松橋 平太	静岡県環境衛生科学研究所
	山田 俊博	静岡県環境衛生科学研究所
	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等活用状況調査および情報共有に関する研究…… 49

研究分担者	鈴木 匡弘	愛知県衛生研究所
	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
	北川恵美子	石川県保健環境センター
	木村恵梨子	石川県保健環境センター
	東方 美保	福井県衛生研究所
	岩崎 理美	福井県衛生研究所
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	野田万希子	岐阜県保健環境研究所
	田中 保知	岐阜市衛生試験所
	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 邦彦	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

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・・ 65

研究分担者	勢戸 和子	大阪健康安全基盤研究所 (旧大阪府立公衆衛生研究所)
研究協力者	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
	坂口 初美	滋賀県衛生科学センター
	河野 智美	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
	木上 照子	京都府保健環境研究所
	平田 佐知	京都府保健環境研究所
	北野 隆一	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
	吉田 有希	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
	齋藤 悦子	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
高澤木綿子	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 (旧大阪市立環境科学研究所)
福田 弘美	堺市衛生研究所
下迫 純子	堺市衛生研究所
木村 友美	堺市衛生研究所
田邊 純子	奈良県保健研究センター
佐伯美由紀	奈良県保健研究センター
久野 翔平	奈良県保健研究センター
辻本 真弓	奈良県保健研究センター
阿部 剛士	奈良県保健研究センター
西山 貴士	和歌山市衛生研究所
金澤 祐子	和歌山市衛生研究所
中岡加陽子	和歌山県環境衛生研究センター
岩下さくら	和歌山県環境衛生研究センター
河合 高生	大阪健康安全基盤研究所 (旧大阪府立公衆衛生研究所)
原田 哲也	大阪健康安全基盤研究所
若林 友騎	大阪健康安全基盤研究所
河原 隆二	大阪健康安全基盤研究所
田口 真澄	大阪健康安全基盤研究所

(VI) 中国・四国ブロック

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…………… 75

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	河合 央博	岡山県環境保健センター
研究協力者	竹内 功二	鳥取県衛生環境研究所
	佐倉 千尋	鳥取県衛生環境研究所
	大友 麗	鳥取県衛生環境研究所
	川上 優太	島根県保健環境科学研究所
	川瀬 遵	島根県保健環境科学研究所
	福間 藍子	島根県保健環境科学研究所
	酒井 智健	島根県保健環境科学研究所
	秋田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田加奈子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター

千神 彩香	広島市衛生研究所
青田 達明	広島市衛生研究所
田内 敦子	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
野村 恭晴	山口県環境保健センター
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
石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
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
福田千恵美	香川県環境保健研究センター
岩下 陽子	香川県環境保健研究センター
安藤 友美	香川県環境保健研究センター
関 和美	香川県環境保健研究センター
仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
園部 祥代	愛媛県立衛生環境研究所
阿部 祐樹	愛媛県立衛生環境研究所
金山 知代	高知県衛生研究所
高橋 富世	高知県衛生研究所
高木 春佳	高知県衛生研究所
戸梶 彰彦	高知県衛生研究所
松本 道明	高知県衛生研究所
狩屋 英明	岡山県環境保健センター
大畠 律子	岡山県環境保健センター
檀上 博子	岡山県環境保健センター
仲 敦史	岡山県環境保健センター
畑 ますみ	岡山県環境保健センター

(VII) 九州ブロック

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、精度管理 (ISPS、PFGE) 及び

ISPS エクストラバンド情報の集約(平成 27～29 年度まとめ)— 93

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

岩佐奈津美	福岡市保健環境研究所
中村 悦子	北九州市保健環境研究所
有川 衣美	北九州市保健環境研究所
塘 由香	佐賀県衛生薬業センター
緒方美奈子	佐賀県衛生薬業センター
川野みどり	長崎県環境保健研究センター
小嶋 裕子	長崎県環境保健研究センター
高木由美香	長崎県環境保健研究センター
江原 裕子	長崎市保健環境試験所
成松 浩志	大分県衛生環境研究センター
福島 宏暢	熊本県保健環境科学研究所
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
杉谷和加奈	熊本市環境総合センター
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
村上 光一	福岡県保健環境研究所
西田 雅博	福岡県保健環境研究所
前田詠里子	福岡県保健環境研究所
岡元 冬樹	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 北里大学北里生命科学研究所
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.....	134
研究分担者	藤井 克樹 国立感染症研究所
	片山 和彦 国立感染症研究所
3. 研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 27～29 年度)	138

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
平成 27-29 年度総括研究報告書

「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)
甲斐明美・平井昭彦 (東京都健康安全研究センター)
鈴木匡弘・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)
中嶋洋・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 ;

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

泳動パターンの長鎖部分（上部）、中鎖部分（中部）、短鎖部分（下部）に分け、electrophoregramのフィッティング処理を行った後、その相関係数をそれぞれ算出した。

最終年度のβテストは、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ベース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

平成21年度から開始した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。平成23年度から構築を始めたIS-printing

system (ISPS) データベースについてはサーバー改修などの作業を進めながらデータベースの維持拡充を行った。平成26年度から運用を開始したMultilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法についてはin houseデータベースの構築を行った。平成28年度までは0157、026、0111の主要3血清群について、平成29年度はさらに0103、0121、0145、0165、091の5血清群を追加した。上記システムを活用し、ブロック代表研究分担者を通じた情報収集ならびに電子メールによる回覧、食中毒調査支援システム (NESFD) を活用した情報共有を行った。本研究の病原体情報の解析から、集団発生事例関連株によるクラスター形成、広域に検出される遺伝子型すなわち広域型の発生状況、ならびに共通の感染源が示唆される同一もしくは類似の遺伝子型を示す菌株のクラスターの存在が明らかとなった。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

平成27年度から平成29年度の3年間、北海道・東北・新潟ブロック内の地方衛生研究所11施設において、分子疫学的解析手法の検査精度向上と病原体情報の共有化システム構築を目的として腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157のISPSについて精度管理を実施した。秋田県で分離された菌株から毎年DNA溶液4種類を作製し、それを共通検体とした精度管理の結果は、いずれの施設も全体的には良好な電気泳動像が得られた。しかし、一部にはエキストラバンドの判定等に苦慮した施設もあった。施設における検査担当者の変更も頻繁にあり、検査精度を一定に保つためには技術の確実な伝承と精度管理による評価がとても重要であると

考えられた。また、ブロック内での情報共有システム構築の基礎的検討として、平成 28 年度は各施設で分離された散発事例の株、平成 29 年度は 0157 VT2 タイプの菌株の IS-Printing System による結果 (IS コード) を集積し発生パターンを調査した。秋田県においては、事例の発生の際、迅速に IS-Printing System の結果を行政へ情報提供を行う体制を構築し、平成 28 年度には冷凍メンチカツを感染源とする事例の隣県との情報共有に役立った。平成 29 年度には関東を中心に発生した 0157 VT2 タイプの IS コードと秋田県内において発生した事例の IS コードを比較し、所轄の保健所を含めた関連行政部署と連携体制の構築を検討した。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要なことから、腸管出血性大腸菌 0157 共通菌株を用いた分子疫学解析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。PFGE 法、ISPS および MLVA 法について実施した結果、すべての施設で良好な結果であった。

0157 の 230 株を PFGE 法と ISPS で解析した結果、両法の型別能はほぼ同等と考えられた。

ISPS の実践的プロトコールを作成すると共に、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、講師および研修生として参加し、MLVA 法普及を目指した。

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。また関東ブロックの研究協力施設では、すべての施設が PFGE 法と ISPS を実施しており、MLVA 法については実施施設数が年々増加していることが判明した。

【病原体情報の疫学調査への活用例の報告：千葉県、東京都、横浜市】

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 11 施設 (地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研) において、

1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、
 2. IS-printing 精度管理、
 3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指した。平成 27 年度は、
- 1) 分子疫学解析の実施状況調査：PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難であると考えられた。
 - 2) IS-printing 精度管理：過半数の地研で非特異バンドの誤判定または *hly* の増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。
 - 3) 地域共有データベース：クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。平成 28 年度は、1)

分子疫学解析の実施状況調査：PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難であると考えられた。2) IS-printing 精度管理：すべての地研から予定どおりの IS-printing 型が得られた。昨年度多く見られた *hly* の増幅不良は見られなかった。今年度の精度管理サンプルを昨年度使用した IS-printing 試薬のロットで試験したところ、*hly* の増幅が悪く、ロット間差によるものとみられた。3) 地域共有データベース：クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。平成 29 年度は、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 の間に出現するエキストラバンドで、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

地方衛生研究所（地衛研）で必要性が高いと考えられる腸管出血性大腸菌（EHEC）0157 の分子疫学解析について、近畿ブロック内で共通の遺伝子型別法を使用するため、IS-printing System 法および PFGE 法の精度管理を実施した。また、EHEC 0157 の発生状況や流行菌型を迅速に把握するため、近畿 IS データベースの充実と活用を図った。ISPS は、誤判定がみられた年もあったが、精度管理の実施およびエキストラバンド集の情報集約により、エキストラバンド増幅の存在を認識し慎重に判定することを徹底できた。近畿 IS データベースには 3 年間で 769 株の登録があった。分離年に特徴的で関連性が強く示唆されるタイプがある一方で、毎年 10 株以上登録されるような IS 型もみられた。同一タイプの集積時には、疫学情報や詳細な遺伝子型別結果を情報交換することが重要である。PFGE 法は、実施経験の少ない施設で、バンドが不明瞭あるいは未消化バンドが残るなど自動バンド認識が困難な場合があり、技術的な課題が残った。IS 法よりも解析能力が高く、PFGE 法よりも技術的要因の影響が少ないと考えられる MLVA 法について、地衛研への導入を検討すべきである。

6. 中国四国ブロック

食品由来感染症の分子疫学解析手法について、分子疫学解析結果を用いたデータベース構築や広域事例発生時の活用に向け、平成 27 年度から 29 年度に、中四国ブロッ

クの地方衛生研究所を対象に、腸管出血性大腸菌 0157 株を用いて、ISPS、PFGE 法、及び MLVA 法による精度管理を実施した。ISPS では、多くの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設で誤判定が見られた。これらはバンド位置の確認ミス（本来検出されるバンドとエキストラバンドの異同判定ミス）や低分子量側のバンドが薄くなりバンドの見落とし等が多かった。PFGE 法でも、多くの施設で良好な結果が得られたが、一部でスメアとなり解析不能となったところや、低分子量側のバンドが不明瞭となったところがあった。デンドログラム解析では、検査実施者によるバンド位置指定の差等により、施設間で類似度の順序が異なる傾向が見られた。ISPS 及び PFGE 法は、鮮明で判別可能な泳動像が得られるように技術を習得・維持し、慎重な解析が必要であると思われた。また、MLVA 法では、毎年、一部の施設でリピート数が異なる遺伝子座が見られ、今後、その要因を解明するとともに、一層の精度向上の必要性を感じた。また、中四国地域の EHEC 感染事例について分子疫学解析結果等疫学情報を収集して解析を行った。複数の県で同一の分子疫学解析結果となる菌株が毎年検出されたが、疫学情報が少なくそれらの事例間の疫学的な関連性は、ほとんどが不明であった。有意義に活用できるデータベースを構築するには、精度の高い分子疫学解析結果だけでなく、有益な疫学情報をいかに取り込むか検討することも今後の課題と思われる。

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、4.

精度管理及び 5. ISPS で発生したエキストラバンド情報の集約の 5 項目について取り組んだ。

九州地区における EHEC 0157 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 EHEC 0157 の検出数が少なかったため減少した。九州地区で平成 27～29 年度に収集された EHEC は 1338 株であった。その内訳は、EHEC 0157 が 606 株、EHEC 非 0157 が 700 株及び血清型別不能が 32 株であった。九州地区は EHEC 非 0157 の占める比率が 54.7%であり、本研究で EHEC 0157 に加えて非 0157 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 27～29 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例は 33 事例であった。その内訳は、EHEC 0157 によるものが 15 事例で、非 0157 によるものは 18 事例であった。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。精度管理は ISPS 及び PFGE について実施した。ISPS では、エキストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では泳動は概ね良好に行われていたが、一部、制限酵素処理が不十分な事例が認められた。また、平成 29 年度の精度管理において、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は、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。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、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築した。最終年度には、完成し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、開発を行った。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、システムの上昇につなげることが重要である。

平成 27-29 年度において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が多数報告された。報告には単独の自治体による事例、複数の自治体にまたがる事例など、様々な事例が含まれた。

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 0157 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を期待される。

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

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. Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol Infect.* 2016 Apr;144(6):1241-7.
2. 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真：2014年に分離された腸管出血性大腸菌0157、026および0111株のMLVA解析について。IASR、第36巻、83-84、2015年5月
3. Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus variable-number

- tandem repeat analysis. J Med Microbiol. 2016 Sep;65(9):1007-12.
4. 泉谷秀昌、黒木俊郎、林賢一、齊藤志保子、八柳潤、今野貴之、大西真：
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar 4:b:-株の解析。日本感染症学雑誌、第90巻、652-656、2016年
 5. 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真：2015年に分離された腸管出血性大腸菌0157、026および0111株のMLVA解析について。IASR、第37巻、93-95、2016年5月
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 市川健介、小西典子、甲斐明美他：生サラダが原因と推定されたチフス菌による食中毒事例—東京都、ISAR、第36巻、162-163、2015
 10. 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.
 11. Kayali AY, Escalante-Maldonado O, Uddhakul V, Seto K, Nakaguchi Y, Nishibuchi M: Development of a method for detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immuno-magnetic separation and loop-mediated isothermal amplification. Int. J. Immunol. Immunother. 2015, 2:1.
 12. Harada T, Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Multiplex real-time PCR assays for screening of Shiga toxin 1 and 2 genes, including all known subtypes, and *Escherichia coli* 026-, 0111-, and 0157-specific genes in beef and sprout enrichment cultures. J. Food Prot. 2015, 78: 1800-1811.
 13. Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, Kumeda Y, Suzuki Y: Characterization of third-generation-cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* 0157:H7 in Japan. J. Clin. Microbiol. 2015, 53:3035-3038.
 14. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T: Six novel O genotypes from Shiga

- toxin-producing *Escherichia coli*.
Front. Microbiol. 2016, 7:765.
15. 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.
 16. 四宮博人, 勢戸和子, 川瀬遵, 有川健太郎, 船渡川圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛顕, 調恒明: 地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情. 日本細菌学雑誌 2015, 70:309-318.
 17. 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 河原隆二, 久米田裕子, 田邊純子, 福田弘美, 中村寛海, 松原弘明, 泉谷秀昌: 近畿の飲食チェーン店で発生した食中毒が疑われる腸管出血性大腸菌O157事例. 病原微生物検出情報 2016, 37:89-90.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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. 2018 Jan 18;9:1.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, Tsuchiaka S, Naoi Y, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Aoki H, Katayama Y, Oba M, Oka T, Ichimaru T, Yamasato H, Ouchi Y, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan. *Virus Genes.* 2017 Aug;53(4):593-602.
 30. Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K. Evolutionary Constraints on the Norovirus Pandemic Variant GII.4_2006b over the Five-Year Persistence in Japan. *Front Microbiol.* 2017 Mar 13;8:410.
 31. Ito M, Kuroda M, Masuda T, Akagami M, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Naoi Y, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Mukono I, Ouchi Y, Yamasato H, Shirai J,

- Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination. *Infect Genet Evol.* 2017 Jun;50:38-48.
32. Hayashi-Miyamoto M, Murakami T, Minami-Fukuda F, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Naoi Y, Asano K, Ichimaru T, Haga K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Shirai J, Ishida M, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Diversity in VP3, NSP3, and NSP4 of rotavirus B detected from Japanese cattle. *Infect Genet Evol.* 2017 Apr;49:97-103.
33. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc.* 2016 Oct 6;4(5). pii: e01099-16.
34. Sano K, Naoi Y, Kishimoto M, Masuda T, Tanabe H, Ito M, Niira K, Haga K, Asano K, Tsuchiaka S, Omatsu T, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Ouchi Y, Yamasato H, Ishida M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Identification of further diversity among posaviruses. *Arch Virol.* 2016 Dec;161(12):3541-3548.
35. Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiol Immunol* 60, 609-616, 2016.
36. Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K. Functional receptor molecules CD3001f and CD3001d enable murine norovirus to internalize into host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 11;113(41):E6248-E6255., 2016.
37. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep.* 2016 Jul 7;6:29400.
38. Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017 Mar 24;70(2):167-170.
39. Suzuki Y, Doan H. Y., Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K. Predicting genotype compositions in

- norovirus seasons in Japan. *Microbiol and Immunol.* 60, 418-426, 2016.
40. Doan HY, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon-Tanaka N, and Katayama K. Genetic analysis of human rotavirus C: the appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries. *Infect Genet Evol.* 2016 Apr 9;41:160-173.
 41. Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Whole genome analysis of Japanese bovine toroviruses reveals natural recombination between porcine and bovine toroviruses. *Infect Genet Evol.* 2016 Mar;38:90-5.
 42. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One.* 2015 Nov 5;10(11):e0141739.
 43. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events. *PLoS One.* 2015 Sep 30;10(9):e0139381.
 44. Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. *J Vet Med Sci.* 2016 Feb;78(2):321-4.
 45. Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T and Tohya Y. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology.* 2016 Mar 15;185:62-7.
 46. Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep.* 2015 Sep 4;5:13806.
 47. Chapellier B, Tange S, Tasaki H,

- Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A. Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus. *Microbiol Immunol.* 2015 Oct;59(10):586-96.
48. Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan. *Virus Res.* 2015 Aug 7;210:205-212.
49. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan HY, Katayama K, Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill.* 2015 Jul 2;20(26). pii: 21173.
50. Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Park Y, Hall AJ, Vinjé J, Huang JC, Wu HS. Epidemiology and molecular characteristics of norovirus GII.4 Sydney outbreaks in Taiwan, January 2012-December 2013. *J Med Virol.* 2015 Sep;87(9):1462-70.
51. Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Thant KZ, Thu HM, Win MM, Oo HN, Htut T, Wakuda M, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen SV, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar. *PLoS One.* 2015 May 4;10(5):e0124965.

2) 学会発表等

1. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について(血清群 0157、026、0111 を中心に)。第 36 回日本食品微生物学会学術総会、2015 年 11 月、神奈川県川崎市。
2. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真；最近の EHEC の発生動向について 衛生微生物技術協議会第 36 回研究会、仙台、2015
3. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真；2015 年の Non-0157/026/0111 腸管出血性大腸菌における分子疫学解析 第 37 回日本食品微生物学会学術総会、東京、2016
4. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、李謙一、大西真；2015-2016 年における EHEC 広域 PFGE 型の発生動向 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、富山、2016
5. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2015 年における腸管出血性大腸菌 0157・026・0111 の分

- 子疫学解析。第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月、東京都。
6. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA 解析。平成 28 年度希少感染症診断技術研修会、2017 年 2 月、東京都。
 7. 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 O157・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。
 8. 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。
 9. 関口真紀、笠原ひとみ、粕尾しず子、中沢春幸：知的障害者施設においてインフルエンザウイルスおよび肺炎球菌による重複感染が認められた集団事例、第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016 年 2 月、静岡県
 10. 松下明子、倉園貴至、砂押克彦、青木敦子：2015 年に発生した腸管出血性大腸菌 O26 について、第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016 年 2 月、静岡県
 11. 平井晋一郎、横山栄二：腸管出血性大腸菌 O157 の subclade 8a 及び 8b における Stx2 産生性の比較、第 20 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成 28 年 11 月、富山県
 12. 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)
 13. 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
 14. 勢戸和子、河原隆二、原田哲也、田口真澄：EHEC O157 流行株探知のための近畿 IS データベース活用状況 第 19 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2015 年 7 月、東京)
 15. 勢戸和子、原田哲也、田口真澄、伊豫田淳：Non-O157 STEC の検査法—大阪府公衛研の経験を中心に—。第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016 年 11 月、富山)
 16. 田口真澄、河原隆二、原田哲也、勢戸和子：腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向。第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016 年 11 月、富山)
 17. 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)
 18. 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)

19. 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）
20. 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）
21. 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）
22. 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）
23. 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 026: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）
24. 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）
25. 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）

平成 27-29 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	石原 朋子	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 平成 21 年度から開始した 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。平成 23 年度から構築を始めた IS-printing system (ISPS) データベースについてはサーバー改修などの作業を進めながらデータベースの維持拡充を行った。平成 26 年度から運用を開始した Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法については in house データベースの構築を行った。平成 28 年度までは 0157、026、0111 の主要 3 血清群について、平成 29 年度はさらに 0103、0121、0145、0165、091 の 5 血清群を追加した。上記システムを活用し、ブロック代表研究分担者を通じた情報収集ならびに電子メールによる回覧、食中毒調査支援システム (NESFD) を活用した情報共有を行った。本研究の病原体情報の解析から、集団発生事例関連株によるクラスター形成、広域に検出される遺伝子型すなわち広域型の発生状況、ならびに共通の感染源が示唆される同一もしくは類似の遺伝子型を示す菌株のクラスターの存在が明らかとなった。

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。平成29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27-29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

EHEC主要3血清群(0157、026及び0111)については平成26年度より、追加5血清群については平成29年度よりMLVAを実施し、その一部についてPFGE解析を実施している。

1. PFGE

平成27年：主要3血清群714株(0157 447株、026 199株、0111 68株)を解析し

た。0157で274種類、026で144種類のサブタイプが同定された。それ以外の血清群については検出頻度の高い順に0103 67株、0121 64株、0145 29株、076 24株、091 19株、0146 13株などを解析した。0121については5、0146については4機関にまたがる広域型が観察された。

平成28年：主要3血清群643株(0157 429株、026 183株、0111 31株)を解析した。0157で296種類、026で146種類のサブタイプが同定された。それ以外の血清群については検出頻度の高い順に0103 93株、0121 48株、0145 25株、091 17株、0115 11株、0128 11株、08 10株などを解析した。0121については7機関にまたがる広域型が観察された。韓国産白菜キムチから0103が検出され、当該株が検疫所から感染研に送付された。PFGE解析を行い、データベースを検索した結果、同一パターンを示す菌株は検出されなかった。

平成29年：MLVAを実施した8血清群については、313株(0157 23株、026 7株、0103 91株、0121 19株、0145 12株、0165 2株、091 14株)を解析した。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。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

平成27年：0157 1549株解析し574の型を得た。1株しか検出されなかった型は371(65%)であった。同様に、026については689株、233型、145型(62%)であった。

0111 については 81 株、51 型、34 型 (67%) であった。2 株以上検出された型、その株数はそれぞれ、0157 203 型 1178 株、026 88 型 544 株、0111 17 型 47 株であった。

平成 28 年：0157 1651 株解析し 584 の型を得た。1 株しか検出されなかった型は 372 (64%) であった。同様に、026 については 694 株、219 型、116 型 (53%) であった。

0111 については 77 株、43 型、27 型 (63%) であった。2 株以上検出された型、その株数はそれぞれ、0157 212 型 1279 株、026 103 型 578 株、0111 16 型 50 株であった。

平成 29 年：0157 1581 株解析し 581 の型を得た。1 株しか検出されなかった型は 380 (65%) であった。同様に、026 については 686 株、243 型、151 型 (62%) であった。

0111 については 122 株、49 型、33 型 (67%) であった。2 株以上検出された型、その株数はそれぞれ、0157 201 型 1279 株、026 92 型 535 株、0111 16 型 89 株であった。

追加 5 血清群 305 株を解析し、132 のタイプが同定された。

(上記は平成 30 年 2 月 23 日時点のもの)

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。(コンプレックス解析は年度ごとに行っているため、以下の結果は年度当時のものである。)

平成 27 年度：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 749 株であった。このうちコンプレックスは 16 種類 (0157 が 13 種類、026 が 2 種類、0111 が 1 種類) であり、コンプレックスに含まれない広域タイプとしては

7 種類 (0157 で 5 種類、026 で 2 種類) であった。関与した機関数の多い上位 6 種類のコンプレックスは 15c020、15c011、15c010、15c017、15c041、15c025 であった。15c041 は 9 月に発生した集団事例関連株を含んでいた。

平成 28 年度：5 地研以上で検出された MLVA コンプレックスもしくはタイプに含まれる株は 668 株であった。このうちコンプレックスは 21 種類 (0157 が 20 種類、026 が 1 種類) であり、コンプレックスに含まれない広域タイプとしては 2 種類 (0157 で 1 種類、026 で 1 種類) であった。関与した機関数の多い上位 5 種類のコンプレックスは 16c010、16c008、16c027、16c059、16c026 であった。16c027、16c059、16c044 はそれぞれ、7 月、10 月、8 月に発生した広域集団事例関連株を含んでいた。

平成 29 年度：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。関与した機関数の多い上位 5 種類のコンプレックスは 17c013、17c201、17c027、17c044、17c050 であった。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 に掲載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。平成 29 年度は NESFD 掲示板に掲載した「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。

主要 3 血清群の 3 年間の解析から、2 株以上検出された MLVA タイプは全タイプの 36% であった。これは菌株数にして解析株の 74% に達する(各年及び血清群の平均値)。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 3 年間で 70 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. Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol Infect.* 2016 Apr;144(6):1241-7.
2. 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真：2014年に分離された腸管出血性大腸菌 O157、O26 および O111 株の MLVA 解析について。IASR、第 36 巻、83-84、2015 年 5 月
3. Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. *J Med Microbiol.* 2016 Sep;65(9):1007-12.
4. 泉谷秀昌、黒木俊郎、林賢一、齊藤志

保子、八柳潤、今野貴之、大西真：

Salmonella enterica subsp. *enterica*
serovar 4:b:-株の解析。日本感染症学雑
誌、第90巻、652-656、2016年

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

6. 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

7. 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

1. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、石嶋希、
伊豫田淳、大西真：腸管出血性大腸菌の分子
疫学解析について（血清群 0157、026、0111
を中心に）。第 36 回日本食品微生物学会学
術総会、2015 年 11 月、神奈川県川崎市。

2. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真 ；
最近の EHEC の発生動向について 衛生微
生物技術協議会第 36 回研究会、仙台、2015

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

4. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、李謙一、

大西真 ；2015-2016 年における EHEC 広域
PFGE 型の発生動向 第 20 回腸管出血性大
腸菌感染症研究会、富山、2016

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

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

7. 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。

8. 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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

平成 27－29 年度 分担研究報告書

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究

研究分担者	熊谷 優子	秋田県健康環境センター
研究協力者	池田 徹也	北海道立衛生研究所
	坂本裕美子	札幌市保健福祉局衛生研究所
	阿部正太郎	札幌市保健福祉局衛生研究所
	武沼 浩子	青森県環境保健センター
	山上 剛志	青森県環境保健センター
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	鈴木 裕	山形県衛生研究所
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	木村 葉子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	森 直子	仙台市衛生研究所
	菊地 理慧	福島県衛生研究所
	三瓶 歩	福島県衛生研究所
	川瀬 雅雄	新潟県保健環境科学研究所
	青木 順子	新潟県保健環境科学研究所
	菊池 綾子	新潟市衛生環境研究所

研究要旨

平成 27 年度から平成 29 年度の 3 年間、北海道・東北・新潟ブロック内の地方衛生研究所 11 施設において、分子疫学的解析手法の検査精度向上と病原体情報の共有化システム構築を目的として腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の IS-Printing System について精度管理を実施した。秋田県で分離された菌株から毎年 DNA 溶液 4 種類を作製し、それを共通検体とした精度管理の結果は、いずれの施設も全体的には良好な電気泳動像が得られた。しかし、一部にはエキストラバンドの判定等に苦慮した施設もあった。施設における検査担当者の変更も頻繁にあり、検査精度を一定に保つためには技術の確

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

A. 研究目的

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

特に、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の分子疫学的解析法の一つである IS-Printing System は迅速性に優れ、従来の方法に比べ短時間で解析結果 (IS コード) が得られるため、各地で食中毒等の事例対応の検査に活用され始めている。しかし、北海道・東北・新潟ブロックは他の地区ブロックに比べ事例数が少ないこともあり、IS-Printing System の利用が進んでいない。広域に食中毒患者等が発生した際の事例対応において、感染経路や原因食品を特定するためには、近隣の自治体との情報共有が重要であることから、北海道・東北・新潟ブロックにおける IS コードを共有化するシステム構築のため、共通菌株を用いた各施設の精度管理を実施するとともに、各県において分離された菌株の IS コードを集積し、実際に広域に患者発生がみられる菌株の有無を調査した。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた精度管理

1) 供試菌株配布

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

2) IS-Printing System による解析

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

2. 広域患者発生菌株の探索

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

3. 秋田県における食中毒事例への試行例

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた精度管理

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

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

2. 広域患者発生菌株の探索

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

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

3. 秋田県における食中毒事例への試行例

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

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

近年、個人情報保護の観点から自治体間の患者情報のやり取りは難しくなっ

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

D. 考察

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

し、IS コードのみでなくエキストラバンドの情報についても共有化することが必要である。

ブロック内の各施設で分離された菌株の一部について広域患者発生菌株を探索したところ、複数の菌株で IS コードの一致が見られた。今回の検討では、その他の患者情報等は収集していないため事例間の関連性は不明であるが、今後情報共有化システムが構築された際には、広域な患者発生を伴う食中毒や感染症の早期探知に IS-Printing System は有用と考えられる。本研究の成果を踏まえ、今後のブロック内での情報共有化システムの構築に向けては精度管理を重ね、さらなる検査精度の向上を図る必要があると考えられる。

E. 結論

北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所 11 施設における IS-Printing System の精度管理結果は、エキストラバンドについて判定で分かれたが、概ね良好であった。IS-Printing System は、広域にわたる事例発生時の病原体情報としては迅速性と有用性が高いことから、今後も精度管理で検査技術の精度を保ち、データの集積を継続する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

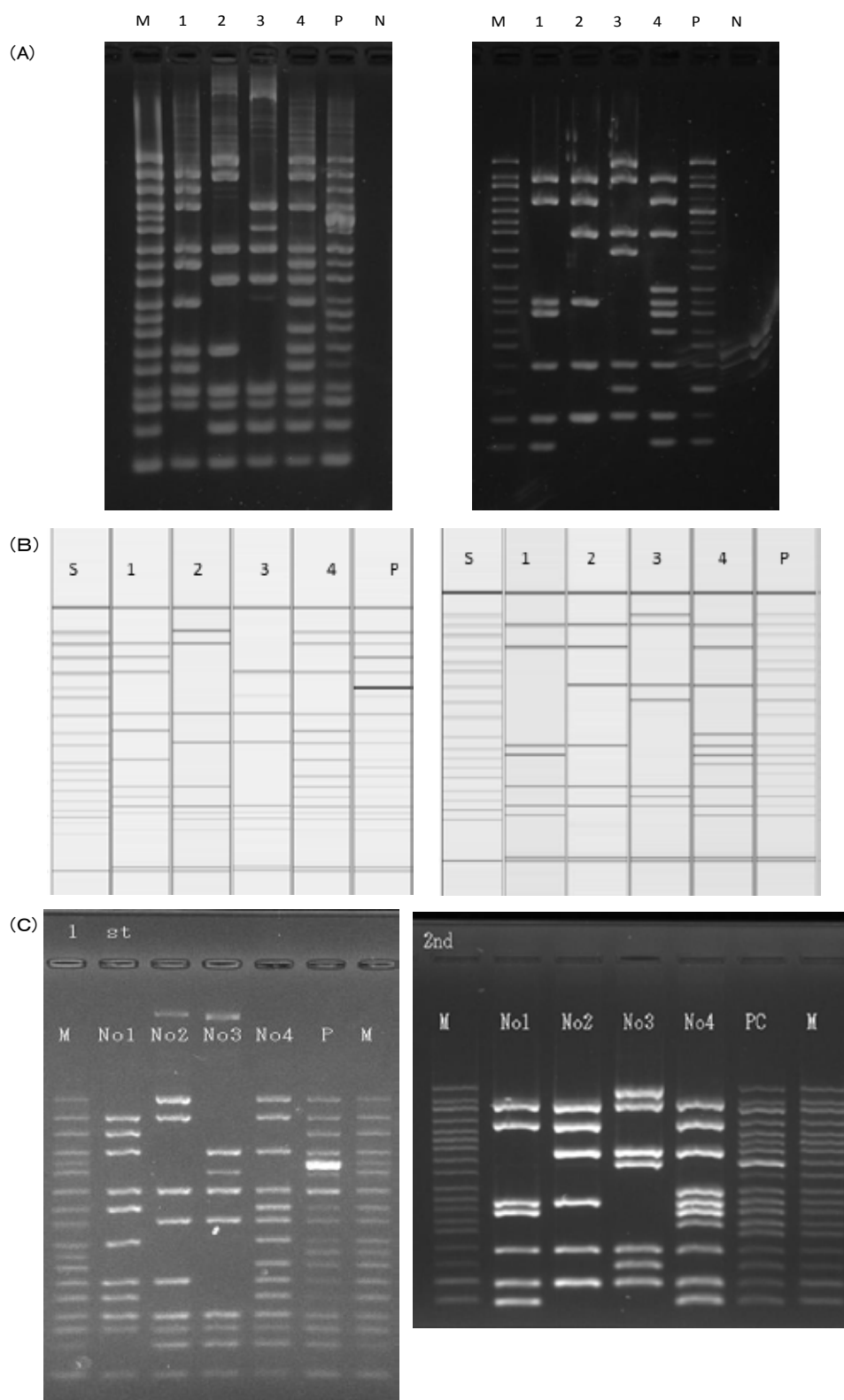
G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1 各施設の電気泳動像（平成 27 年度）



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

平成27年 IS-Printing キット使用時におけるアンケート調査

施設名 _____

平成 27年 月 日

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

- 4 サンプル調整について工夫している事はありますか？

- 5 PCR反応液の調整について工夫している事はありますか？

- 6 PCRサイクル条件について工夫している事はありますか？

- 7 電気泳動の条件について工夫している事はありますか？

- 8 バンド判定で注意が必要な事はありますか？

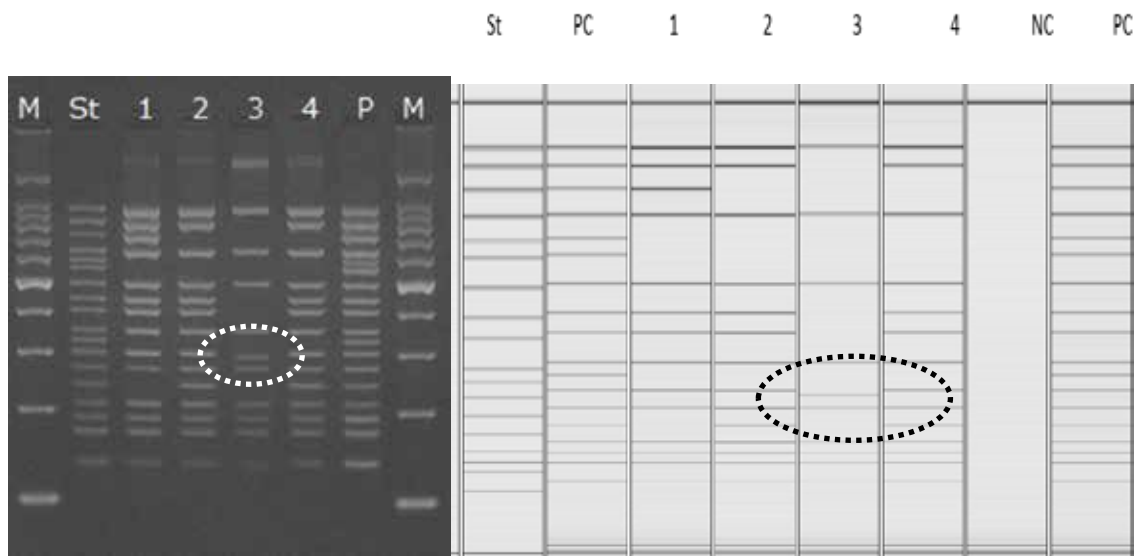
- 9 北海道・東北・新潟ブロックにおいて広域にわたる事例の際、どのようにして情報共有したら良いでしょうか？

- 10 他施設への質問やキット実施で感じた事などお書き下さい。

何でもお書き下さい。

ありがとうございました。

図 2 各施設の現状と検査状況の把握のため行ったアンケート



各施設でエキストラバンドと判定された泳動画像

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

Single PCR

1st set 1-12

CTCAGGGAGTTTAGTCTCCAGG

CCCAGTCGCAGCTGTGCTGTA size300bp

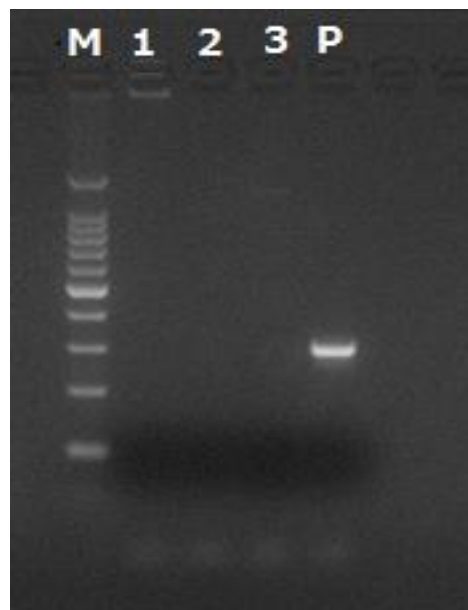


図 3 エキストラバンド疑い確認のための single PCR (平成 28 年度)

表 1 北海道・東北・新潟ブロック内 ISコード

ブロック内O157VT2タイプ株 17パターン (平成29年度)

1st set

No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eee	1-16	hlyA
1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
4	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
5	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
6	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
7	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
9	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
10	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
11	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
12	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
13	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
14	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
15	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
16	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
17	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1

2nd set

No.	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
2	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
3	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
4	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
6	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
7	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
8	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
9	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
10	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
11	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
12	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
13	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
14	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
15	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
16	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
17	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0

No.4 関東を中心に発生したタイプ

No.16 3施設一致株

ブロック内他施設と一致株 10パターン (平成28年度)

1st set

No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eee	1-16	hlyA
1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
6	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
7	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
10	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

2nd set

No.	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
6	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
7	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
8	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
9	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
10	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1

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 27～29 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	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	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
	山本 和則	茨城県衛生研究所
	桐谷 礼子	栃木県保健環境センター
	松井 重憲	群馬県衛生環境研究所
	小林 美保	群馬県衛生環境研究所
	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
	植松 香星	山梨県衛生環境研究所
	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
	関口 真紀	長野県環境保全研究所
	井川由樹子	長野県環境保全研究所
	松橋 平太	静岡県環境衛生科学研究所
	山田 俊博	静岡県環境衛生科学研究所
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 異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要なことから、腸管出血性大腸菌 O157 共通菌株を用いた分子疫学解析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。PFGE 法、IS 法および MLVA 法について実施した結果、すべての施設で良好な結果であった。

O157 の 230 株を PFGE 法と IS 法で解析した結果、両法の型別能はほぼ同等と考えられた。

IS 法の実践的プロトコールを作成すると共に、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、講師および研修生として参加し、MLVA 法普及を目指した。

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。また関東ブロックの研究協力施設では、すべての施設が PFGE 法と IS 法を実施しており、MLVA 法については実施施設数が年々増加していることが判明した。

A. 研究目的

食品媒介感染症が発生した際に最も重要なことは、感染源・感染経路の早期解明と感染拡大防止である。腸管出血性大腸菌 (EHEC) やサルモネラによる食中毒では、散発的集団発生 (Diffuse Outbreak) が問題となる可能性があることから、早期解明は重要である。感染経路や原因食材・食品を特定するためには、患者や調理従事者、食材・食品等から分離された病原体の詳細な解析が必要である。EHEC の解析には、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法、IS-printing System (IS) 法や multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法等が用いられている。

Diffuse Outbreak では、自治体をまたがる患者の発生や、他自治体で実施した食品等からの分離株について、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。異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、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。また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ることから、技術水準を一定以上に保つ取り組みが必要とされている。

このことから、各地研の技術向上と技術水準を一定以上に保つことを目的として、共通菌株を用いた定期的な精度管理調査を実施した。また、異動等により職員が変わっ

た際にもこれらの試験法が速やかに習得できるよう、実践的プロトコールやハンドブック作成などの検討を行った。

さらに、分子疫学解析を用いた病原体解析の現状と方向性について検討資料とすることを目的に、解析事例について情報収集すると共に、分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査を行った。

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 11 施設 (2017 年度は 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 法は 2017 年度から実施し、希望参加型とした。

1) 供試菌株

東京都内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 を、2015 年度と 2016 年度は 5 株、2017 年度は 4 株用いた。

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、撮影した写真をファイル化しメール添付で送付後、目視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 2017 年に実施した MLVA 法研修会に参加し、技術水準の一定化を目指した後に各施設で MLVA 法を行った。得られたデータは、リポート数への換算の有無を問わずに収集し、数値を比較することにより解析を行った。

2. EHEC の PFGE 法による解析

2015 年に東京都内で分離された O157 の 233 株、O26 の 49 株を供試し、国立感染症研究所プロトコールにより PFGE 法を行った。電気泳動後、100kb 以上のバンドを対象として目視で型別を行った。

3. EHEC O157 の IS 法による解析

2015 年に東京都内で分離され PFGE 解析を実施した O157 株のうち 230 株を供試し、IS 法により型別を行った。

4. IS 法の実践的プロトコール作成

IS 法は迅速・簡便に解析を実施できるが、マルチプレックス PCR を用いることから、テンプレート DNA の作製や電気泳動方法等について多少の工夫が必要となる。2014 年に、関東ブロックの研究協力施設で実施したアンケート調査結果を基に、IS 法の実践的プロトコール作成を検討した。さらに、電気泳動後のバンドの有無を判定しやすい条件について、泳動時間、泳動温度、分子量マーカーの位置等について検討を行った。

5. MLVA の実践的プロトコール作成 (執筆協力)

2017 年に地研全国協議会で、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。

6. 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。

7. 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。

8. 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

共通菌株を用いて PFGE 法を行った結果、3 年間ともいずれの施設もシャープなバンドが得られていた。しかしながら、画像ファイルで若干不鮮明なものも毎年散見した。元画像の問題かファイル解像度の問題と考えられた。(図 1)

2) IS 法

IS法の解析を実施した結果、3年間ともいずれの施設も良好な結果であった。しかし、2015年には *hly* 遺伝子が検出できない施設が1施設あり、またエキストラバンドを誤判定した施設が毎年1~2施設あった。

3) MLVA 法

2017年に、希望参加としてMLVA法も精度管理を実施したところ、8施設が参加した。参加施設すべてが良好な結果であった。(表1)

2. EHEC の PFGE 法による解析

PFGE解析を行った結果、O157の233株は86パターンに分類され、O26の49株は25パターンに分類された。

3. EHEC O157 の IS 法による解析

IS法解析を行った結果、O157の230株は75パターンに分類された。

4. IS 法の実践的プロトコール作成

電気泳動方法について検討を行った結果、分子量マーカーとしてTraclIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen) を用い、キシレンシアノール(青色色素)の位置がアガロースの下から約2cmのところまで泳動を終了すると、判定しやすいバンド感覚が得られることが判明した。

アンケート調査結果を集計し、実践的プロトコールの作成を行った。(別添「IS-printing System (TOYOBO) による腸管出血性大腸菌 O157 の解析法の実用的プロトコール」)

5. 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、「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。これらの協力の結果、「腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (O157、O26、O111 編)」が完成し、2017年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>)

6. MLVA 法の普及啓発 (研修会への参加) 結果

2017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年度腸管出血性大腸菌 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。

7. 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、毎年PFGE法、IS法およびMLVA法を行政活用した事例が報告され、各施設は多くの事例を経験していることが判明した。(一部事例を別紙「分子疫学解析が有効に活用された事例集」に後述)

8. 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3年間とも全施設が実施していることが判明した。MLVA法は2015年が4施設、2016年が6施設、2017年が7施設と実施施設が増加した。実施規模については、全菌株を実施している施設と一部菌株を実施している施設数が年により変動した。(表2)

D. 考察

2015年から2017年の3年間で、研究協力施設11施設のうち担当者の変更があったものは6施設あり、このうち2施設は毎年担当者の変更があった。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の取り組みが必要と考えられた。特に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。

そこで本研究では、各地研の技術向上と技術水準を一定以上に保つことを目的として、関東ブロックの研究協力施設で共通菌株を用いた精度管理を実施した。

菌株は、東京都で各年に分離された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法の結果も各施設良好であった。しかしながら、*hly* 遺伝子が検出できなかった施設

や、エキストラバンドを誤判定した施設、またエキストラバンドの報告が無い施設等があった。

MLVA法の精度管理試験を施行した結果、8施設の参加があり、結果は各施設とも良好であった。

EHECをPFGE法およびIS法で解析した結果、O157株はPFGE法では86パターンに、IS法では75パターンに分類されたことから、両者の型別能はほぼ同等であることが判明した。

各施設でIS法について実施している方法についてのアンケート調査結果を集計し、実践的プロトコールの作成を行った。

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で企画された事業であった。当研究班で、ハンドブックの執筆・校正に協力し、現場で活用可能なハンドブックを完成させた。またこのハンドブックを用いた研修会へ、研修講師として、あるいは研修生として参加し、MLVA法の普及と技術レベルの向上を行った。

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、関東ブロック内ではPFGE法とIS法は全施設が実施しており、MLVA法は2015年には4施設(11施設中)であったものが2017年には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。

IS 法の実践的プロトコール作成を行った。
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。MLVA 法実施施設数が増加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) 市川健介、小西典子、甲斐明美他：生サラダが原因と推定されたチフス菌による食中毒事例—東京都、病原微生物検出情報 (国立感染症研究所)、36、162-163、2015
- 2) 関口真紀、笠原ひとみ、粕尾しず子、中沢春幸：知的障害者施設においてインフルエンザウイルスおよび肺炎球菌による重複感染が認められた集団事例、第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016 年 2 月、静岡県
- 3) 松下明子、倉園貴至、砂押克彦、青木敦子：2015 年に発生した腸管出血性大腸菌 O26 について、第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016 年 2 月、静岡県
- 4) 平井晋一郎、横山栄二：腸管出血性大腸菌 O157 の subclade 8a 及び 8b における Stx2 産生性の比較、第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成 28 年 11 月、富山県
- 5) 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.

- 6) 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)
- 7) 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发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

図1 共通菌株の PFGE 像

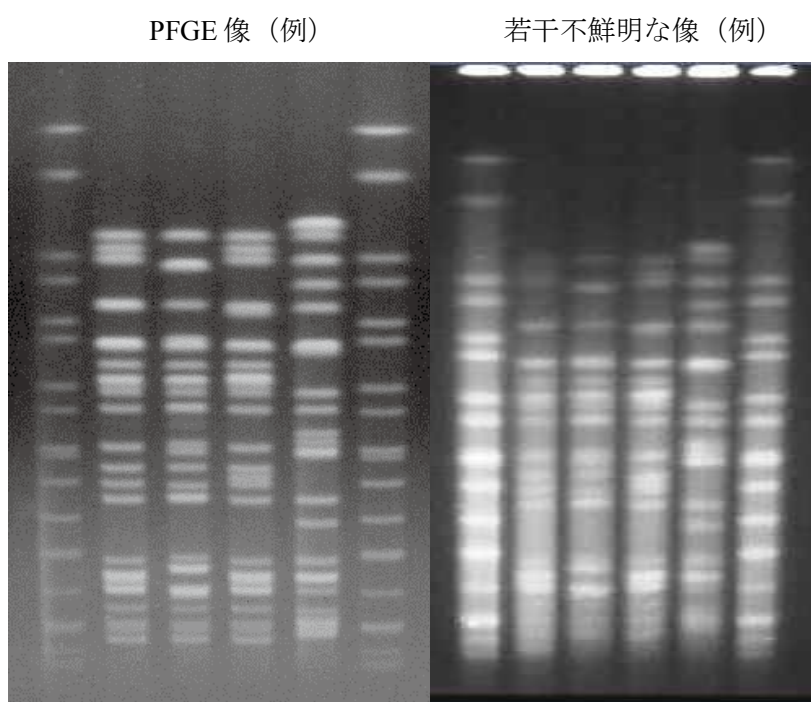


図2 共通菌株の IS 像

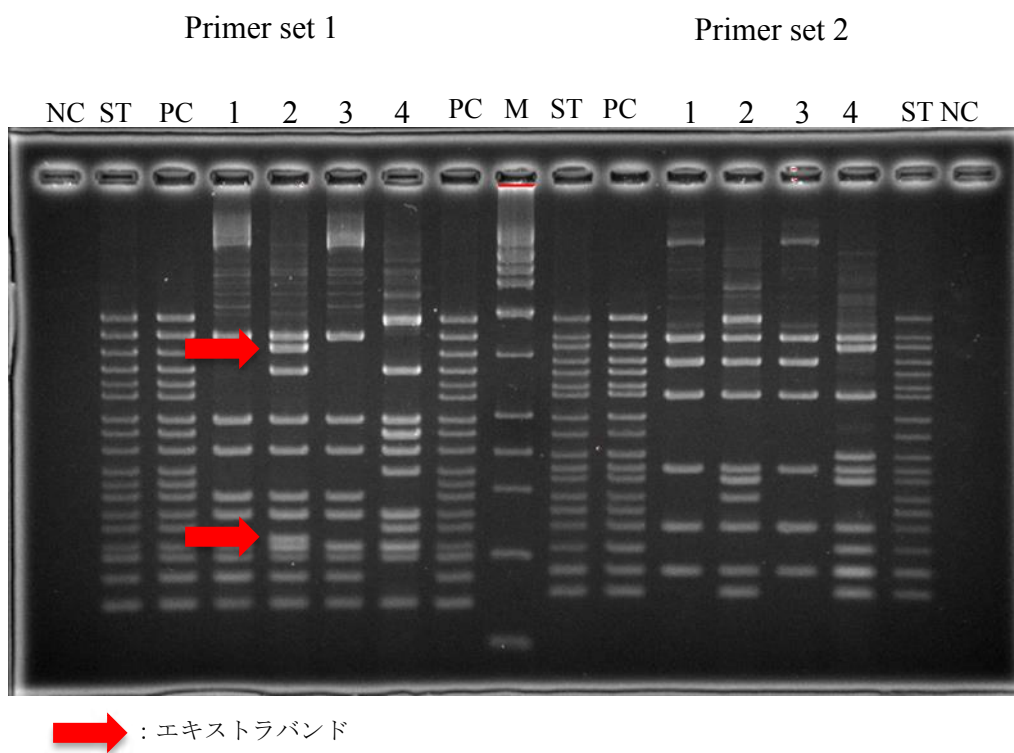


表1 共通菌株の MLVA 成績
菌株 1

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	

表2 分子疫学解析実施施設数

	実施施設数		
	2015年	2016年	2017年
PFGE法	11 (100%)	11 (100%)	10 (100%)
IS法	11 (100%)	11 (100%)	10 (100%)
MLVA法	4 (36.4%)	6 (54.5%)	7 (70.0%)

	全株について実施 (施設数)		
	2015年	2016年	2017年
PFGE法	6 (54.5%)	6 (54.5%)	3 (30.0%)
IS法	6 (54.5%)	6 (54.5%)	6 (60.0%)
MLVA法	2 (18.2%)	1 (9.1%)	3 (30.0%)

	一部の株について実施 (施設数)		
	2015年	2016年	2017年
PFGE法	5 (45.5%)	5 (45.5%)	7 (70.0%)
IS法	5 (45.5%)	5 (45.5%)	4 (40.0%)
MLVA法	2 (18.2%)	5 (45.5%)	4 (40.0%)

(別紙) 分子疫学解析が有効に活用された事例集

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

(2016 年 8 月 27 日)

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

(9 月 1 日)

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

(9 月 4 日)

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

(9 月 10 日～12 日)

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

事例 1 - 2. 東京都 H 市内の有料老人ホームで発生した O157 食中毒について

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

発生年月：2016 年 8 月

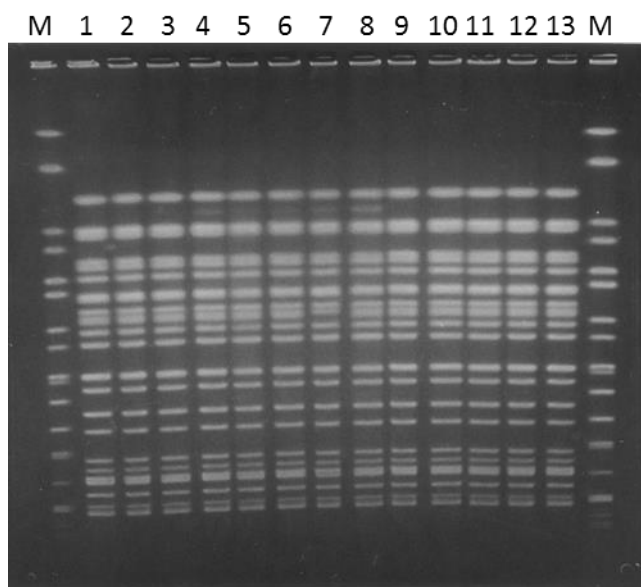
患者数：32 名

死亡者数：5 名

原因施設：高齢者施設

原因食品：きゅうりのゆかり和え（8 月 22 日夕食）

原因菌：腸管出血性大腸菌 O157 : H7（VT1+VT2 産生）



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

IS 法結果

1st set : 000100111101111111

2nd set : 011100100111001111

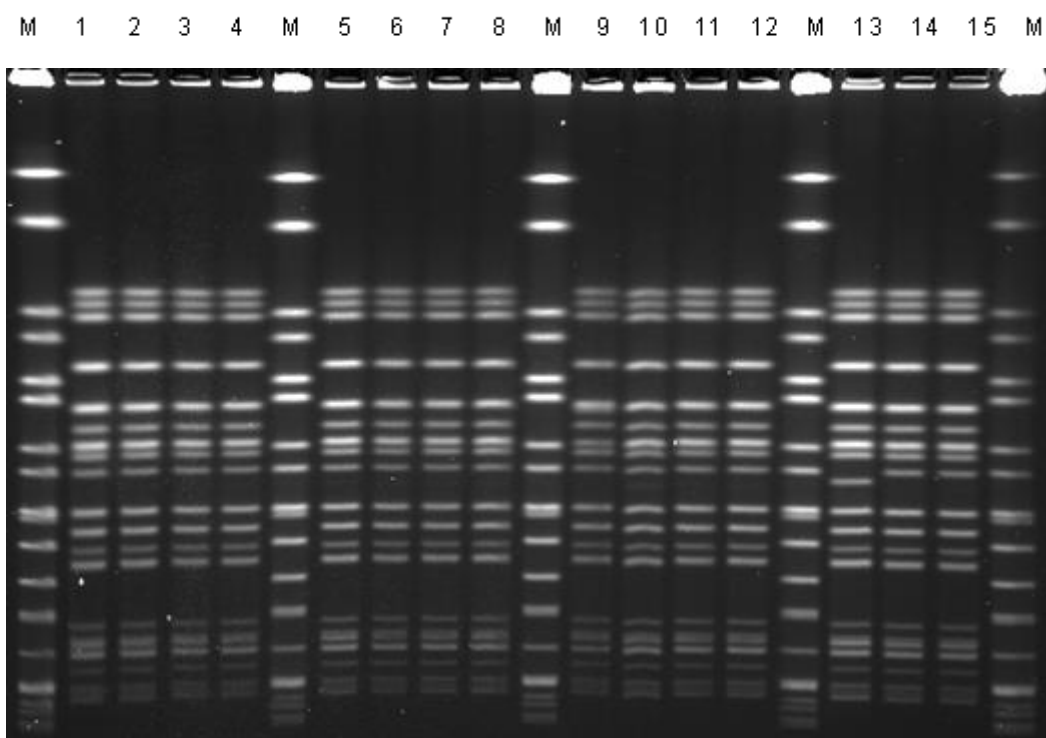
事例 2-1. メンチカツを原因とした食中毒事例（横浜市）

平成 28 年 10 月 31 日 神奈川県衛生研究所より、県域でメンチカツの喫食歴がある EHEC O157 患者が増加しているとの情報提供があった。VT2 産生株が検出された患者は共通して、特定のメンチカツの喫食歴があるとのことで、IS-printing のコードおよび PFGE 画像を電子メールで提供していただいた。市内にも同一メーカーのメンチカツが販売されていることから 10 月に分離された EHEC O157（VT2 産生）株について IS-printing を行ったところ 1 人が同一の IS-printing type であった。この患者はメンチカツを喫食していることが後から判明した。

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

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

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



1～12	患者、無症状病原体 保有者
13～15	メンチカツ

事例 2-2. メンチカツを原因とした食中毒事例（東京都）

東京都での患者発生状況

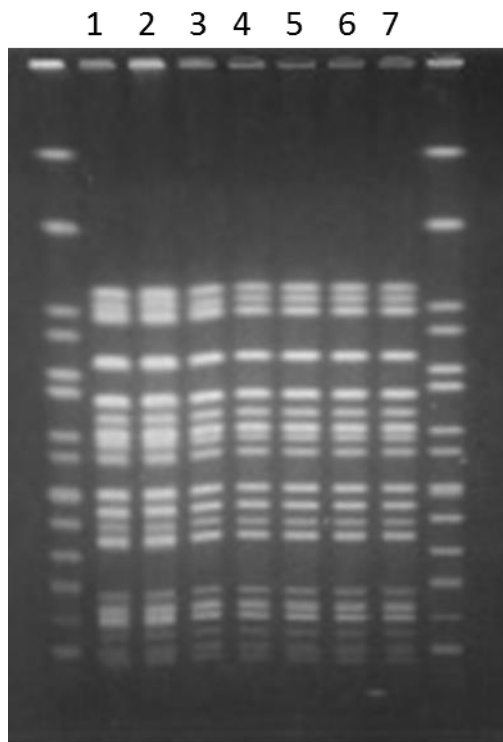
事例 1： 患者数 2 名

藤沢市の実家で冷凍メンチカツを喫食後発症

2 名から O157（VT2）を検出

事例 2： 患者数 1 名 10 月 27 日喫食

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



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

菌株：O157:H7(VT2産生)

事例 2-3. メンチカツを原因とした食中毒事例（千葉県）

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

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

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

別添

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

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

1. PCR 用 Template の調製

1) 推奨法 (取扱説明書) : アルカリ溶解法

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

2) 都健安研法

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

3) その他の DNA 濃度の調製方法

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

2. PCR 反応液の調製 (取扱説明書のとおり)

1) 1st set

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

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

3. PCR サイクル条件 (取扱説明書のとおり)

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

4. 電気泳動

1) 電気泳動用アガロース

(1) 推奨法 (取扱説明書)

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

(2) その他の電気泳動用アガロース

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

2) 電気泳動用アガロースの作製方法

buffer は 0.5×TBE を使用

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

3) 電気泳動装置

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

- Mupid
- Pico-2
- GelMate2000 など

4) 電気泳動時間

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

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

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

5) 電気泳動時の buffer の温度

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

6) 染色液

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

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による IS printing System 等
活用状況調査および情報共有に関する研究

研究分担者 鈴木匡弘、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
北川恵美子、木村恵梨子 石川県保健環境センター
東方美保、岩崎理美 福井県衛生研究所
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所
野田万希子 岐阜県保健環境研究所
田中保知、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
中根邦彦 岡崎市総合検査センター
多和田光紀 豊田市衛生試験所

研究要旨

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

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

2. IS-printing 精度管理

過半数の地研で非特異バンドの誤判定または hly の増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

平成 28 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

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

2. IS-printing 精度管理

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

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

平成 29 年度

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 及び代表的な血清型の分子疫学解析手法として multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) が登場し、迅速性に加えデータベース化しやすい環境が整ってきた。そこで本研究では東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

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

2. IS-printing 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 3 株からカラム精製した DNA（10 ng/μL）を送付し、解析結果を送付してもらった。その際、解析に使用したサーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、電気泳動条件についての調査を行った。なお、送付した 3 検体のうち、検体番号

①については 1-02 と 1-03 の間、及び 1-15 よりやや大きい位置に非特異バンドが検出される株であった（図 1）。

3. 地域共有データベース

各地研におけるデータ登録及びデータ閲覧の利便性を考慮し、クラウドデータベースサービスである kintone（サイボウズ、東京）を利用した IS-printing の情報共有システム構築を行った。登録情報としては施設名称、菌株の分離年月日、IS-printing の結果、及びその他の項目として非特異バンドを入力可能とした。データ登録は各地研が Excel ファイルに入力したデータを一括登録することとした（図 2A-F）。登録したデータは直ちに反映され、各ユーザーが確認可能となる。また、IS-printing の遺伝子型は視認性向上のため、8 桁毎に 10 進法に変換したコード番号を付与した。

平成 28 年度

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

（倫理面への配慮）

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

平成 29 年度

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

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

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

2. IS-printing 精度管理

各地研における IS-printing system の解析結果は表 2 のとおりである。Set2 については全ての地研が正しい結果であった。一方 set1 については 3 地研のみ正しい回答が得られ、残る 7 地研については何らかの間違ひが見られた。間違ひの原因としては 1-02 と 1-03 の間の非特異バンド

を 1-03(+)と報告した地研が 3 カ所、hly を(-)と報告した地研が 4 カ所あった。hly を(-)と報告した地研においてもキット付属の std は全てのバンドがはっきりと確認できた。

各地研における使用機器を表 3 に示す。各地研で様々なサーマルサイクラーが使われていた。電気泳動装置については Mupid ブランドのミニゲル電気泳動装置が多かったが、一部バイオラドの Sub cell GT を使用している地研も見られた。アガロースについては添付文書どおりとした地研が 7 カ所と最も多かった。

3. 地域共有データベース

データベースの運用は平成 27 年 10 月 1 日から開始した。運用に当たっては各地研におけるセキュリティポリシーの確認作業が必要となる場合があり、地研によって運用開始まで日数を要することがあった。平成 28 年 2 月 8 日現在、4 カ所の地研から 39 株の EHEC 0157 の IS-printing 情報が登録されている。データベースに登録された 39 株は 18 種類の IS-printing 型に分かれた。そのうち、6 種類の IS-printing 型では複数県からの分離が見られた。

平成 28 年度

1. IS-printing 精度管理

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

各地研における使用機器を表 2 に示す。各地研で様々なサーマルサイクラーが使われていた。電気泳動装置については Mupid ブランドのミニゲル電気泳動装置が多かったが、一部バイオラドの Sub cell GT を使用している地研も見られた。アガロースについては添付文書どおりとした地研が 7 カ所と最も多かった。

3. 地域共有データベース

平成 27 年 10 月 1 日から開始したデータベースの運用は平成 28 年 3 月 31 日で一旦停止し、平成 28 年 4 月 22 日から再開した。平成 29 年 2 月 20 日現在、5 つの地研から 125 株 (そのうち、75 株が平成 28 年度の分離株) の EHEC 0157 の IS-

printing 情報が登録されている。データベースに登録された平成 28 年度分離の 75 株は 27 種類の IS-printing 型に分かれた。そのうち、10 種類の IS-printing 型に分類された 41 株において、複数県からの同一 IS-printing 型株の分離が見られた (表 3)。

平成 29 年度

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。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

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

検査を実施していない一地研を除き、全ての地研で PFGE と IS-printing は実施可能であった。しかし、その多くは outbreak 発生時のみの検査であり、diffuse outbreak 対応するには日頃からデータを蓄積する必要があることから、各地研の協力が重要となる。一方 MLVA については、実施している施設は 2 施設のみであり、地域内

での情報共有は困難である。MLVA データについては今後も感染症研究所経由での情報共有が続くとみられる。

2. IS-printing 精度管理

非特異増幅が見られる菌株で、誤判定が頻発する実態が明らかとなった。誤判定した施設の多くは電気泳動に問題があり、電気泳動のガイドラインを提示する必要があると考えられた。非特異バンドの誤判定を防ぐには、非特異バンドが出現しやすい位置に関する情報提供が必要である。また今回 *hly* のバンドが薄く、“判定とした施設が多くあった。*Hly* については従来から増幅が悪いことがあるといわれていたが、PCR 環境の違いや、試薬のロット間差による増幅効率の違いに加え、精度管理用 DNA 調製に問題がないか総合的に判断する必要があると考えられた。

3. 地域共有データベース

運用が 10 月以降と、EHEC シーズン終盤以降のスタートとなったことから、今年度については試用版として位置づけられた。データベースには必要最小限度のデータしか登録しないこととしたため、セキュリティポリシー上の問題は無いと考えている。しかし、データを登録したのは 4 地研にとどまっており、今後、地区の集まりを利用して説明会を開くなど、利用法について啓蒙する必要があると考えられた。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないことから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

平成 28 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

検査を実施していない一地研を除き、全ての地研で PFGE と IS-printing は実施可能であった。しかし、およそ半数は outbreak 発生時のみの検査であった。diffuse outbreak 対応するには日頃からデータを蓄積する必要があることから、各地研の協力が重要となる。また、登録のタイミングが遅い傾向にあり、頻繁にデータ登録を行ってもらうことも今後の課題である。一方 MLVA については、実施している施設は 2 施設のみであり、地域内での情報共有は困難である。

MLVA データについては今後も感染症研究所経由での情報共有が続くとみられる。

2. IS-printing 精度管理

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

3. 地域共有データベース

4月から運用開始され、EHECシーズンをカバーすることができた。同一IS-printing型の株は頻繁に分離されており、県境をまたいだ感染事例存在の可能性が示唆されたが、原因調査には結びつかなかったようである。衛生研究所には実地調査の権限がないことも多く、容易に調査ができない実態があると考えられる。また、同一IS-printing型株が比較的多く見られることも問題であり、より菌株識別能力の高い方法による裏付けが必要と考えられる。同一IS-printingパターンの株が見つかった場合、可能な限り速やかにMLVAを行う体制を構築する必要があると考えられた。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

平成 29 年度

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ブロック内の情報共有をスス進める必要がある。

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

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

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

2. IS-printing 精度管理

過半数の地研で非特異バンドの誤判定または *hly* の増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

平成 28 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

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

2. IS-printing 精度管理

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

3. 地域共有データベース

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

平成 29 年度

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

誌上発表

なし

学会発表

1. 山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門ら 志賀毒素産生性大腸菌 PCR-based ORF Typing (STEC-POT) 法の開発 第 19 回腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症研究会 平成 27 年 7 月 9 日～10 日 東京都

平成 27 年度

表 1 腸管出血性大腸菌分子疫学解析実施状況

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

表 2 IS-printing 精度管理結果

施設名	検体 1		検体 2		検体 3		判定エラーの推定原因
	Set1	Set2	Set1	Set2	Set1	Set2	
A	○	○	○	○	○	○	
B	○	○	○	○	○	○	
C	#1	○	1-02 (-)	○	○	○	電気泳動時のアプライ量過多疑い
D	#1	○	○	○	○	○	電気泳動距離不足
E	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	
F	#1	○	○	○	○	○	電気泳動距離不足
G	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	
H	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	
I	○	○	○	○	○	○	
J	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	

○ 想定どおりの結果を報告

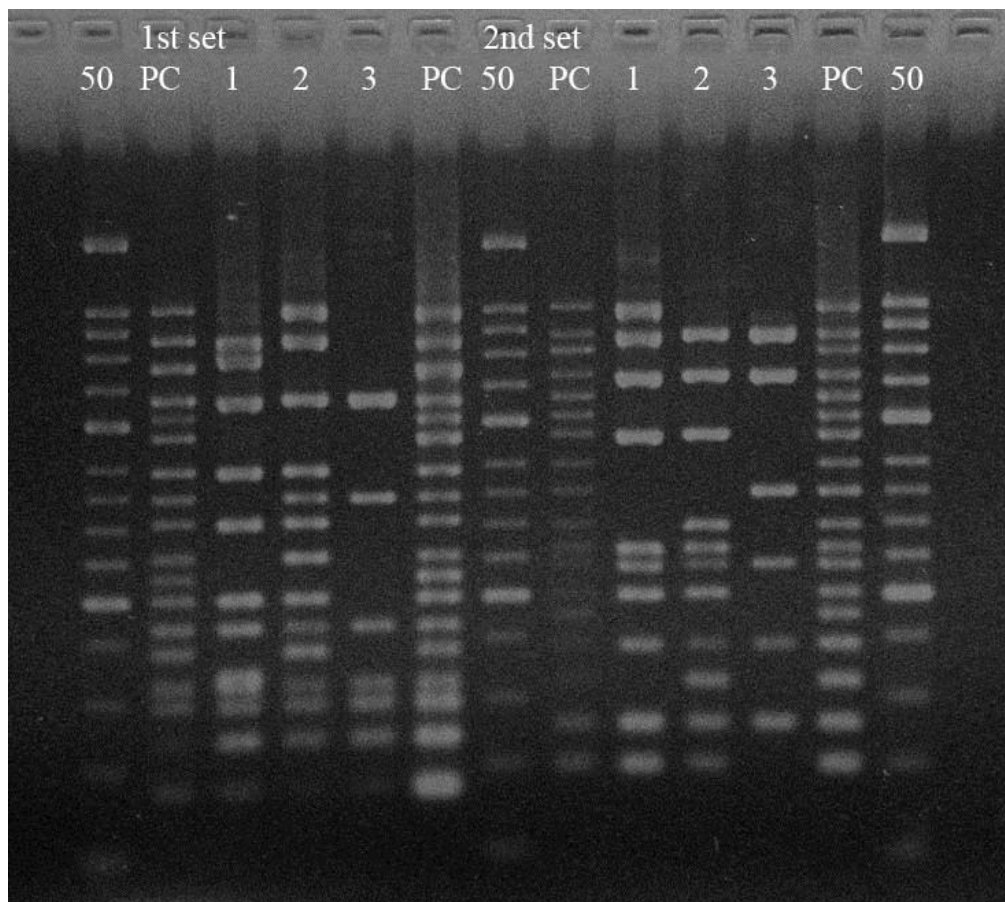
#1-02 と 1-03 の間の非特異バンドを 1-03(+) と報告

表 3 各施設における PCR 実施環境

施設	サーマルサイクラー	電気泳動装置	備考
愛知	9700/TP650/GA	Mupid exu 100V 70 min	テンプレート作成は 5% Chelex 100
A	TP600/TP650	Mupid 100V 135 min	
B	9700	Mupid-3 100V 120 min	
C	Takara MP	BioRad subcell GT 100V 60 min	
D	2720	Mupid-21 100V 45 min	NuSieve 3:1 Agarose 使用
E	C1000 touch	i-Mupid J 100V 60 min	3% Agarose HC (関東化学)使用
F	9700	BioRad sbcell GT 100V 65 min	
G	TP600/TP650 ?	CosmoBio MyRun 100V 110 min	Seakem GTG を Seakem Gold に変更
H	Veriti	電気泳動装置記載なし 100V 60 min	
I	Veriti	Mupid 100V 70 min	
J	Veriti	Mupid exu 100V 70 min	

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

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



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

図 2 クラウドデータベース kintone へのデータ入力方法

A. Login 画面



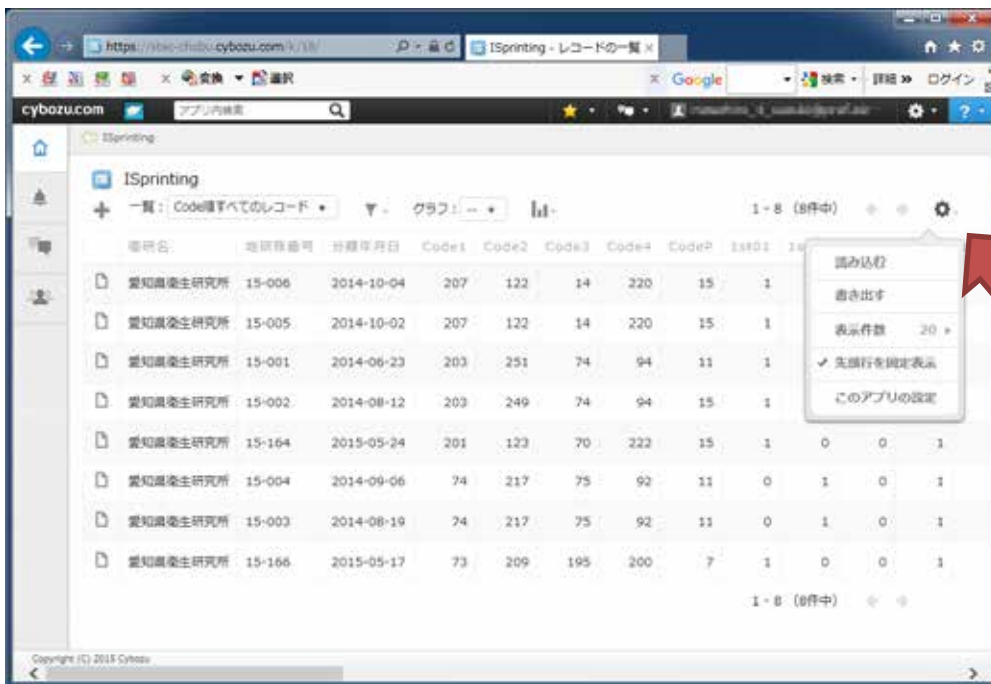
B. Kintone をクリック



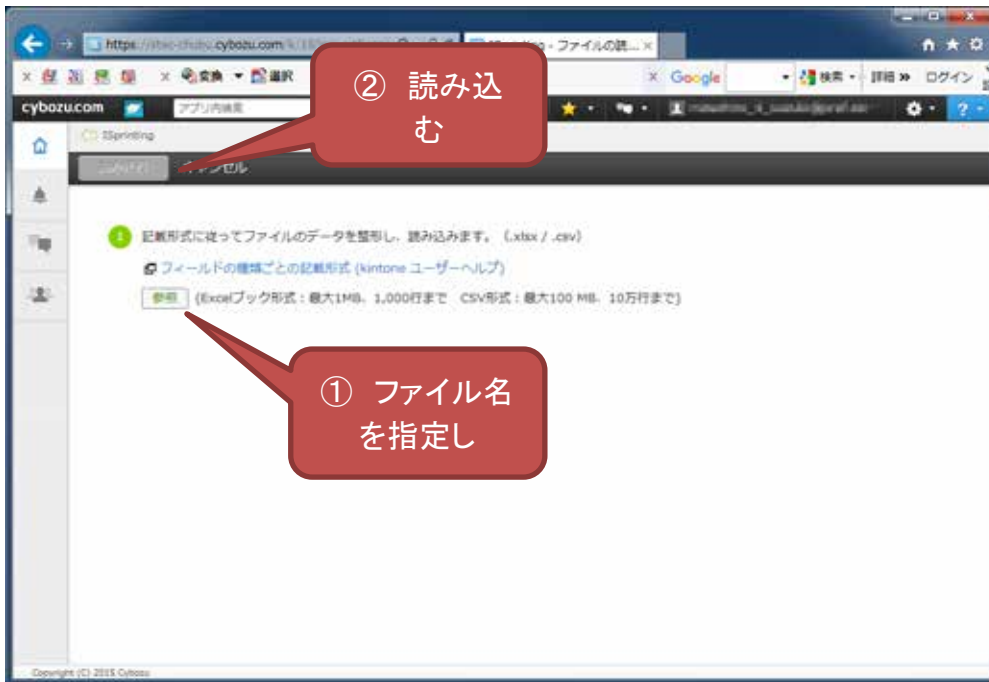
C. IS-printing をクリック



D. データのインポート



E. データのインポート実行



F. ログアウト



平成 28 年度

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

表 2 各施設における PCR 実施環境

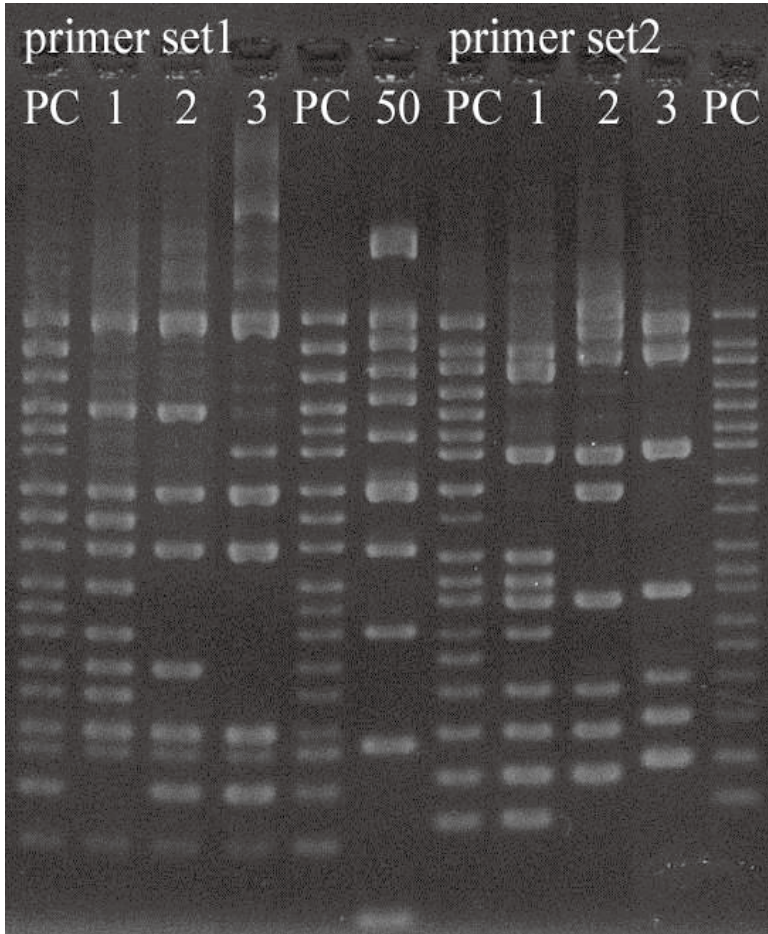
施設	サーマルサイクラー	電気泳動装置	備考
愛知	9700/TP650/GA	Mupid exU 100V 70 min	
A	TP600/TP650	Mupid 100V 135 min	テンプレート作成は 5% Chelex 100
B	Veriti	Mupid exU 100V 75 min	テンプレート作成は 5% Chelex 100
C	Takara MP	iMyRUN 135V 110min	
D	2720	iMyRUN 100V 150min	NuSieve 3:1 Agarose 使用
E	C1000 touch	Mupid 100V 60 min	3% Agarose HC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

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

表 3 複数県から検出された IS-printing パターン

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

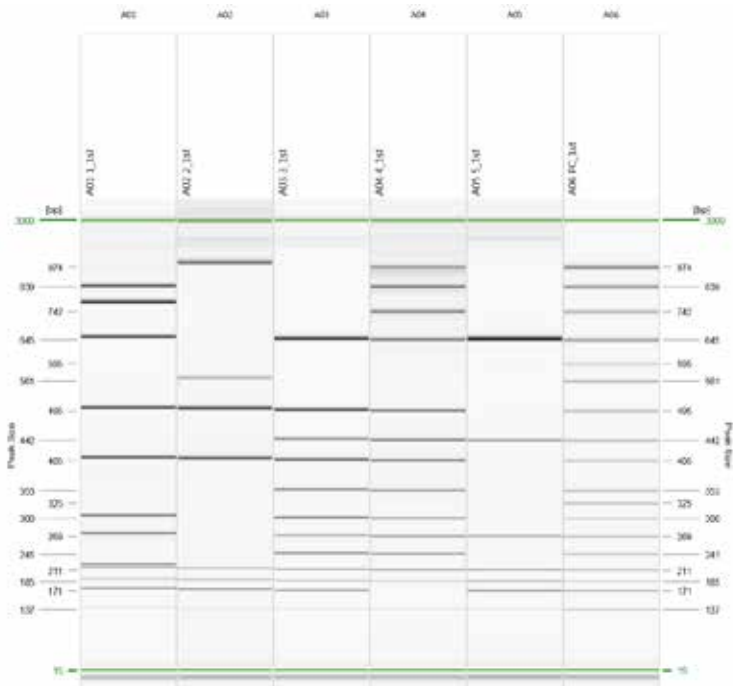
図1 IS-printing 精度管理用に送付した3株のIS-printing パターン



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

平成 29 年度

図 1 精度管理に用いた IS-PS 泳動図



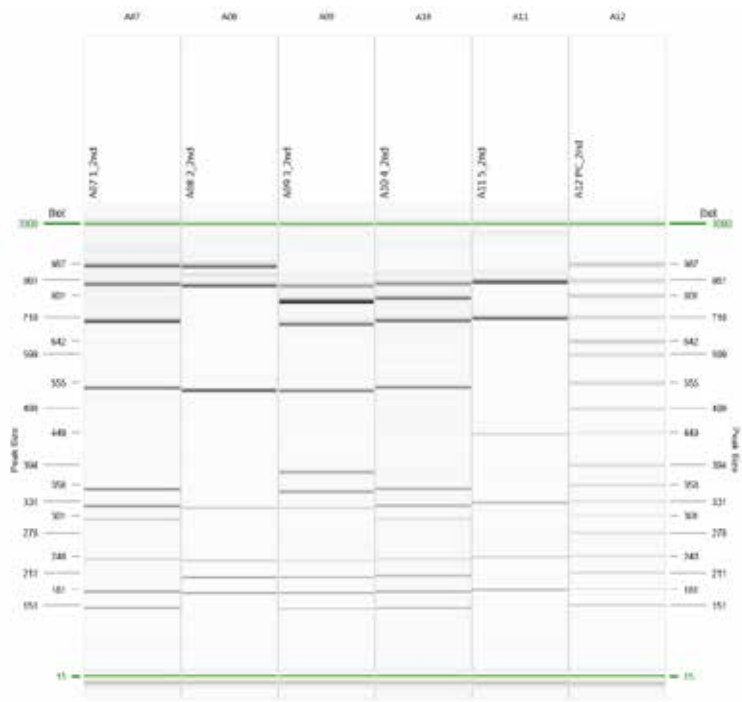


表1 各施設におけるPCR実施環境

	A	B	C	D	E
施設					
サンプル作成方法	5%ベックスで熱抽出	アロカ熱抽出(30ml Nuc12)に移	添付文書どおり	添付文書推奨法(アロカ溶解法)	添付文書どおり
サーマルサイクラー機種名	Veriti	T100 サーマルサイクラー(バイオ-ラッド)	Applied Biosystems Veriti	2720 Thermal cycler (ABI)	PCRシステムProflex
IS-pyriming PCR反応ボリューム	20μl	20μl	50μl	50μl	50μl
アグロースの濃度及び温度	3% Nusieve GTG, SeaKem GTG=2:1	3% Agrose KANTO HG in 0.5×TBE	3% Nusieve GTG, SeaKem GTG=2:1	3% Nusieve GTG, SeaKem GTG=2:1	3% アグロース(Nusieve GTG, SeaKem GTG=2:1)
電気泳動槽の種類	Mupid ミニガル泳動槽	+Mupid ミニガル泳動槽(コストモバイオ)	Mupid-exu	Mupid-21 ミニガル泳動槽(コストモバイオ)	コストモバイオ
電気泳動槽上・時間	50V 50min, 100V 30min	100V 60分前後(泳動状況で変動)	100V 70分	100V 75min	135V 135分
泳動バッファー	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE
その他		TakaraのDx2型を使用			
施設	F	G	H	I	J
サンプル作成方法	送付されたサンプルそのままサンプルコロニーから熱抽出法によりサンプルDNAを		添付文書通り	添付文書どおり	
サーマルサイクラー機種名	Applied Biosystems Veriti 200	BIO-RAD C1000 Thermal Cycler	Applied Biosystem Veriti	PCRシステムProflex	Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycler
IS-pyriming PCR反応ボリューム	50μl	25μl	添付文書通り	50μl	20μl
アグロースの濃度及び温度	Nusieve GTG, SeaKem GTG=2:1 3%	Nusieve 3:1 Agrose, 3%	添付文書通り	3% アグロース(Nusieve GTG, SeaKem GTG=2:1)	Nusieve 3:1 アグロース 3%
電気泳動槽の種類	Mupid	BIO-RAD MINI-SUB CELL GT	ADVANCE Mupid-exu	コストモバイオ	CosmoBio, MRun
電気泳動槽上・時間	100V 75分	100V 40分	100V 40分	135V 135分	100V 20min
泳動バッファー	0.5×TBE	0.5×TBE	添付文書通り	0.5×TBE	0.5×TBE Buffer
その他					サンプルはバイオシステムにて泳動

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制作推進研究事業）
平成 27～29 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	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 (旧大阪府立公衆衛生研究所)
研究協力者	井上英耶、梅原成子、坂口初美 河野智美 藤本直樹、大石剛史、武田直樹 木上照子、平田佐知、北野隆一 清水麻衣、中川 力、吉田有希 荻田堅一、坂野 桂、秋山由美 齋藤悦子 濱 夏樹、野本竜平 横田隼一郎、高澤木綿子 村山隆太郎、平垣内雅規 中村寛海	滋賀県衛生科学センター 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 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 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 (旧大阪市立環境科学研究所)
	福田弘美、下迫純子、木村友美 田邊純子、佐伯美由紀、久野翔平 辻本真弓、阿部剛士 西山貴士、金澤祐子 中岡加陽子、岩下さくら 河合高生、原田哲也 若林友騎、河原隆二、田口真澄	堺市衛生研究所 奈良県保健研究センター 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 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 (旧大阪府立公衆衛生研究所)

研究要旨

地方衛生研究所（地衛研）で必要性が高いと考えられる腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の分子疫学解析について、近畿ブロック内で共通の遺伝子型別法を使用するため、IS-printing System（IS）法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法の精度管理を実施した。また、EHEC O157 の発生状況や流行菌型を迅速に把握するため、近畿 IS データベースの充実と活用を図った。IS 法は、誤判定がみられた年もあったが、精度管理の実施およびエキストラバンド集の情報集約により、エキストラバンド増幅の存在を認識し慎重に判定することを徹底できた。近畿 IS データベースには 3 年間で 769 株の登録があった。分離年に特徴的で関連性が強く示唆されるタイプがある一方で、毎年 10 株以上登録されるような IS 型もみられた。同一タイプの集積時には、疫学情報や詳細な遺伝子型別結果を情報交換することが重要

である。PFGE 法は、実施経験の少ない施設で、バンドが不明瞭あるいは未消化バンドが残るなど自動バンド認識が困難な場合があり、技術的な課題が残った。IS 法よりも解析能力が高く、PFGE 法よりも技術的要因の影響が少ないと考えられる Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法について、地衛研への導入を検討すべきである。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症では、全国的に分離株の遺伝子型別が実施されており、近畿ブロックでも、最も届出数の多い血清群 O157 についてはスクリーニング法として IS-printing System (IS) 法を、より詳細な解析法として O157 以外の血清群でも解析可能なパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法を実施している。これらの方法を 12 箇所の地衛研で共通の遺伝子型別法として用いるため、毎年精度管理を実施した。また、EHEC O157 の発生状況や流行菌型を迅速に把握するため、IS 法の型別結果を数値化した近畿 IS データベースの充実と活用を図った。これらの方法は各自治体で発生した様々な事例にも応用し、疫学解析の一助とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には、大阪府で分離された EHEC O157 を使用した。実施年の分離株から異なる遺伝子型の株を選択し、所定の菌株搬送容器を用いて研究協力者に送付した。

2. IS 法の精度管理

IS 法は、IS-printing System Version 2 (東洋紡) を使用し、電気泳動は説明書に記載の条件 (3%アガロースゲルと 0.5xTBE バッファ

ーを使用) または自動電気泳動装置 (QIAxcel; QIAGEN、MultiNA; 島津製作所) を用いた。プライマーごとに増幅の有無を「1」「0」で記入した判定表と電気泳動画像を研究分担者に送信した。

3. 近畿 IS データベース

施設ごとに 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研究分担者およびデータベース管理者に送信され、データベース管理者はそれらを元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。

データ入力には、IS 法の判定結果に加えて、菌株番号、血清型、日付 (分離日、発症日など)、管轄保健所を必須項目とし、判定結果は十進法に変換した「IS コード」としてデータベース上に表示した。2017 年には、国立感染症研究所 (感染研) で実施している Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 型および感染研番号を追記でき、感染研 IS パターン番号が表示されるようバージョンアップを行った (図 1)。

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、サイズマーカー (*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断) の Band 9 と

Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、Band 16 が認識できる電気泳動画像を求めた。画像は TIFF ファイルにして研究分担者に送信され、大阪健康安全基盤研究所(旧大阪府立公衆衛生研究所)で、BioNumerics ver. 6.1 (Applied Maths) を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 近畿ブロックにおける遺伝子型別実施状況

毎年、EHEC の遺伝子型別実施状況に関するアンケートを実施した(表 1)。IS 法を実施している 11 施設では、収集された EHEC O157 の全株について解析しており、H29 年度はこれまで未実施であった 1 施設が精度管理に参加した。PFGE 法については、精度管理株および行政対応等で依頼のあった EHEC またはその他の菌種について実施していた施設が多く、3 施設では EHEC 全株について解析していたが、2 施設は未実施、1 施設では 3 年間精度管理株のみを実施することにどまっていた。MLVA 法を実施していた施設はなかった。

2. IS 法の精度管理

1-2 年目は 11 施設、3 年目は 12 施設で実施した。毎年、陽性バンドとサイズの近いエキストラバンドが増幅される株を 1 株使用したが、2 年目に 2 施設で誤判定が見られたほかは、良好な結果であった。また 1 年目は、試薬のロットによって 1-06 および 2-09 の増幅が弱い傾向がみられた。陰性と判定した 1 施設ではテンプレートの調整から再実施したが、1-06 は陽性と判定されたものの 2-09 は増幅されなかった。

3. 近畿 IS データベース

2009 年 10 月に開始したデータベースは、それ以前に分離された株を含めて 3,115 株が登録されており(2018 年 2 月 16 日現在)、この 3 年間の登録数は概ね減少傾向であった(表 2)。

2015 年からの 3 年間に登録された主な IS 型を表 3 および表 4 に示したが、感染研 IS パターン番号 AA705 および AA195、AA024、AA756 および AA831 はそれぞれ 2015 年、2016 年および 2017 年に特徴的なタイプで、分離月も集中していた。ブロック内で疫学情報や MLVA 型について情報交換した結果、AA024、AA756 および AA831 は同一の感染源が強く示唆された。一方で、AA023 および AA063 は毎年多く登録されており、MLVA 型もそれぞれ数タイプに分かれた。AA023 は 2009 年から毎年 10~41 株分離されていたが(図 2)、感染者 10 名以上の集団事例は含まれておらず、分離月も毎年 4~10 か月にわたっていた。AA063 も、2014 年の保育園集団事例(19 株)以外は散発または家族・グループ事例であった。データベース全体を見ても、数年にわたって多数分離されるタイプと、特定の年だけに集中して分離されるタイプがみられた(図 2)。

データベース登録株について、プライマーごとの陽性率を調べた(表 5)。病原性関連遺伝子 *stx1*、*stx2*、*eae* および *hlyA* の陽性率はそれぞれ 67.1%、98.7%、99.9% および 98.6% であった。IS の分布に由来するバンドは、セット 1 では 1-13 と 1-15、セット 2 では 2-02、2-12 および 2-15 で 90%以上を示した。

4. IS エキストラバンド集

2017年1月8日時点の近畿 IS データベース登録株 2,914 株のうち、591 株でエキストラバンド欄が入力されていた。このうち、誤判定の可能性が考えられる増幅サイズについて IS 型ごとに整理し、登録施設に画像提供を依頼した。最終的に 39 パターンについて、電気泳動画像、電気泳動条件、感染研 IS パターン番号、判定表、注意点を整理して、IS エキストラバンド集に提供した。

5. EHEC O157 の PFGE 精度管理

PFGE の精度管理には毎年 11 施設が参加した。電送された画像はサイズマーカー株の画像は概ね条件を満たしていたものの、バンドの太さやコントラストは様々であった。制限酵素による切断が不十分であると推察されるバンドがある、あるいはサイズの小さいバンドが不明瞭な画像では、菌株ごとの近似度が 80%程度、あるいはクラスターから外れる傾向が見られた。

6. 遺伝子型別法を利用した事例解析

各自治体で発生した集団感染症や食中毒について、分離株の遺伝子型別を実施し、聞き取り調査の結果と合わせて事例間の関連性や感染経路を解析した。成果の一部は病原微生物検出情報 (IASR) に報告した。

(1) EHEC O157 広域事例

2015年9月から10月に、飲食チェーン店である 4 店舗の利用者から複数の下痢症患者が発生し、7名から EHEC O157 が分離された。7名はそれぞれ別のグループで、全員「炙りレバー」を喫食していた。患者発生は 6つの自治体にまたがっており、それぞれの

地衛研で患者分離株を精査したところ、7株の EHEC O157 は 3 タイプの遺伝子型に分かれた。レバーは本社併設のセントラルキッチンで加工して各店舗に卸されており、ロットによって異なる EHEC O157 に汚染していたものと考えられた。(詳細は平成 27 年度報告書を参照のこと。)

(2) EHEC O157 保育施設集団発生事例

2015年1月末に端を発した保育園の EHEC O157 感染症の集団発生事例では、家族を含め 37 名の感染者が確認された。下痢や血便など有症状者は 10 名で重症例はなく、27 名は無症状であった。同一感染源による感染が疑われる事例であったが、給食保存食から EHEC は検出されなかった。また、近畿 IS データベースおよび感染研 MLVA データベースにおいて、発生時までの集積データには同じタイプの菌株はなかった。感染源の特定には至らなかったが、おむつ交換やおもちやを介したヒトーヒト伝播が強く示唆された。(詳細は平成 27 年度報告書を参照のこと。)

(3) 毒素原性大腸菌 O6 食中毒事例

2014年3月に宿泊施設で腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) O6:H16 およびサポウイルス (SV) による食中毒事件が発生した。患者の共通食は当該施設で提供した会席料理であり、喫食した 17 グループ 258 名のうち 13 グループ 123 名が食中毒様症状を呈した。調査の結果、患者 19 名及び調理従事者 2 名の便から ETEC O6 (LT,STh) が、患者 36 名及び調理従事者 1 名の便から SV が検出され、このうち患者 10 名および調理従事者 1 名は両

方陽性であった。検食からも ETEC O6 が検出され、これらを病因物質と断定した。ETEC の PFGE 型別では、患者由来株、従業員由来株及び食品由来株がほぼ同一のパターンを示し、感染源が同一であることを裏付けた。(詳細は平成 27 年度報告書を参照のこと。)

(4) EHEC O26 保育園集団発生事例

2015 年 6 月、保育園で EHEC O26 の大規模な集団感染事例が発生した。感染者は、園児 111 名、職員 10 名、家族 36 名の合計 157 名が確認された。本事例の分離株は同一の PFGE パターンを示し、同時期に分離された散発事例由来の 2 株とは異なっていた。感染者に占める有症者の割合は低く、有症者の症状も軽かったことが、集団感染発見の遅れやに二次感染につながったと考えられた。(詳細は IASR 2016 年 5 月号を参照のこと。)

(5) 焼肉店利用客における EHEC O157 食中毒事例

2016 年 7 月に届出のあった EHEC O157 患者の喫食調査をきっかけに、焼肉店利用客の集団食中毒事例が明らかになった。7 月上旬の焼肉店利用客 918 名のうち、調査可能であった 290 名 (45 グループ) のうち 42 名が発症していた。焼肉店管轄自治体の分離株はほぼ同一の PFGE パターンを示し、患者発生があった他の自治体の分離株とも遺伝子型は一致していた。当該焼肉店には牛舎や豚舎が近接しており、飲用水等は井戸水が使用されていた。井戸の設置及び管理状況の調査から、汚染された井戸水が原因であった可能性が考えられた。(詳細は IASR 2017 年 5 月号を参照のこと。)

D. 考察

IS 法は、EHEC O157 の遺伝子型別のスクリーニング法として有用であり、試薬がキット化されていることから、地衛研や保健所で広く使用されている。しかし、平成 27 年度には、ロットによって特定のバンドの増幅が弱い傾向がみられ、試薬の不具合が疑われる結果となった。1-06 と 2-09 は陽性率が 10%程度と低いため、Template Mix の増幅が弱い場合でも不具合と認識されてこなかった可能性があり、陽性株を精度管理に使用したことで問題が明らかになった。IS 法の実施にあたっては、必ず Template Mix で 18 本のバンドが明瞭に増幅されることを確認し、被検株で *eae* など EHEC O157 では必ず陽性となるバンドが増幅されない場合は、テンプレート調整から再実施すべきである。

IS 法のもう一つの問題点として、菌株によって誤判定につながるエキストラバンドが増幅されることがあげられる。近畿ブロックでは、精度管理を通してエキストラバンドへの注意を喚起してきたが、本研究班でエキストラバンド集がまとめられ、さらに正確な判定が徹底されるものと期待される。

近畿 IS データベースについては、登録数は減少傾向であったものの、新しいあるいはこれまで少なかったタイプが一時期に集中して分離される場合は、関連性が強く示唆された。毎年 10 株以上登録されるようなタイプもあるため判断が難しいが、EHEC 感染症は共通の感染源であっても散発事例として探知されることが多く、同一 IS 型の集積時は積極的な情報交換が望ましい。

PFGE 法は施設によって実施状況に差があ

り、毎年少ないながらもバンド認識の困難な画像がみられた。極端に太いバンドや薄いバンド、未消化バンドが疑われるバンドの解消が課題であり、菌株の濃度やゲルブロックの大きさを揃える、ゲルブロックを丁寧に洗浄する、ゲル作製台を水平にするなど、プロトコールの細部まで忠実に実施することが求められる。また、使用頻度が少ないとバックグラウンドが高くなる(ゲル全体が白っぽくなる)ことが経験的に知られており、電気泳動槽やチューブの隅々まで次亜塩素酸ナトリウムで数日かけて洗浄するなど、電気泳動装置やUV トランスイルミネーター、画像撮影装置の保守管理も必要である。

近畿ブロックの地衛研では、本研究により遺伝子型別法の信頼性を担保し、IS 法は EHEC O157 のスクリーニング法として、PFGE 法は汎用性の高い詳細な解析法として、実際の事例解析に活用してきた。厚生労働省は、EHEC の遺伝子型別は MLVA 法への統一を図ると発表しており、当研究班はその役割を終えたと考えられる。しかし、近畿ブロックでは現在 MLVA 法を実施している地衛研はないことから、各自治体の方針をふまえ、近畿 IS データベースの運用や精度管理の継続を検討したい。

E. 結論

近畿ブロックで、IS 法および PFGE 法を共通の遺伝子型別法として使用するため、精度管理を実施し、IS 法では陽性対照の増幅とエキストラバンドの判定に注意すること、PFGE 法ではプロトコールの忠実な実施が重要であることを徹底できた。また、近畿 IS データベースは、共通の感染源が疑われる事例

の探知や、関連性の判断に活用した。これらの手法は、各地衛研で事例解析に利用され、行政対応に貢献した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Kayali AY, Escalante-Maldonado O, Vuddhakul V, Seto K, Nakaguchi Y, Nishibuchi M: Development of a method for detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Immunol. Immunother.* 2015, 2:1.
- 2) Harada T, Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Multiplex real-time PCR assays for screening of Shiga toxin 1 and 2 genes, including all known subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-specific genes in beef and sprout enrichment cultures. *J. Food Prot.* 2015, 78: 1800-1811.
- 3) Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, Kumeda Y, Suzuki Y: Characterization of third-generation-cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53:3035-3038.
- 4) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T: Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing

- Escherichia coli*. Front. Microbiol. 2016, 7:765.
- 5) 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.
 - 6) 四宮博人, 勢戸和子, 川瀬遵, 有川健太郎, 船渡川圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛顕, 調恒明: 地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情. 日本細菌学雑誌 2015, 70:309-318.
 - 7) 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 河原隆二, 久米田裕子, 田邊純子, 福田弘美, 中村寛海, 松原弘明, 泉谷秀昌: 近畿の飲食チェーン店で発生した食中毒が疑われる腸管出血性大腸菌 O157 事例. 病原微生物検出情報 2016, 37:89-90.
2. 学会発表
 - 1) 勢戸和子, 河原隆二, 原田哲也, 田口真澄: EHEC O157流行株探知のための近畿ISデータベース活用状況 第19回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2015年7月, 東京)
 - 2) 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 伊豫田淳: Non-O157 STEC の検査法—大阪府公衛研の経験を中心に—. 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016 年 11 月, 富山)
 - 3) 田口真澄, 河原隆二, 原田哲也, 勢戸和子: 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向. 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016 年 11 月, 富山)
 - 4) 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)
 - H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 参加施設の遺伝子型別実施状況

	IS法 ^a			PFGE法 ^b		
	H27 ^c	H28	H29	H27	H28	H29
施設1	◎	◎	◎	◎	◎	◎
施設2	◎	◎	◎	○	△	△
施設3	◎	◎	◎	◎	◎	◎
施設4	◎	◎	◎	○	○	○
施設5	◎	◎	◎	△	○	△
施設6	◎	◎	◎			
施設7	*	*		○	△	○
施設8	◎	◎	◎	◎	◎	◎
施設9	◎	◎	◎	○	△	○
施設10	◎	◎	◎	△	△	○
施設11	◎	◎	◎	○	○	○
施設12			△	△	△	△
施設13	◎	◎	◎			

a ◎: 全株実施(精度管理に参加)、△: 精度管理のみ参加、*: 実施していないがデータベース登録に協力

b ◎: 全株実施(精度管理に参加)、○: 一部またはEHEC以外の菌種で実施(精度管理に参加)、△: 精度管理のみ参加

c 年度

表 2 近畿 IS データベース登録数の推移

分離年	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
施設1	25	61	51	16	28	24	32	50	19
施設2	12	47	11	10	6	12	5	6	9
施設3			24	26	33	23	21	23	20
施設4	37	53	26	36	56	22	43	25	8
施設5	7	43	32	13	23	7	12	33	20
施設6	7	23	5	3	8	25	3	11	8
施設7		74	28	30	47	32	33	34	
施設8	5	13	29	9	12	10	50	15	21
施設9	46	33	20	13	26	19	20	19	10
施設10	8	5	5	3	7	4	3	1	4
施設11	103	136	84	54	42	69	94	52	57
施設13				7	7	5	2	5	1
計	250	488	315	220	295	252	318	274	177

表3 近畿 IS データベースに登録された EHEC O157 の主な IS 型(2015-2017 年)

分離年	感染研 IS番号	ISコード		登録 菌株数	登録 施設数	分離時期	備考(カッコ内は事例数)
2015 (n=318)	AA705	68207	68238	35	1	1~3月	保育施設集団事例
	AA078	84591	215275	18	5	5-7月, 9-11月	家族事例(2)を含む
	AA023	216959	84463	18	4	6月, 8-10月, 12月	家族事例(4)を含む
	AA195	216959	117103	13	6	4~6月	家族事例(2)を含む
	AA063	249711	116975	41	8	6~10月	家族事例(6)を含む
2016 (n=274)	AA071	17453	82510	10	5	6-7月, 9-11月	家族事例(3)を含む
	AA031	137743	198734	11	4	6-10月	家族事例(2)を含む
	AA024	216943	116975	33	5	5月, 7月	社員旅行事例(1), 家族事例(3)を含む
	AA039	216959	84459	11	5	6-8月, 11-12月	家族事例(1)を含む
	AA023	216959	84463	14	5	5-10月	家族事例(3)を含む
	AA063	249711	116975	19	6	5-10月	家族事例(1), グループ事例(1)を含む
	AA018	249727	116975	13	6	6-8月, 10月	家族事例(2), グループ事例(1)を含む
2017 (n=177)	AA756	68207	84106	16	5	7-8月	家族事例(2), グループ事例(1)を含む
	AA031	137743	198734	10	2	5月, 9月, 10-11月	家族事例(1), グループ事例(1)を含む
	AA831	183663	98543	10	4	5-6月	家族事例(2)を含む
	AA023	216959	84463	17	8	1月, 5月, 7-9月	家族事例(1)を含む
	AA063	249711	116975	14	7	6-9月	家族事例(1)を含む

表4 EHEC O157 の主な IS 型の判定表

ISパターン 番号 ^a	ISコード ^b	セット1 判定 ^c																セット2 判定																備考				
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	hlyA	備考 ^d	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14		15	16	stx2	stx1
AA071	17453 82510	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	1	1	0	
AA705	68207 68238	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1300, 220	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	790, 140
AA756	68207 84106	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1		0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
AA078	84591 215275	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	800, 220	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	
AA031	137743 198734	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0			
AA831	183663 98543	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1		0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
AA024	216943 116975	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
AA039	216959 84459	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1		
AA023	216959 84463	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
AA195	216959 117103	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
AA063	249711 116975	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
AA018	249727 116975	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		

a 感染研データベース(試用版)のISパターン番号

b 近畿ISデータベースのISコード

c 1: 増幅あり, 0: 増幅なし

d 非特異バンドの増幅サイズ

表5 IS-printing System におけるプライマーごとの陽性率

プライマー	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
陽性数 ^a	2225	2261	824	2481	7	321	2741	2021	2458	1772	11	2288	2856	1331	3104	3112	2414	3072
陽性率(%)	71.4	72.6	26.5	79.6	0.2	10.3	88.0	64.9	78.9	56.9	0.4	73.5	91.7	42.7	99.6	99.9	77.5	98.6
プライマー	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
陽性数	813	3079	1502	2551	25	16	2467	298	320	878	2199	2872	1983	1	3043	2109	3076	2089
陽性率(%)	26.1	98.8	48.2	81.9	0.8	0.5	79.2	9.6	10.3	28.2	70.6	92.2	63.7	0.03	97.7	67.7	98.7	67.1

a 登録数3115株

大阪府内 IS-printing system データベース

検索 すべて表示 Excelで書き出し XLS ワークフロー 初期設定

菌株番号 PV17-036 血清型 O157:H7 日付 2017/07/21 保健所 茨木 住所・地域 茨木市

MLVA PFGE IS/パターン番号 AA725

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1

コード 216959 18923 clade解析 未実施 備考

施設内DB照合
レファレンスDB照合
このレコードを選ぶ

菌株番号 PV17-038 血清型 O157:H7 日付 2017/07/31 保健所 藤井寺 住所・地域

MLVA PFGE IS/パターン番号 AA289

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1

コード 137741 198734 clade解析 未実施 備考

施設内DB照合
レファレンスDB照合
このレコードを選ぶ

全1274データ中2を表示

図 1 近畿 IS データベース Ver. 3

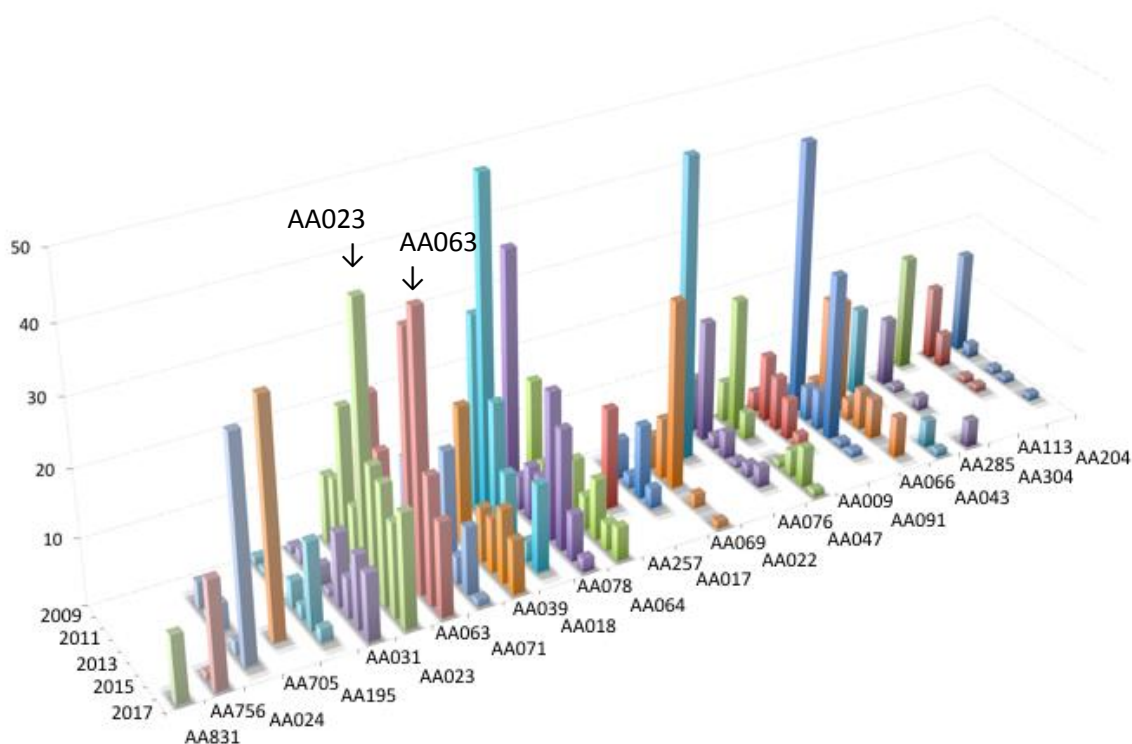


図 2 近畿 IS データベース主な IS 型の推移

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
平成27年度～29年度 総合研究報告書 (分担報告)
食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	河合 央博	〃
研究協力者	竹内 功二	鳥取県衛生環境研究所
	佐倉 千尋	〃
	大友 麗	〃
	川上 優太	島根県保健環境科学研究所
	川瀬 遵	〃
	福間 藍子	〃
	酒井 智健	〃
	秋田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田 加奈子	〃
	平塚 貴大	〃
	千神 彩香	広島市衛生研究所
	青田 達明	〃
	田内 敦子	〃
	栗林 智早	〃
	坂本 綾	〃
	松室 信宏	〃
	石村 勝之	〃
	野村 泰晴	山口県環境保健センター
	尾羽根 紀子	〃
	亀山 光博	〃
	大塚 仁	〃
	石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
	市原 ふみ	〃
	内田 順子	香川県環境保健研究センター
	福田 千恵美	〃
	岩下 陽子	〃
	安藤 友美	〃
	関 和美	〃
	仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
	園部 祥代	〃

阿部 祐樹	〃
金山 知代	高知県衛生研究所
高橋 富世	〃
高木 春佳	〃
戸梶 彰彦	〃
松本 道明	〃
狩屋 英明	岡山県環境保健センター
大畠 律子	〃
檀上 博子	〃
仲 敦史	〃
畑 ますみ	〃

研究要旨

食品由来感染症の分子疫学解析手法について、分子疫学解析結果を用いたデータベース構築や広域事例発生時の活用に向け、平成 27 年度から 29 年度に、中四国ブロックの地方衛生研究所を対象に、腸管出血性大腸菌 O157 株を用いて、IS-Printing System (IS-PS)、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。IS-PS では、多くの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設で誤判定が見られた。これらはバンド位置の確認ミス (本来検出されるバンドとエクストラバンドの異同判定ミス) や低分子量側のバンドが薄くなりバンドの見落とし等が多かった。PFGE 法でも、多くの施設で良好な結果が得られたが、一部でスメアとなり解析不能となったところや、低分子量側のバンドが不明瞭となったところがあった。デンドログラム解析では、検査実施者によるバンド位置指定の差等により、施設間で類似度の順序が異なる傾向が見られた。IS-PS 及び PFGE 法は、鮮明で判別可能な泳動像が得られるように技術を習得・維持し、慎重な解析が必要であると思われた。また、MLVA 法では、毎年、一部の施設でリピート数が異なる遺伝子座が見られ、今後、その要因を解明するとともに、一層の精度向上の必要性を感じた。また、中四国地域の EHEC 感染事例について分子疫学解析結果等疫学情報を収集して解析を行った。複数の県で同一の分子疫学解析結果となる菌株が毎年検出されたが、疫学情報が少なくそれらの事例間の疫学的な関連性は、ほとんどが不明であった。有意義に活用できるデータベースを構築するには、精度の高い分子疫学解析結果だけでなく、有益な疫学情報をいかに取り込むか検討することも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を共有

し、比較・解析することが有用である。そこで、事例由来株の分子疫学解析結果等情報を共有して相互に利用可能にし、広域事例の探知さらには感染源の究明、感染拡大

防止に役立つデータベースを構築し、効率的かつ効果的に当該情報を共有するシステムの開発を目指している。広域事例発生時にデータベースや分子疫学解析結果を活用するには、検査技術や解析精度の維持・向上が不可欠かつ重要である。このため、中四国ブロックの地方衛生研究所を対象に、腸管出血性大腸菌 O157 株を用いた 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)、さらに multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (以下、MLVA 法と言う)の精度管理を実施するとともに、中四国ブロック内での EHEC 発生事例について分子疫学解析結果等疫学情報を収集し、関連性などの解析を行い、データベース構築や広域事例の対応に向けた検討を行った。

B. 研究方法

平成 27 年度から平成 29 年度に、岡山県環境保健センターから年度ごとに EHEC O157 菌株 5 株を参加施設に配布し、IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。また、中四国地域で発生した EHEC 感染事例について、患者等由来株の IS-PS や MLVA 法による解析結果を菌株情報とともに収集し、比較・解析した。

IS-PS は、IS-printing System

(Version2 : TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。本法の各プライマーにより増幅される産物は、プライマーセット (1st set 及び 2nd set primer) 毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット (Api) の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を

区分毎に足してコード化 (以下、IS コードと言う) し、解析を行った。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。MLVA 法は、実施可能な一部の施設で、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。

精度管理は、IS-PS は、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デンドログラムを回収し、解析した。また、MLVA 法は各遺伝子座のリピート数を比較解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) 平成 27 年度の結果

IS-PS の精度管理は、10 施設が参加して実施した。多くの施設の結果は一致したが、3 施設 ((A)、(G)、(H)) では IS コードの一部が他の施設と異なった (表 1)。泳動像は、1st 及び 2nd set primer の低分子量のバンドが薄い施設と、低分子量のバンド領域が濃くはっきりしていた施設に分かれ、泳動像がややスメアになった施設もあった (図 1)。PFGE 法の精度管理は、9 施設が参加して実施した。ほとんどの施設が良好な PFGE 泳動像を示したが、施設 (A) は菌株 No1878 のみスメアとなり、解析不能であった (図 2)。デンドログラム解析の結果は、菌株 No1872 が No1878、1884、1882 に類似度の高い a タイプと、No1873 に類似度の高い b タイプに分かれた (図 3)。MLVA 法の精度管理は 4 施設が参加して実施した (3 施設は 17 遺伝子座を、1 施設は

9 遺伝子座についてリポート数を解析)。菌株 No1873、1878、1884 は各施設の結果が一致していたが、菌株 No1872 は O157-9 が施設 (I) で、菌株 No1882 は O157-17、O157-36、O157-19、O157-37 が施設 (F) で他の施設と結果が異なった (表 2)。

(2) 平成 28 年度の結果

IS-PS の精度管理は、10 施設が参加して実施した。多くの施設の解析結果は一致していたが、3 施設 ((E)、(H)、(J)) ではいずれも 1st set primer の増幅産物について、IS コードの一部が他の施設と異なった (表 3)。

PFGE 法の精度管理は、9 施設が参加して実施し、ほとんどの施設が良好な泳動像を示した (図 4)。デンドログラム解析を実施した 8 施設の結果では、類似度の順序のパターンは 2 グループに分かれた (表 4)。

菌株 No1950 と 1951 は疫学的に関連のある株であり、7 施設の解析結果が類似度 100% で一致したが、1 施設は 98% であった。MLVA 法の精度管理は、4 施設が参加して実施した (3 施設は 17 遺伝子座を、1 施設は 9 遺伝子座についてリポート数を解析)。2 施設 ((D)、(E)) の解析結果は一致していたが、施設 (F) は 2 つの、施設 (I) では 4 つの遺伝子座について解析結果の異なる菌株があった (表 5)。これら以外の遺伝子座の解析結果は、各施設とも一致していた。

(3) 平成 29 年度の結果

IS-PS の精度管理は、10 施設が参加して実施した。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 (表 6)。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。PFGE 法の精度管理は、9 施設が参加して実施した。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 (図 5)。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 B、D があったが、1 バンド違いの差異であった。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、類似度の順序は、各施設さまざまに 6 パターンとなった (表 7)。MLVA 法は 4 施設で実施した (3 施設は 17 遺伝子座を、1 施設は 9 遺伝子座についてリポート数を解析)。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ポート数となった (表 8)。その他の遺伝子座では、リポート数は一致した。

2. 中四国地域の EHEC 感染事例発生状況と解析結果

(1) 平成 27 年度の結果

患者等由来 EHEC O157 株 111 株の疫学情報を収集し解析した。(表 9) その結果、7 種類の IS コードの株が複数の県から分離された。同一 IS コード株のうち、集団事例、家族内事例等の疫学的に関連のある事例においては、同一の MLVA 型あるいは MLVA complex を示した。散发事例においても同一の IS コードでかつ MLVA 型が一致する株があったが、これらについては疫学的な関連は不明であった。

(2) 平成 28 年度の結果

患者等由来 EHEC 288 株の疫学情報を

収集し解析した。EHEC O26 株については、同一の MLVA 型及び MLVA complex の株が、複数県で 1 種類分離された (表 10)。EHEC O157 株については、7 種類の IS コードの株が複数の県から分離された (表 11)。このうち、同一 IS コード株で、疫学的な関連性が確認された事例においては、同一の MLVA 型あるいは MLVA complex を示したが、集発関連株の一部の株では、1st set primer による IS コードの一部や MLVA 型が他の関連株と異なっていた。散発事例においても同一の IS コードでかつ MLVA 型が一致する株があったが、これらについては疫学的な関連は不明であった。

(3) 平成 29 年度の結果

患者等由来 EHEC 184 株の分子疫学解析結果等疫学情報を収集し解析した。その結果、複数の県で同一の MLVA 型あるいは MLVA complex となる株が検出され、O26 株では 1 種類、O157 株では 4 種類検出されたが、事例間での疫学的な関連については不明であった (表 12)。また、O157 株の IS-PS では、複数の県で同一の IS コードとなった菌株が、6 種類検出された (表 13)。同一 IS コードとなったグループのうち 1 つのグループ (グループ③) は、すべて同一の MLVA complex となったが、その他のグループでは、異なる MLVA 型あるいは MLVA complex が含まれた。同一 IS コードとなった事例間でも、疫学的な関連については不明であった。

D 考 察

平成 27 年度～29 年度に、IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による EHEC O157 株を用いた精度管理を実施した。その結果、多くの施設で解析結果は良好であったが、一

部の施設では他施設と異なった結果となり、解析技術の習熟や精度の維持・向上の必要があると思われた。IS-PS では、低分子量側のバンドが薄くなりバンドを見落とす、増幅産物のバンド位置の確認ミス (本来検出されるバンドとエクストラバンドの異同判定ミス) が多く、コード化のミスによる誤判定も見られた。これらを改善するためには、適切な濃度のテンプレートを調整し、本来明確に出現するバンドが薄くなることを防ぐ、泳動距離の長いゲルを使用し、バンドの間隔を延ばすことでバンド位置を正確に確認する等工夫が必要と考えられた。また、IS-PS は、増幅の弱いバンドの判定が検査実施者によって異なる場合があるため、IS コードの情報だけで比較するのではなく、泳動像と併せたバンドの有無の確認が必要と思われた。PFGE 法では、どの施設もおおむね良好な泳動像を示したが、一部でスメアとなり解析不能となったところや、低分子量側のバンドが不明瞭となったところがあった。また、デンドログラム解析では、検査実施者によりバンド位置の指定の差等により、施設間で類似度の順序が異なる傾向が見られた。PFGE 法はバンド位置の指定が異なることで解析結果に影響する。このため、サンプル菌液の濃度調整、制限酵素による消化反応、さらには染色等を確実に行って、鮮明で判別可能な泳動像が得られる技術を習得・維持し、加えて慎重な解析が必要であると思われた。MLVA 法は、中四国ブロックでは現在 4 施設が実施しており、この 4 施設が精度管理に参加した。その結果、いずれの年度でも一部の施設でリピート数が異なる遺伝子座が見られたが、その要因は不明であった。MLVA 法は、各遺伝子座のリピ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、この要因を解明し、精度を向上させる必要があると思われる。MLVA法は、分離能が高くかつ短時間で結果が出る等の利点があり、また、平成29年度から、国立感染症研究所においてはO157、O26、O111に加えて、O91、O103、O121、O145、O165の血清群についても解析を実施しており、多くの血清群について解析が可能となった。今後ますますMLVA法の利用度が高くなることが予想され、MLVA法の導入を検討する施設も増加することが考えられるため、このような施設に対する精度向上のための技術的支援が重要である。いずれの分子疫学解析法においても、精度管理を実施することで、いくつかの問題点・改善点が明らかとなった。今後も解析技術等の維持や解析精度の向上、さらには最適な解析条件の提示等に向け、精度管理を実施する必要があると考える。

中四国地域のEHEC感染事例について分子疫学解析結果等疫学情報を収集して解析を行った。その結果、複数の県で同一の分子疫学解析結果となる菌株が毎年検出されたが、同一の分子疫学解析結果となった事例間の疫学的な関連性は、ほとんどが不明であった。疫学的な事例解析には、分子疫学解析結果に加えて、詳細な疫学情報の収集とそれに基づく解析が必要である。そのため、広域事例発生の迅速な探知、感染源の究明や感染拡大防止対策の事例対応に活用できるデータベースの構築が重要である。今後は、精度の高い分子疫学解析による結果と有益な疫学情報をいかに取り込むかを検討する必要があると思われた。

E 結論

1. 平成27年度～平成29年度に、IS-PS、

PFGE法及びMLVA法の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、一部の施設では結果が異なり、解析技術の習熟や精度の維持・向上の必要があると思われた。

2. 精度管理の実施により、精度向上に関する問題点・改善点がいくつか明らかとなった。今後も引き続き精度管理を実施し、問題点・改善点の洗い出しが必要と考えられた。

3. 広域事例発生の迅速な探知、感染源の究明や感染拡大防止対策の構築等、事例への対応に活用できるデータベースを構築するには、精度の高い分子疫学解析による結果だけでなく、有益な疫学情報をいかに取り込むか検討することも今後の課題と思われた。

F. 研究発表

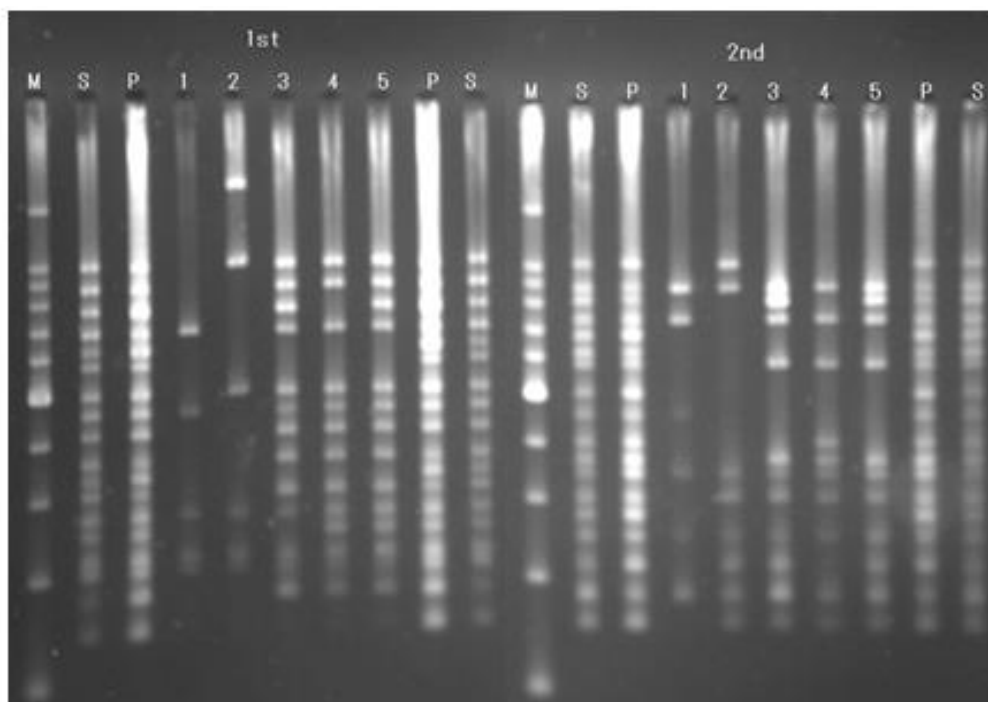
なし。

表1 EHEC O157株のIS-PSによる精度管理結果（平成27年度）

施設	1872		1873		1878		1882		1884	
(A)	012055	210442	101055	300457	717553	611617	317573	211756	717572	611617
(B)	012055	214442	101055	300457	717557	611657	317577	211756	717577	611657
(C)	012055	214442	101055	300457	717557	611657	317577	211756	717577	611657
(D)	012055	214442	101055	300457	717557	611657	317577	211756	717577	611657
(E)	012055	214442	101055	300457	717557	611657	317577	211756	717577	611657
(F)	012055	214442	101055	300457	717557	611657	317577	211756	717577	611657
(G)	012055	210442	101055	300457	717577	611657	317577	211756	717577	611657
(H)	012051	214442	101051	300457	777553	611657	317573	211756	717573	611657
(I)	012055	214442	101055	300457	717557	611657	317577	211756	717577	611657
(J)	012055	214442	101055	300457	717557	611657	317577	211756	717577	611657

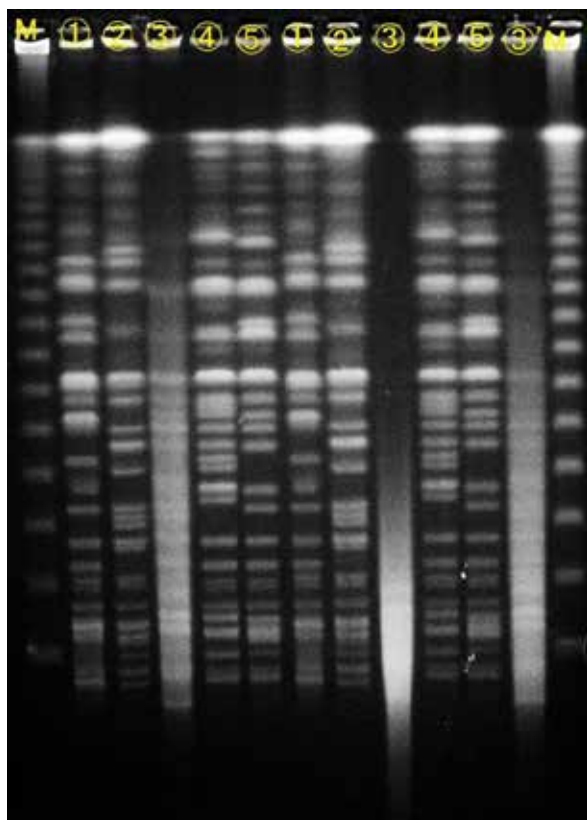
図1 IS-PSの泳動像の一例（平成27年度）

施設 (H)



M	Marker
S	Standard DNA
P	Template Mix
No.1	1872
No.2	1873
No.3	1878
No.4	1882
No.5	1884

図2 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果の一例（平成27年度）
施設（A）



①	STEC 1872	O157:H7
②	STEC 1873	O157:H-
③	STEC 1878	O157:H7
④	STEC 1882	O157:H7
⑤	STEC 1884	O157:H7
M	マーカー	

図3 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果 デンドログラム解析（平成27年度）

(aタイプ) 6施設



(bタイプ) 2施設



表2 EHEC O157株のMLVA法による精度管理結果(平成27年度)

施設	菌株No	各領域のレポート数																
		EHC-1	EHC-2	O157-9	EHC-5	O157-3	O157-25	EHI11-8	EHI57-12	EHI11-14	EHI11-11	O157-17	O157-36	O157-19	EHC-6	O157-37	EHC-7	O157-10
1872	D	9	12	6	-2	-2	4	1	4	-2	2	5	6	7	-2	5	-2	-2
	E	7*		-2	4	4					5	6	7		5		5	-2
	F	9	12	6	-2	4	4	1	4	-2	2	5	6	7	-2	5	-2	
	I	9	12	6	-2	4	4	1	4	-2	2	5	6	7	-2	5	-2	
1873	D	9	9	5	11	6	5	1	3	-2	2	5	4	10	-2	2	-2	
	E	7*		11	6	5					5	4	10		2		14	
	F	9	9	5	11	-2	5	1	3	-2	2	5	4	10	-2	2	-2	
	I	9	9	5	11	-2	5	1	3	-2	2	5	4	10	-2	2	-2	
1878	D	12	7	4	10	-2	15	1	4	-2	2	6	5	6	11	7	-2	
	E	10*		10	15	5					6	5	6		7		29	
	F	12	7	4	10	-2	15	1	4	-2	2	6	5	6	11	7	-2	
	I	12	7	4	10	-2	15	1	4	-2	2	6	5	6	11	7	-2	
1882	D	12	7	4	7	10	10	1	4	-2	2	6	6	6	-2	7	-2	
	E	10*		7	10	5					6	6	6		7		32	
	F	12	7	4	7	10	10	1	4	-2	2	-2	3	-2	5	-2		
	I	12	7	4	7	10	10	1	4	-2	2	6	6	6	-2	7	-2	
1884	D	12	5	4	13	-2	10	6	4	-2	2	8	3	6	10	5	-2	
	E	10*		13	10	6					8	3	6		5		24	
	F	12	5	4	13	-2	10	6	4	-2	2	8	3	6	10	5	-2	
	I	12	5	4	13	-2	10	6	4	-2	2	8	3	6	10	5	-2	

*:ODCプライマー使用のため、2つずつ異なっている。

表3 EHEC O157株のIS-PSによる精度管理結果（平成28年度）

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

図4 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果の一例（平成28年度）
施設 (C)

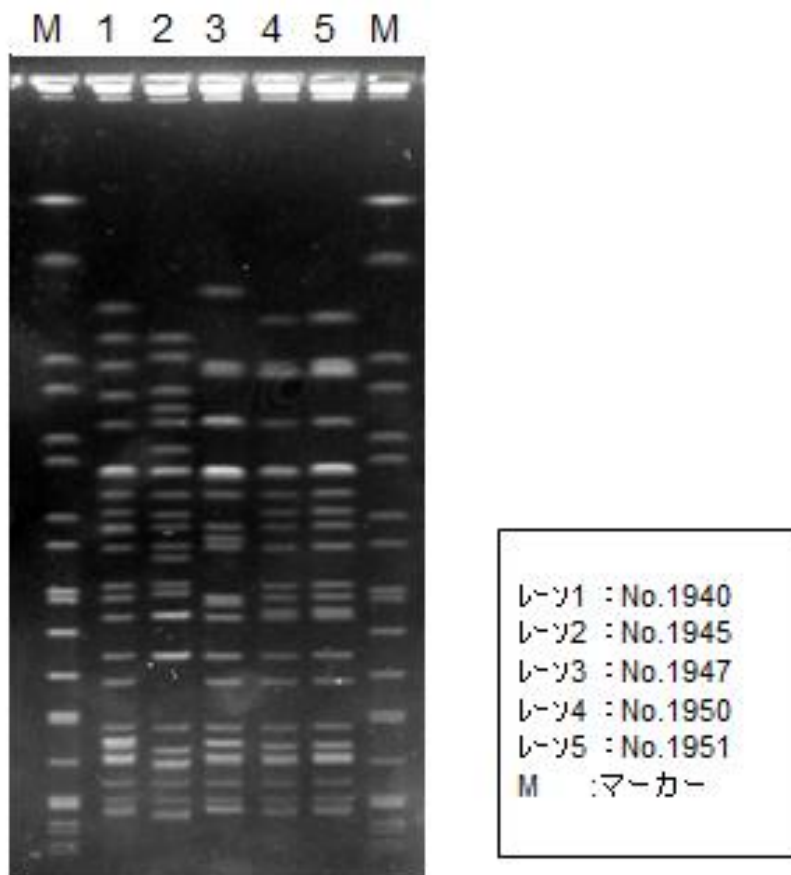


表4 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果 デンドログラム解析(平成28年度)

デンドログラム解析結果		施設数
65~100 (No.1945→1947→1940→1950, 1951)		6
67~100 (No.1947→1940 or 1945→1945 or 1940→1950, 1951)		2
解析せず		1
実施せず		1

表5 EHEC O157株のMLVA法による精度管理結果(平成28年度)

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

*CDCプライマー使用のため、2つずつ異なっている。

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

表6 EHEC O157株のIS-PSによる精度管理結果（平成29年度）

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

図5 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果の一例（平成29年度）
施設（C）

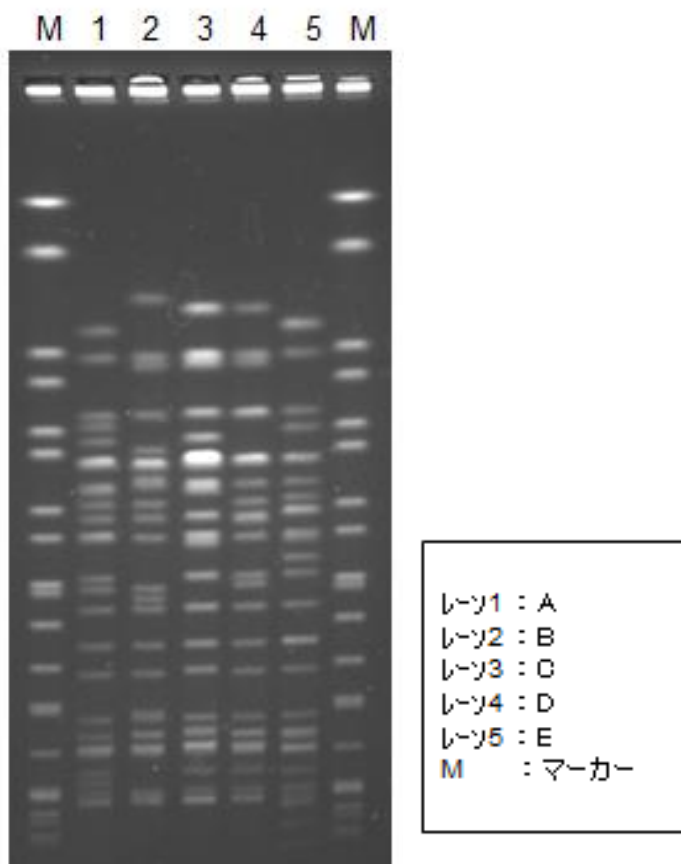


表7 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果 デンドログラム解析(平成29年度)

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 8 EHEC O157 株の MLVA 法による精度管理結果(平成 29 年度)

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
		2	-2	1	4	-2	4	4	-2	-2	10	11	17	4	8	6	9	6	6
菌株A	(D)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10	11	17	4	8	6	9	6	/
	(E)	/	/	/	/	/	/	/	/	10	9*	17	4	8	6	9	9	6	23
	(F)	2	-2	1	4	-2	4	4	-2	10	11	17	4	8	6	9	9	6	/
菌株B	(D)	2	-2	1	4	-2	4	4	-2	10	11	17	4	8	6	9	9	6	/
	(E)	/	/	/	/	/	/	/	/	12	11	12	3	6	6	13	6	7	/
	(F)	2	-2	1	4	-2	4	4	-2	14	11	12	3	6	6	13	6	7	5
菌株C	(D)	2	-2	1	4	-2	4	4	-2	14	11	12	3	6	6	13	6	7	/
	(E)	/	/	/	/	/	5	4	13	-2	10	13	11	4	8	4	10	7	26
	(F)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	10*	11	4	8	4	10	7	/
菌株D	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	12	2	4	8	4	10	7	/
	(E)	/	/	/	/	/	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	26
	(F)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	9*	13	7	7	7	5	3	7	/
菌株E	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	/
	(E)	/	/	/	/	/	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	31
	(F)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	/
菌株E	(D)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	2	4	3	5	5	8	/
	(E)	/	/	/	/	/	7	6	7	-2	-2	7*	9	4	3	5	5	8	/
	(F)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	/

*:CDCプライマー使用のため、2ずつ異なっている。

表9 中四国地域で同一 IS コードの EHEC O157 株が複数の県から分離された事例（平成 27 年度）

血清型	毒素型	IS-printing systemコード		MLVA型	MLVA complex	菌株番号	発生日	備考	
		1st primer set	2nd primer set						
O157:H7	1.2	317577	211757	15m0167		1900			
				13m0114		EH150012			
		317577	211756	13m0625	15c020	1882, 1912, 1914			1912,1914は家族
						EH150011			
		307557	211457	15m0034	15c011	EH15-02			
						2, 3			15Y05-15Y11の接触者
		717557	611657	15m0099	15c011	15Y05-15Y11			家族と親戚(集発)
						15m0142		1926	
		717577	611657	14m0512	15c011	1878			
						15m0140		4-6	
	717577	611657	15m0138	15c032	1886, 1889-1899			施設関連	
					15m0139		1884		
	717577	611657	14m0387	15c032	1885, 1887, 1888		7-8月	家族	
					SE15001-15004		4月	家族	
	2	012057	214442	15m0201	15c041	SE15014他			施設(集発)、家族、散発
						14			
						15Y24			
						SE15055			
		114057	303443	15m0203	15c041	SE15018		8-9月	SE15014等関連施設(集発)
						15m0204			
15m0270									
15m0242									
114057	303443	15m0098	15c041	1918					
				EH15-2					

表10 複数県で発生した EHEC O26 の同一 MLVA 型、MLVAcomplex 株による事例（平成 28 年度）

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

表 1 1 複数県で発生した EHEC O157 の同一 IS コード株による事例 (平成 28 年度)

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

: IS コード、MLVA 型、MLVA complex が一致

表12 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
(平成 29 年度)

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(家族及びいとこ)
		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	17108	8	157	7	1, 2	17m0143	17c027	
	h	他24	9	157	7	1, 2	17m0143	17c027	

表 1 3 複数県で発生した EHEC O157 の同一 IS コード株による事例 (平成 29 年度)

グループ	県名	菌株No	発生月	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		

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 27～29 年度報告書

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、精度管理 (ISPS、PFGE) 及び
ISPS エクストラバンド情報の集約 (平成 27～29 年度まとめ) —

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
	岩佐奈津美	福岡市保健環境研究所
	中村悦子	北九州市保健環境研究所
	有川衣美	北九州市保健環境研究所
	塘由香	佐賀県衛生薬業センター
	緒方美奈子	佐賀県衛生薬業センター
	川野みどり	長崎県環境保健研究センター
	小嶋裕子	長崎県環境保健研究センター
	高木由美香	長崎県環境保健研究センター
	江原裕子	長崎市保健環境試験所
	成松浩志	大分県衛生環境研究センター
	福島宏暢	熊本県保健環境科学研究所
	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
	杉谷和加奈	熊本市環境総合センター
	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
	村上光一	福岡県保健環境研究所
	西田雅博	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	福岡県保健環境研究所
	岡元冬樹	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、4. 精度管理及び 5. ISPS で発生したエクストラバンド情報の集約の 5 項目について取り組んだ。

九州地区における腸管出血性大腸菌 0157 (以下「0157EHEC」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 27～29 年度に収集された EHEC は 1338 株であった。その内訳は、0157EHEC が 606 株、非 0157 EHEC が 700 株及び血清型別不能が 32 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率が 54.7% 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 27～29 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例は 33 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 15 事例で、非 0157EHEC によるものは 18 事例であった。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。精度管理は ISPS 及びパルスフィールド・ゲル電気泳動 (以下「PFGE」という。) について実施した。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では泳動は概ね良好に行われていたが、一部、制限酵素処理が不十分な事例が認められた。また、平成 29 年度の精度管理において、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は、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。腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法として汎用さ

れている PFGE 法は一般的な手法であり、全国の地方衛生研究所 (以下「地衛研」という。) で実施されている。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、

ISPS 及び PFGE の精度管理を実施した。ISPS のエクストラバンドについて、九州内の各地衛研からの情報を集約した。また、EHEC 検出状況及び EHEC による集団発生事例についても集約した。

B. 研究方法

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の集約については、メールを利用したエクセルデータ等のやりとりにより実施した。

精度管理については、平成 27 年度及び平成 28 年度は 0157 4 株 (表 1.1~1.2)、平成 29 年度は ISPS 用に 0157EHEC を 3 株 (ISPS 用 5 から 7)、PFGE 用に 026EHEC を 4 株 (PFGE 用 1 から 4) 計 7 株を参加地衛研に配布した (表 1.3)。試験方法については、ISPS 及び PFGE 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

ここでは平成 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 27 年 4 月から平成 30 年 2 月 14 日までに 1338 株の EHEC 菌株が収集された (表 4.1~4.3)。平成 27

年度は 0157EHEC が 223 株 (47.4%)、非 0157EHEC が 247 株 (52.6%)、0 群血清型別不能 EHEC が 12 株であった。平成 28 年度は 0157EHEC が 227 株 (48.2%)、非 0157EHEC が 244 株 (51.8%) 及び 0 群血清型別不能 EHEC が 8 株であった。平成 29 年度は 0157EHEC が 156 株 (39.3%)、非 0157EHEC 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、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思われた。

3. EHEC による集団発生事例数

平成 27 年度から平成 29 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例はそれぞれ 9、11、13 事例であった (表 5.1~5.3)。平成 27 年度は 0157EHEC によるものが 6 事例で、非 0157EHEC によるものは 3 事例、平成 28 年度は 0157EHEC によるものが 5 事例で、非 0157EHEC によるものは 6 事例、平成 29 年度は 0157EHEC によるものが 4 事例で、非 0157EHEC によるものは 9 事例であった。集団発生事例は、保育所など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。

4. 精度管理 (ISPS 及び PFGE)

PFGE 法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に必要な標準的な手段である。その一方で、迅速性に優れず、画像による情報共有は①解析に手間がかかる、②解析を実施す

る担当者によって解析結果が異なるなどの難点がある。腸管出血性大腸菌 0157 の遺伝子型別には IS629 によるゲノム構造多型を利用した、遺伝子型別手法である ISPS が広く用いられている。この手法は、①迅速であること、②数値化が容易であることが最大の利点であり、九州ブロックでは、この利点を生かし、平成 22 年より共有データベースを用いたリアルタイムな情報共有を実施している。ISPS 遺伝子型別結果の共有においては、各施設において正確に数値化されていることが、データの信頼性を確保する上で非常に重要となる。そこで九州ブロックでは、検査技術の向上・維持と正確な数値化を行うためのトレーニングを目的とし、12 地衛研を対象に精度管理を実施している。ISPS では、標的領域に起きた挿入、または、欠失が原因で現れる「明瞭なエクストラバンド」が観察されることが知られている。これらのエクストラバンドを正しく判定できることが重要である。

ISPS の精度管理として、平成 27 年度はエクストラバンドを含む 4 株を配布し実施した。エクストラバンドのない A~C については全施設で正しく判定された。しかし、2 つのエクストラバンドを含む D については、4 地衛研で誤判定がみられた (図 2.1~2.4)。ゲル下部のエクストラバンド (1-14~1-15 間) については、1-15 のバンドと重なるため、注意深く判定を行う必要がある。平成 28 年度も平成 27 年度と同様に 4 株を配布し精度管理を実施した。エクストラバンドのない A については全施設で正しく判定された。しかし、エクストラバンドを含む B、C 及び D については、3 地衛研で誤判定がみられた (図 2.5)。平成 29 年度は 3 株を配布し精度管理を実施した。一部の地衛研において、検体

の取り違え及び誤判定が認められた（表 6.1～図 6.3）が、概ね良好であった。

平成 27 年度の PFGE の精度管理は、10 地衛研が参加して実施した。泳動は概ね良好に行われていたが（図 3.1～図 3.5）、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数が全て一致した地衛研はなかった（表 7）。平成 28 年度は 11 地衛研が参加した。平成 27 年度と同様に泳動は概ね良好に行われていたが（図 4.1～図 4.4）、11 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研はなかった。ほとんどの地衛研が正解目安と 0～3 本相違であった（表 8）。平成 29 年度は 11 地衛研が参加した。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 5）。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、概ね電気泳動像は鮮明で手技自体は良好に行われていると考えられた（図 6.1～6.11）。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 9）。平成 29 年度の精度管理において、ISPS 及び PFGE 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 7.1～図 7.3）。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 10）。

5. ISPS エクストラバンド情報の集約

ISPS のエクストラバンド情報は、九州地区 6 地衛研から得られた。代表的な ISPS のエクストラバンドの写真を図 8.1 から 8.4 に示す。ISPS のエクストラバンドは、

6 か所報告された（表 11）。報告された 6 か所のうち、1-02 と 1-03 の間、1-14 と 1-15 の間及び 1-12 と 1-13 の間の 3 か所のエクストラバンドは、誤判定する可能性があるため注意が必要である。

D. 結論

九州地区における 0157EHEC の IS 型別の登録数は毎年 200 件前後の登録で推移していたが、平成 29 年度は 128 件と少なかった。この原因は 0157 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 0157EHEC 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 0157EHEC 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 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 164 株（9.5%）が 12 地衛研から登録された。

九州地区で平成 27～29 年度に収集された EHEC は 1338 株であった。その内訳は、0157EHEC が 606 株、非 0157 EHEC が 700 株及び血清型別不能が 32 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率が 54.7%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る。平成 27～29 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例は 33 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 15 事例で、非 0157EHEC によるものは 18 事例であった。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。

精度管理は ISPS 及び PFGE について実施

した。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、一部、制限酵素処理が不十分な事例が認められた。また、平成 29 年度の精度管理において、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。精度管理に使用する菌株は、より慎重に選定する必要があると考えられた。

E. 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1.1 精度管理に用いた腸管出血性大腸菌

試料名	菌株名	分離年	由来	血清型	志賀毒素遺伝子	IS型別
A	7E006	2007	保菌者	0157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	66324257743
B	7E032	2007	患者	0157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	66458474955
C	8E048	2008	患者	0157:H7	<i>stx</i> ₂	22081687690
D	13E079	2013	患者	0157:HNM	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	57733470538

表1.2 精度管理に用いた腸管出血性大腸菌

試料名	菌株名	分離年	由来	血清型	志賀毒素遺伝子	IS型別
菌株A	16E004	2016	保菌者	0157:H-	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	64427577418
菌株B	16E014	2016	患者	0157:H-	<i>stx</i> ₁	57733536074
菌株C	16E015	2016	保菌者	0157:H-	<i>stx</i> ₁	57733536074
菌株D	16E016	2016	保菌者	0157:H-	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	57733536074

表1.3 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	026:H11	<i>stx</i> ₁	16m2154
PFGE用2	16EC038	2016	保菌者	026:H11	<i>stx</i> ₁	16m2154
PFGE用3	16EC034	2016	患者	026:H11	<i>stx</i> ₁	16m2159
PFGE用4	16EC084	2016	保菌者	026:H11	<i>stx</i> ₁	13m2015
ISPS用5	16EC026	2016	患者	0157:H7	<i>stx</i> ₂	16m0446
ISPS用6	16EC087	2016	患者	0157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	16m0447
ISPS用7	16EC093	2016	保菌者	0157: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

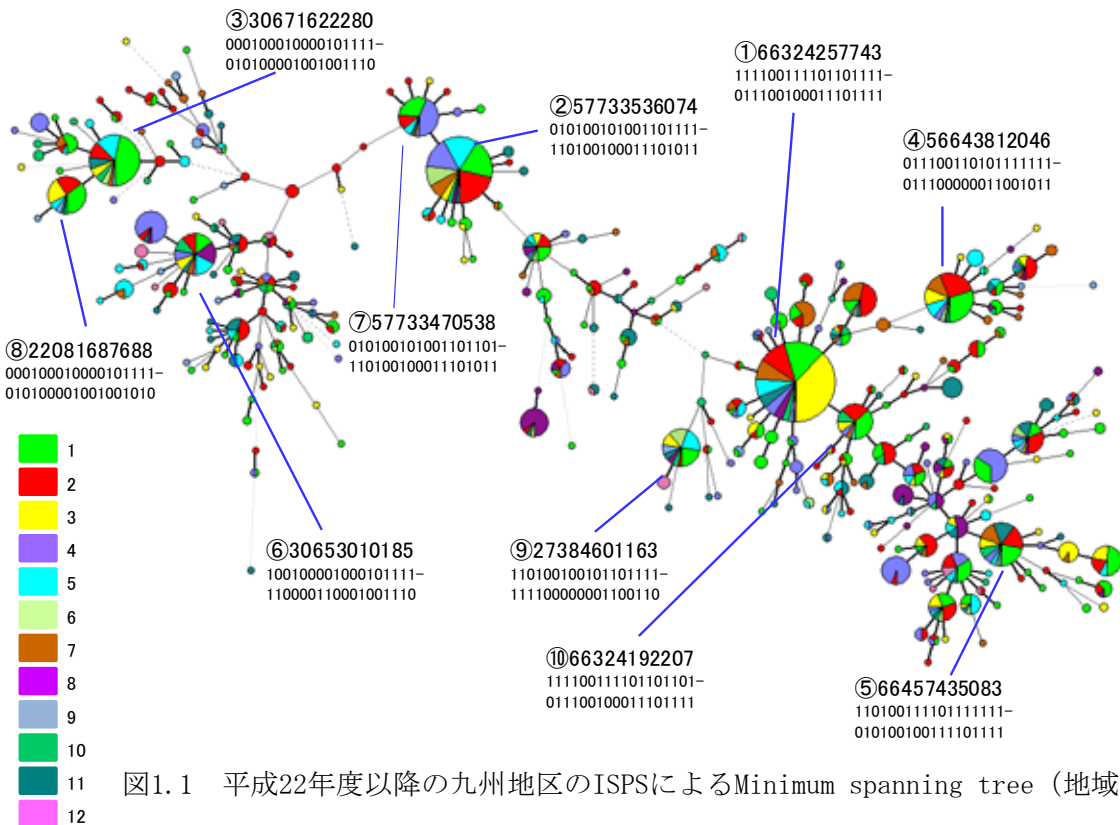


図1.1 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree（地域別）

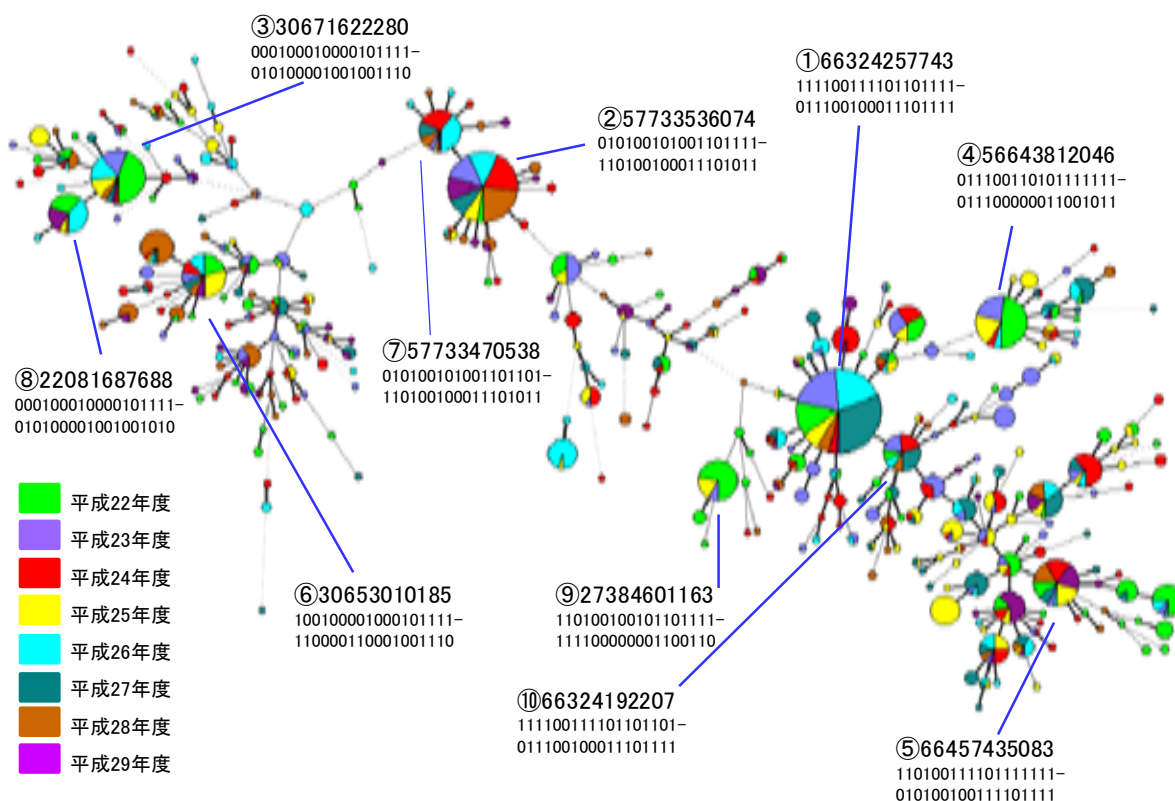


図1.2 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4.1 平成27年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

地衛研	O血清型別の分離菌株数															計					
	0157	026	0111	0103	0121	091	0145	0183	0115	0136	055	0128abc	0152	04	06		05	0119	0169	0142	OUT
1	46	4		1		4	4		1											4	64
2	39	7		1	1		1			1					1					3	54
3	46	5	2	2			1											1			57
4	25	11	2													2		1		1	42
5	10	6	10	10	1					1										1	39
6	7	4																			11
7	14	1	3			2														1	21
8	8	20		1																	29
9	6																				6
10	8	5	2	71	0	3	0	0	3												92
11	14	10	6			2			1					1					1	2	37
12	0	3	0	0	12	0	4						1								20
合計	223	76	25	86	14	11	10	0	5	1	1	0	1	1	1	2	1			12	470

表4.2 平成28年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

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

表4.3 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	1	12	397

表5.1 平成27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	事例No.	血清型	毒素型	発生場所
1	1	0157	stx_1+stx_2	家庭内
	2	0157	stx_1+stx_2	飲食店
2	1	0157:H(-)	stx_1+stx_2	老人ホーム
7	1	0157	stx_1+stx_2	飲食店
8	1	026:H11	stx_1	保育園
	2	0157:H7	stx_1+stx_2	家庭内
	3	0157:H7	stx_2	家庭内
10	1	0103:H2	stx_1	保育園
12	1	0121:H19	stx_2	保育園

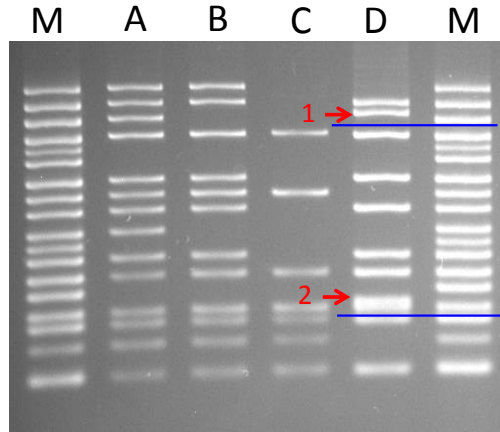
表5.2 平成28年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例

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

表5.3 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	1	026:H11	stx_1	保育所
2	1	0103:H2	stx_1	保育所
	2	026:H11	stx_1	保育所
	3	0157:H7	stx_2	不明
4	1	026:H11	stx_1	保育園
	2	0157:H7	stx_2	児童福祉施設
7	1	0111:H-	stx_1	保育園及び家庭
8	1	026:H11	stx_1	家庭内
	2	026:H11	stx_1	介護老人施設
	3	0157:H-	stx_1+stx_2	有料老人ホーム
	4	0103:H2	stx_1	家庭内
	5	0157:H7	stx_2	保育園
12	1	026:HUT	stx_1	家庭内

- 菌株A
 - 正解 12/12地衛研
- 菌株B
 - 正解 12/12地衛研
- 菌株C
 - 正解 12/12地衛研
- 菌株D



(2本のエクストラバンド有り)

- 正解 8/12地衛研
- 2番のバンドで誤答 4地衛研

図2.1 平成27年度ISPS精度管理の結果

エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に分離できた例 (正答)

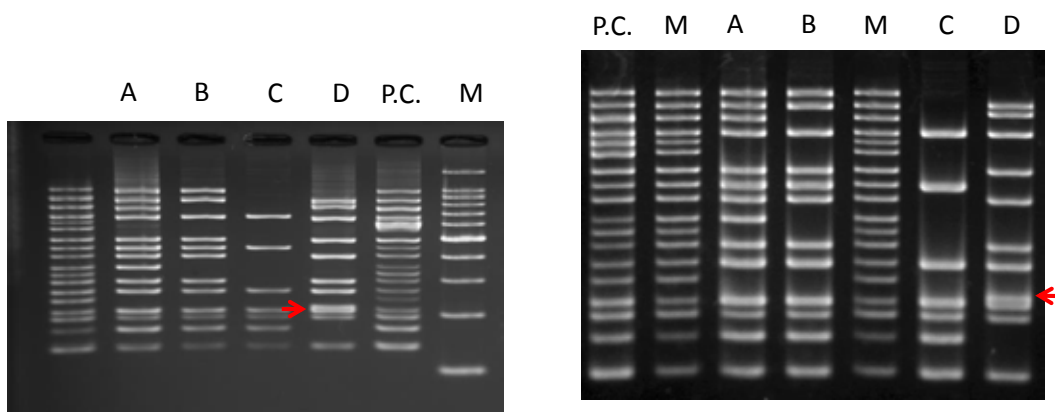


図2.2 平成27年度ISPS精度管理の結果

エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に分離できなかった例（誤答）

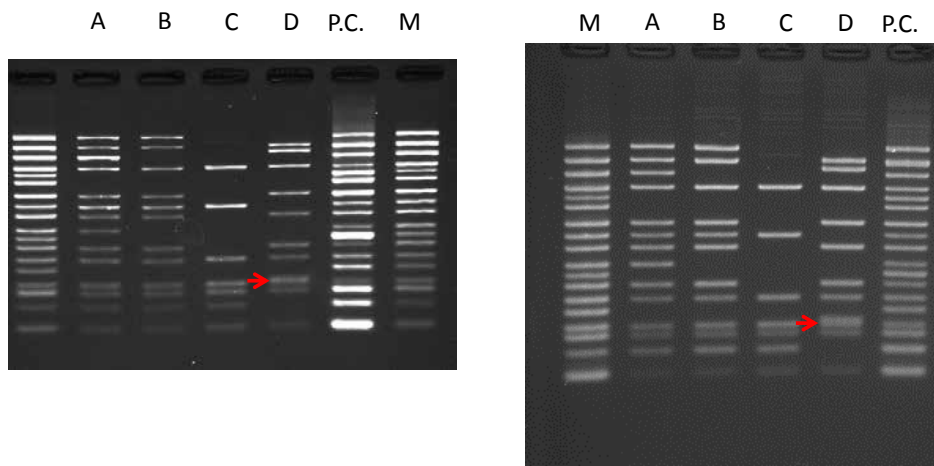


図2.3 平成27年度ISPS精度管理の結果

エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に分離できなかった例（誤答）

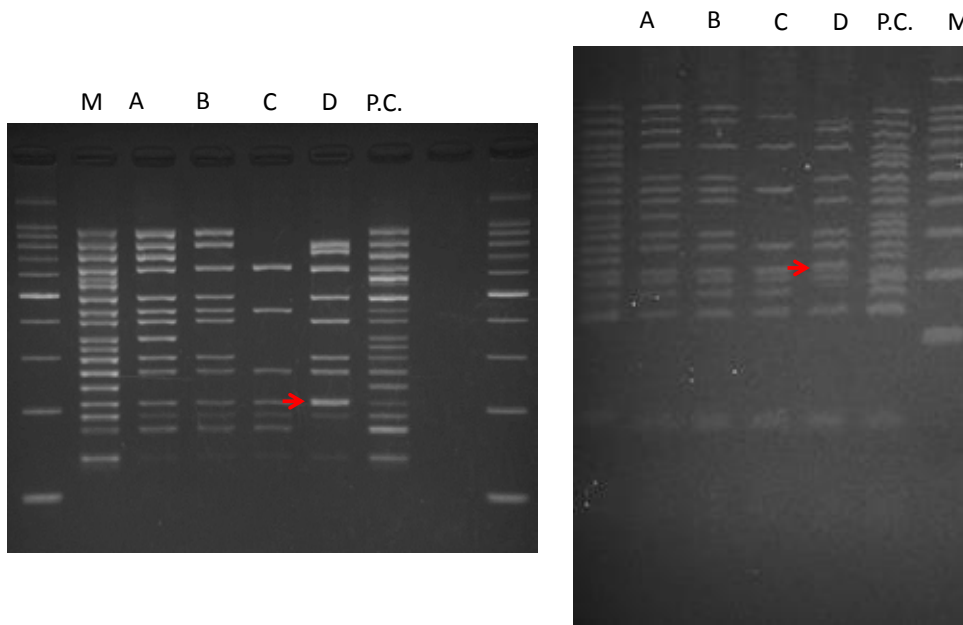


図2.4 平成27年度ISPS精度管理の結果

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

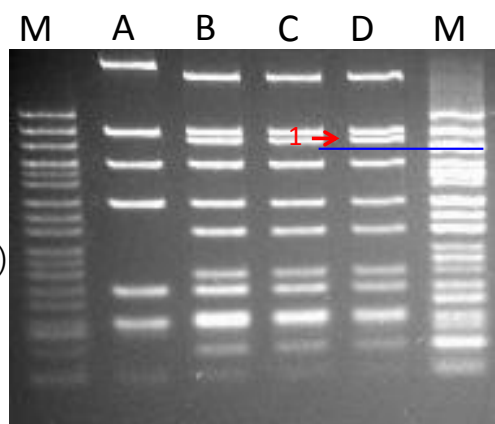


図2.5 平成28年度ISPSの結果

表6.1 菌株ISPS用5に対する各地衛研のISPS結果（平成29年度）

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	1	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6.2 菌株ISPS用6に対する各地衛研のISPS結果（平成29年度）

地衛研	set-1												set-2																							
1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	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	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
3	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	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	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	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	0	1	0	0	1	0	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	0	1	0	0	1	0	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	0	1	0	0	1	0	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	0	1	0	0	1	0	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	0	1	0	0	1	0	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	0	1	0	0	1	0	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	0	1	0	0	1	0	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	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	

表6.3 菌株ISPS用7に対する各地衛研のISPS結果（平成29年度）

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	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	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	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	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	0	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	0	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	0	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	0	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	0	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	0	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	0	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	0	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	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0

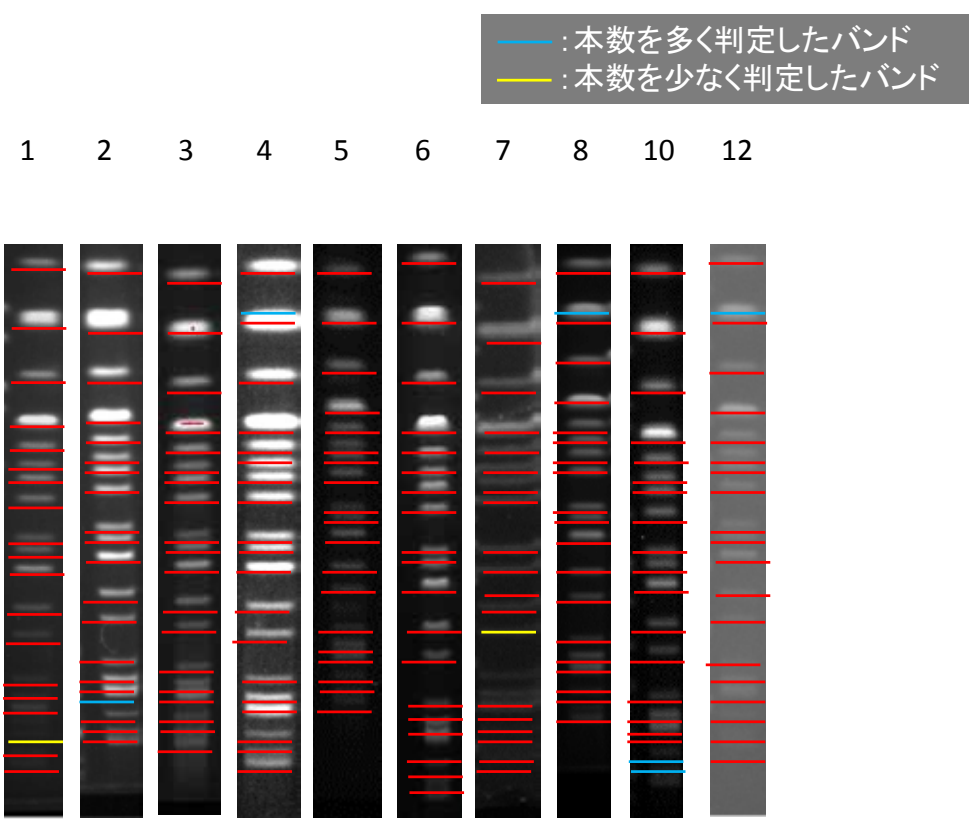


図3.1 平成27年度PFGE精度管理の結果（菌株A）

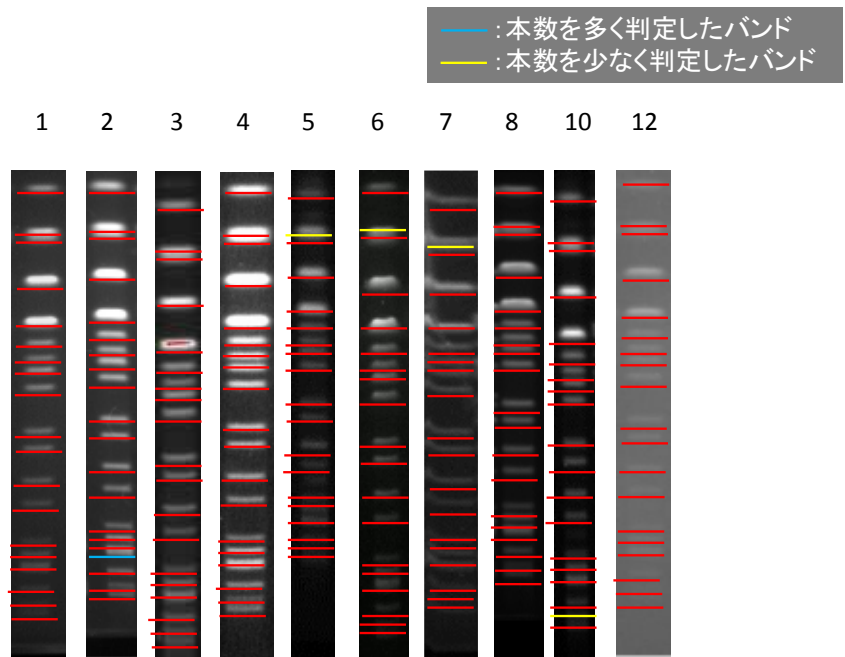


図3.2 平成27年度PFGE精度管理の結果（菌株B）

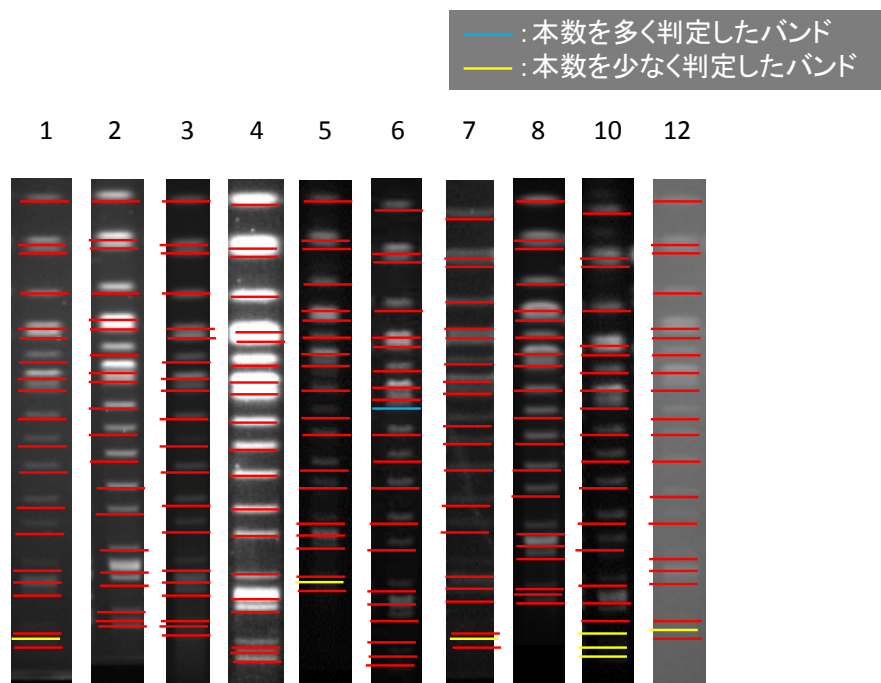


図3.3 平成27年度PFGE精度管理の結果（菌株C）

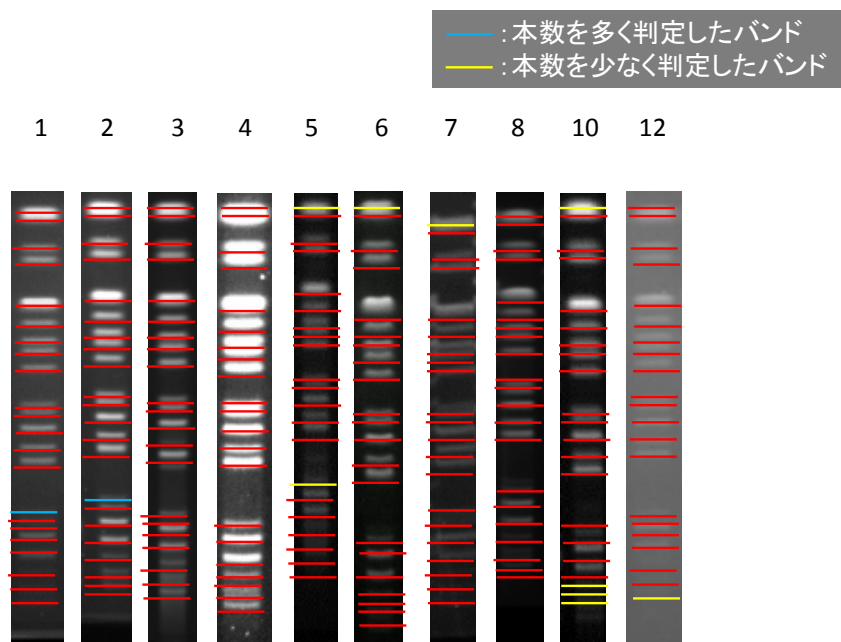


図3.4 平成27年度PFGE精度管理の結果（菌株D）

表7 平成27年度PFGE精度管理の結果（バンド数）（ ）は正解目安

地衛研	菌株				正解数 (0～3本相違)
	A (19)	B (19)	C (20)	D (21)	
1	18	19	19	22	4/4
2	20	20	20	22	4/4
3	19	20	20	21	4/4
4	20	19	20	21	4/4
5	19	18	19	19	4/4
6	19	18	21	20	4/4
7	18	18	19	20	4/4
8	20	19	20	21	4/4
10	17	18	17	17	3/4
12	20	19	19	20	4/4

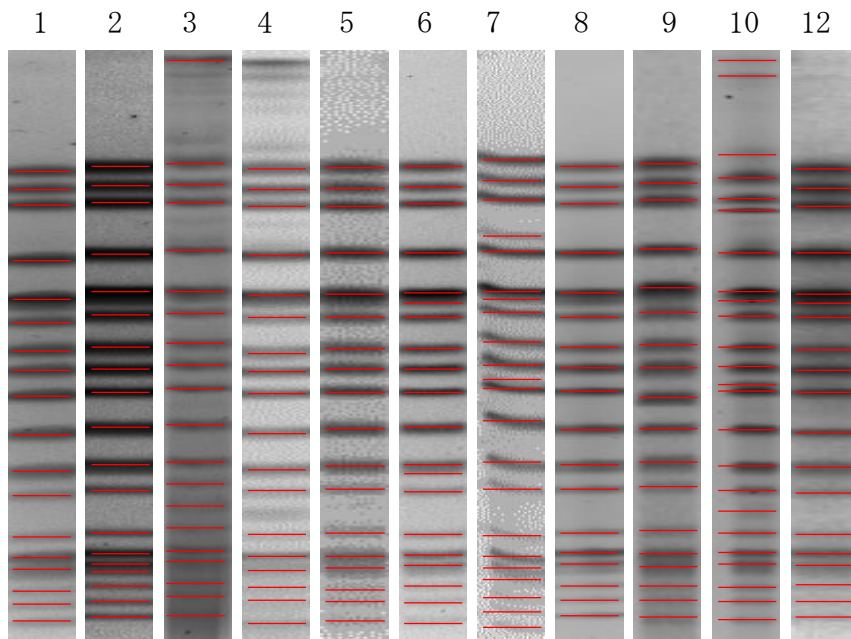


図4.1 平成28年度PFGE精度管理の結果（菌株A）

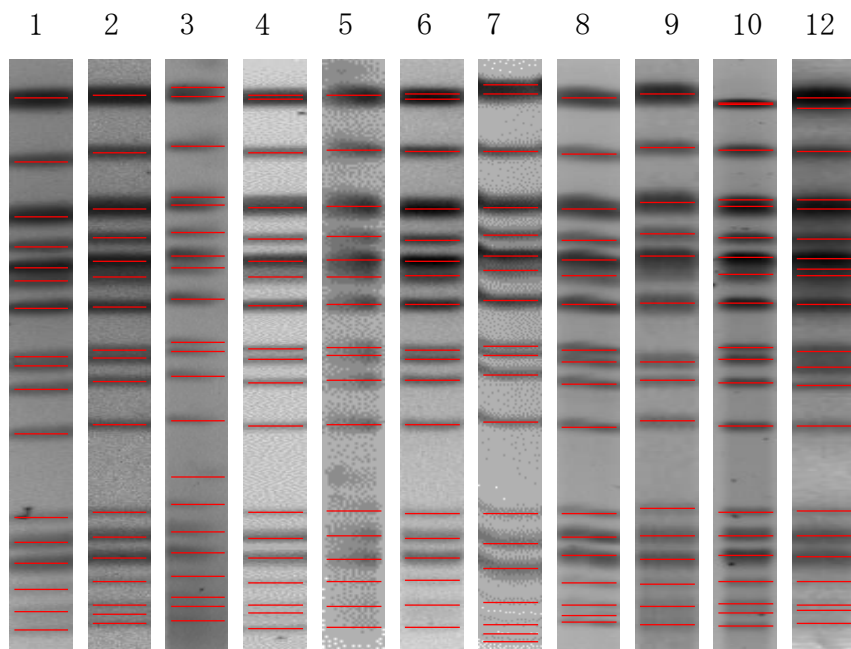


図4.2 平成28年度PFGE精度管理PFGEの結果（菌株B）

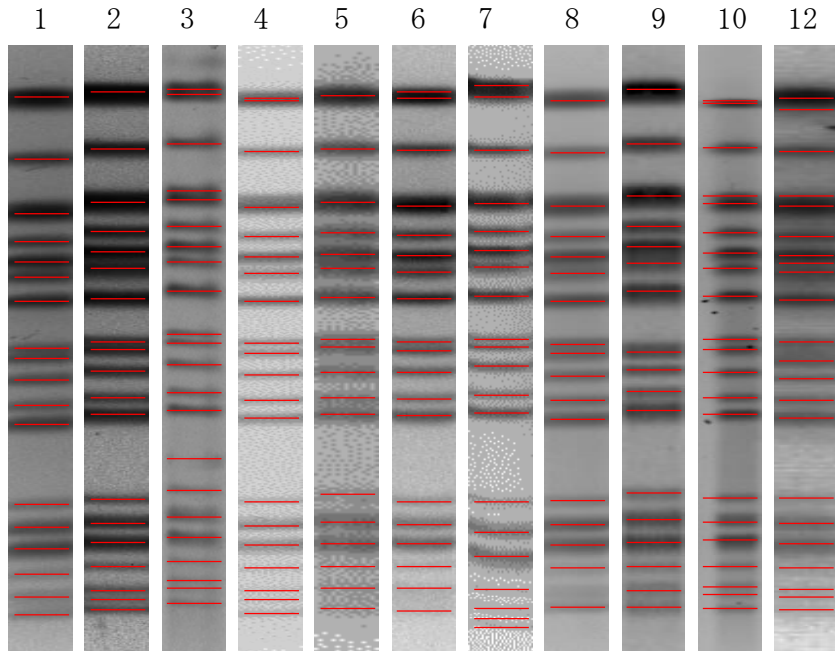


図4.3 平成28年度PFGE精度管理PFGEの結果（菌株C）

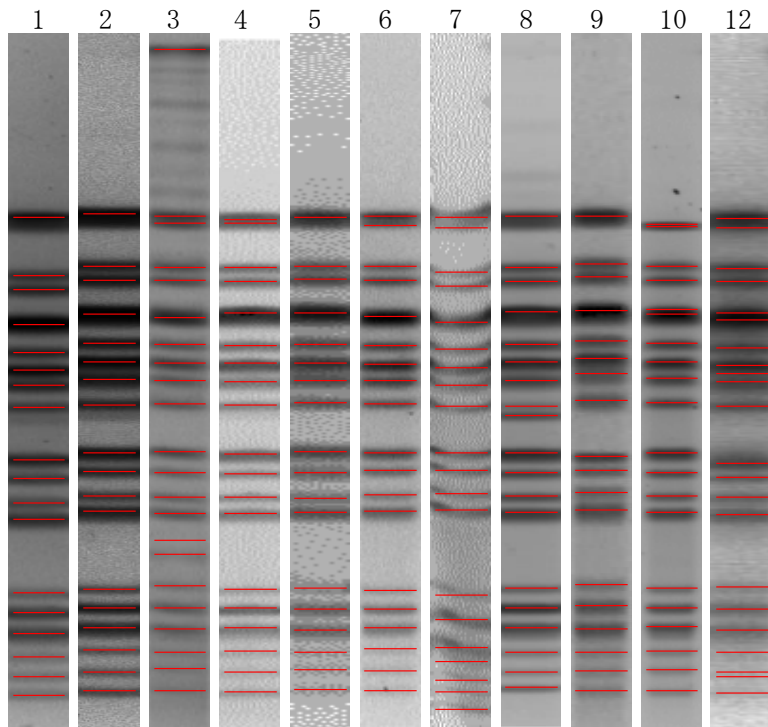


図4.4 平成28年度PFGE精度管理PFGEの結果（菌株D）

表8 平成28年度PFGE精度管理の結果（バンド数）

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

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5 平成29年度PFGE精度管理の問題

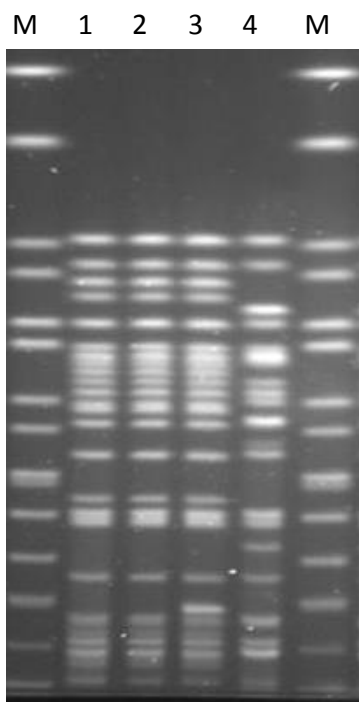


図6.1 地衛研1のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

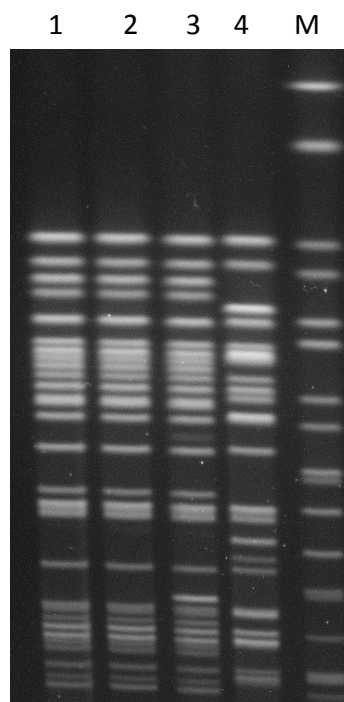


図6.2 地衛研2のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

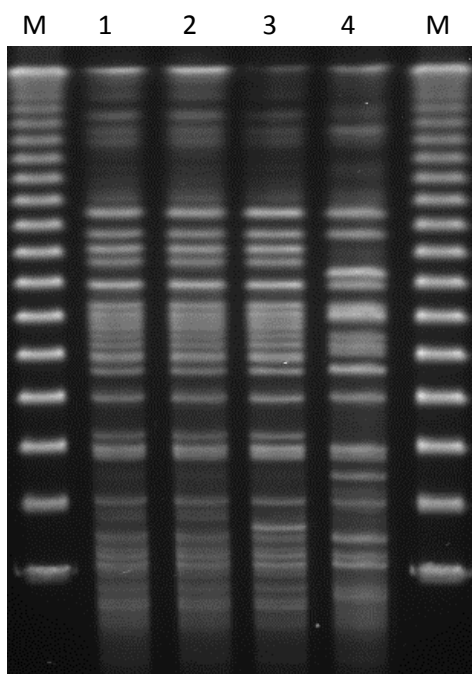


図6.3 地衛研3のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

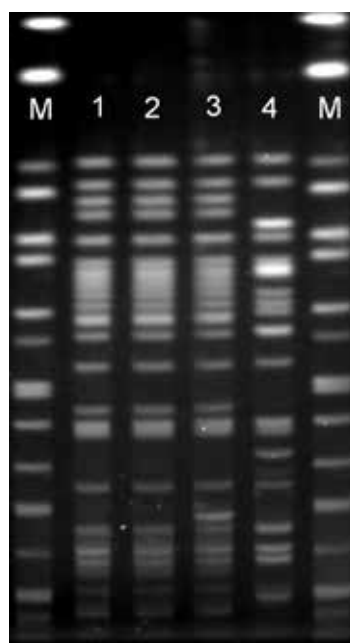


図6.4 地衛研4のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

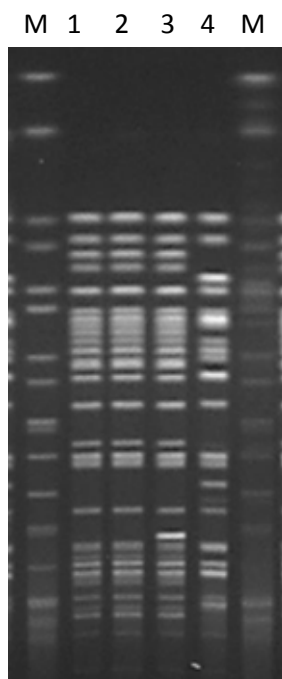


図6.5 地衛研5のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

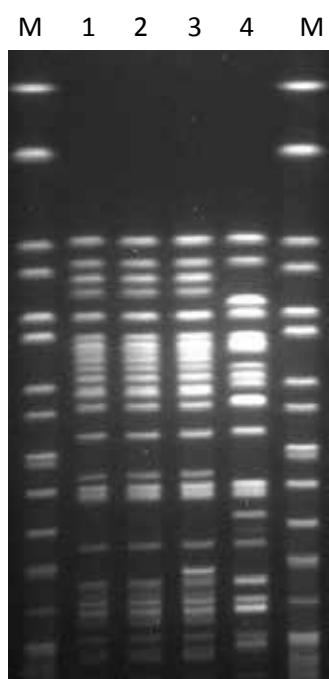


図6.6 地衛研6のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

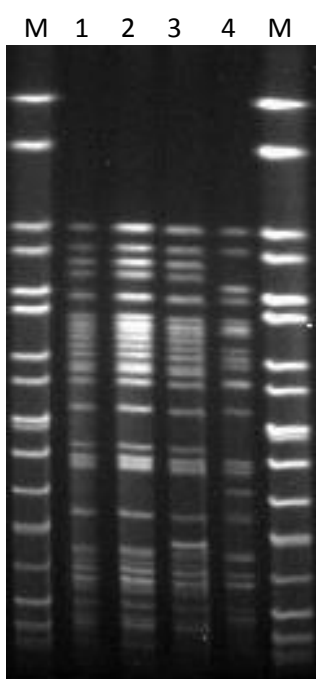


図6.7 地衛研7のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

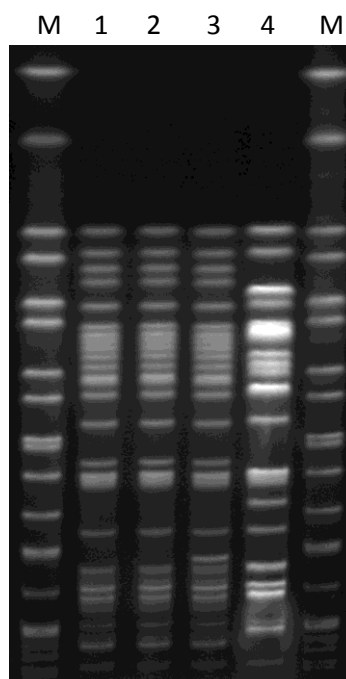


図6.8 地衛研8のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

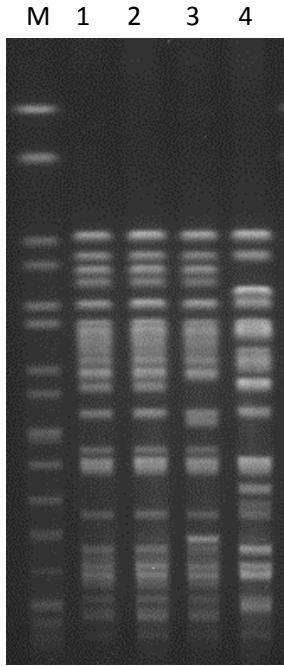


図6.9 地衛研9のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

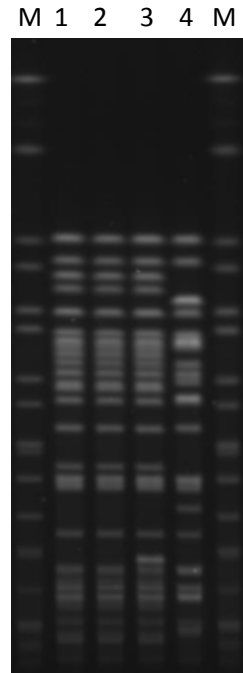


図6.10 地衛研10のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

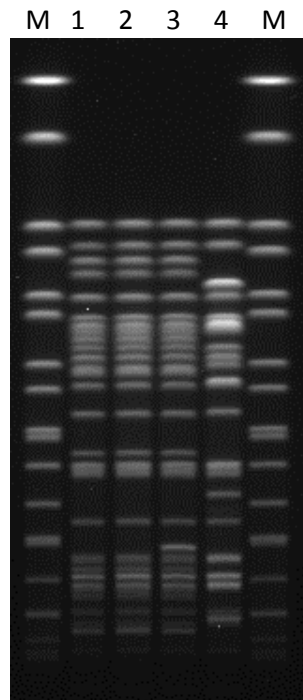


図6.11 地衛研12のPFGE電気泳動写真
(平成29年度)

表9 平成29年度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

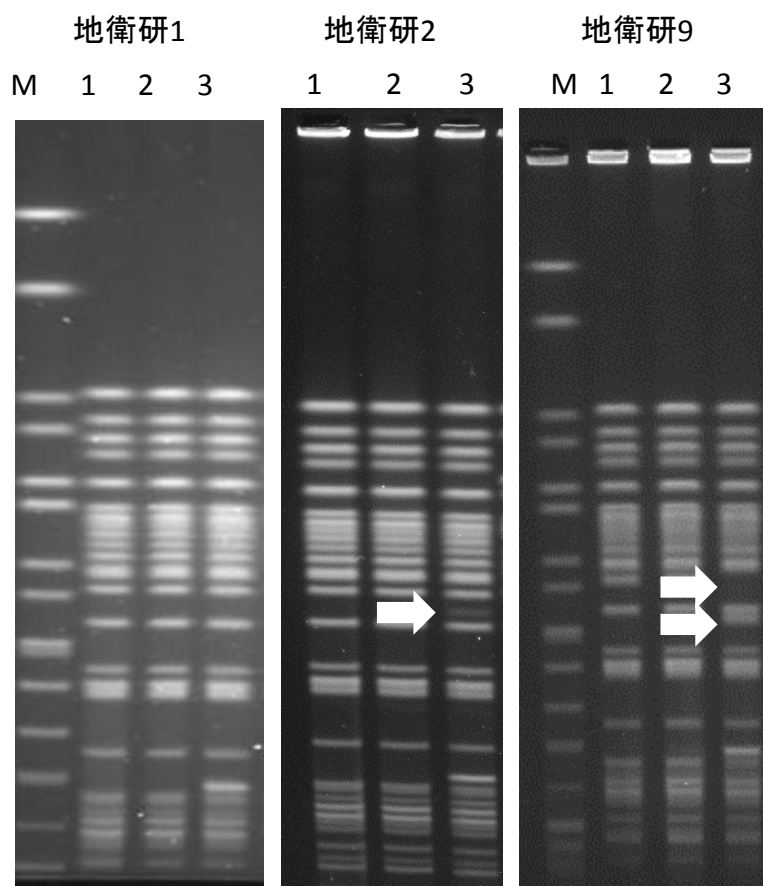


図7.1 変異した可能性があるPFGE写真
(平成29年度)

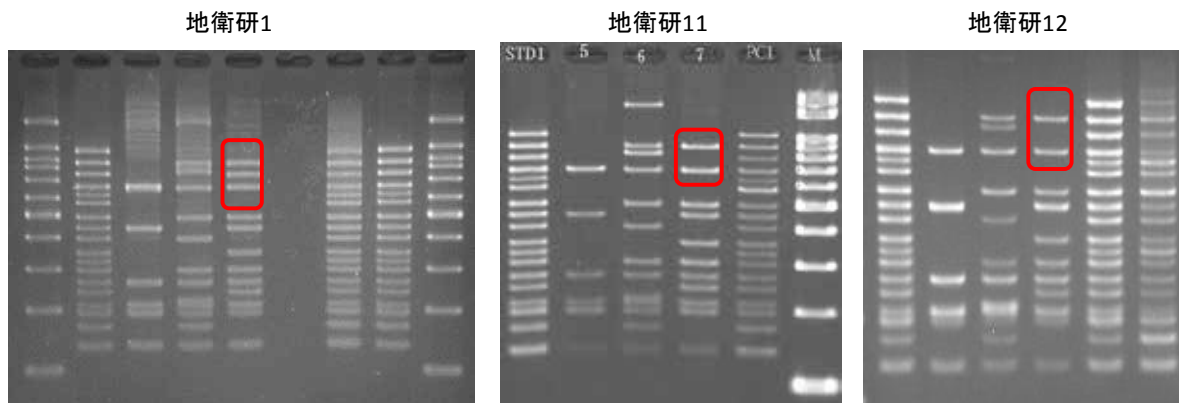


図7.2 *stx*ファージが脱落したと考えられる事例のSet1のISPS写真

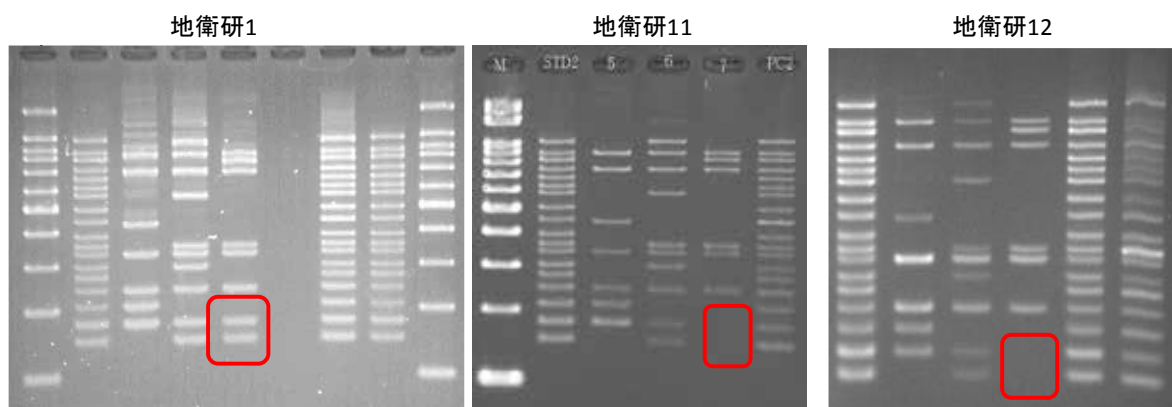


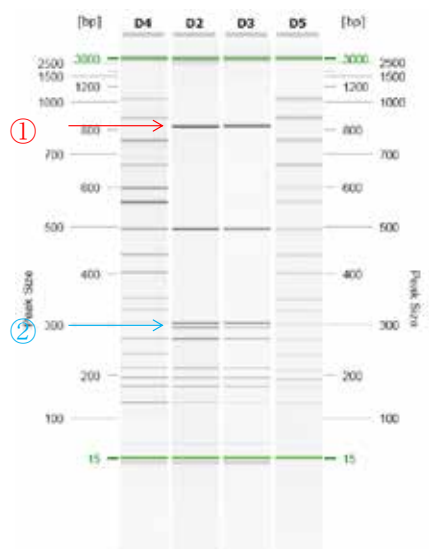
図7.3 *stx*ファージが脱落したと考えられる事例のSet2のISPS写真

表10 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	10月23日	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	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	不明	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

- 泳動像



- 方法

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

- 結果

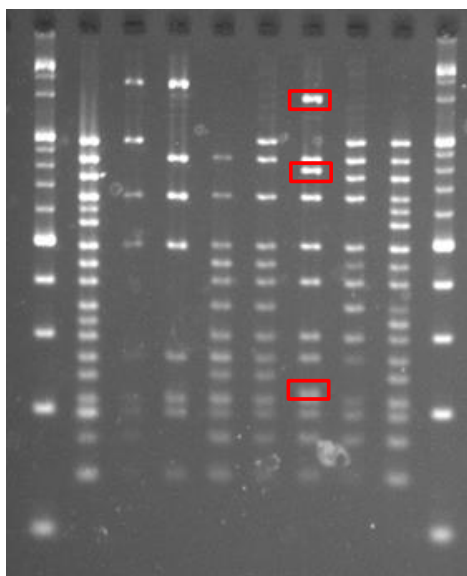
- エキストラバンドの位置
 - ①1-02と1-03の間
 - ②1-12のバンドの下
- 型名（感染研DB）
 - MLVA Type 16m0169
 - MLVA Comp 16c027
- 判定表（次ページに従って1/0標記）
 - Set1: 000000100001101111
 - Set2: 011100000011101010

- 備考（コメント・注意点等）

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

図8.1 ISPSのエキストラバンド情報

- 泳動像



- 方法

- 使用機器：Mupid-exu
- 泳動条件
 - ゲル濃度：3%
 - 電圧：100V
 - 泳動時間：99分
 - 泳動温度：室温（26度前後）

- 結果

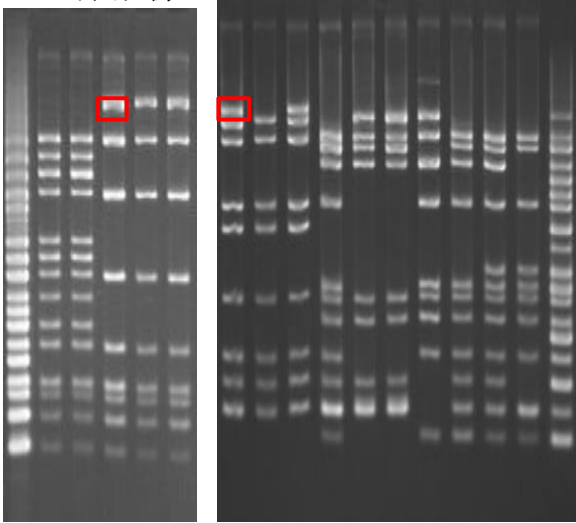
- エキストラバンドの位置
 - 1-01の上
 - 1-02と03の間
 - 1-14と15の間
- 判定表
 - Set1: 010100101001101111
 - Set2: 110100100011101011

- 菌株情報

2016年・20160610

図8.2 ISPSのエキストラバンド情報

- 泳動像



- 方法

- 使用機器：Mupid
- 泳動条件
 - 3%アガロースゲル
 - 100v
 - 65分
 - 泳動温度

- 結果

- エキストラバンドの位置
 - 1-01の上
 - 2-01の上
- 型名 e590
- 判定表
 - Set1:100100001000101111
 - Set2: 110000110001001110

- 菌株情報

- 平成21年分離 21-7

図8.3 ISPSのエキストラバンド情報

- 泳動像



- 方法

使用機器：Mupid-2plus

泳動条件：

ゲル濃度：3%

泳動条件：50V, 40分+100V, 65分

- 結果

エキストラバンドの位置

2-stx1の下

判定表

1st : 111100111101111101

2nd : 011100100011100110

- 菌株情報

分離年：2016年、NPH-STEC-1216

図8.4 ISPSのエキストラバンド情報

表11 IS-printingエクストラバンドの出現位置と報告数

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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「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 27-29 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。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、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築した。最終年度には、完成し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。本研究では、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いたバンドパターンを利用し、株判別を行うシステムの総合的な開発を目指した。最終年度には、完成したマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いた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

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

ンの長鎖部分（上部）、中鎖部分（中部）、短鎖部分（下部）に分け、electrophoregram のフィッティング処理を行った後、その相関係数をそれぞれ算出した。

最終年度のβテストは、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。

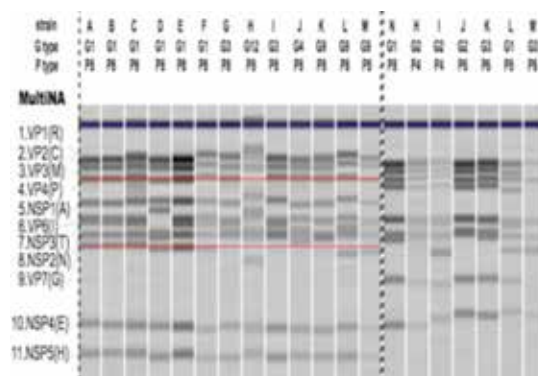
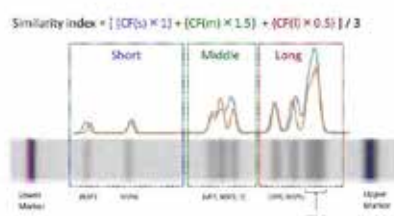
C. 研究結果および考察

RV のゲノムはサイズの大きいものから順に VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp)、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp)、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) の順番で MultiNA によるパターンとして検出された（サイズは株により異なるため、およその値で示した）。MultiNA では、VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp) は上部に近接したバンド群として、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp) は中部に近接したバンド群として、NSP4 (740

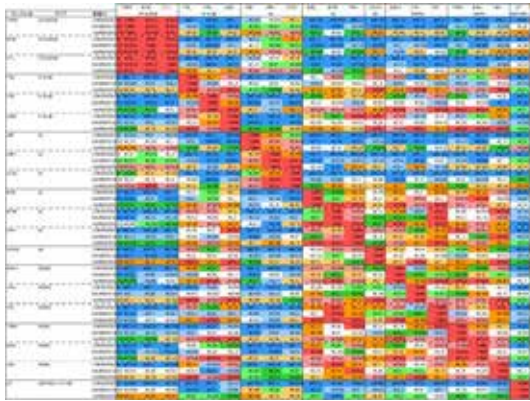
bp)、NSP5 (665 or 820 bp) は下部に互いに独立した 2 本のバンドとして検出された（図 1）。そこで、この特長を生かし、上部、中部、下部の 3 箇所に分けて、相対移動度だけでは無く、画像と electrophoregram（泳動波形とピーク位置が示されたグラフ）の蓄積を行った（図 2-1, -2）。

Fitting Process

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



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



上記表(図 3)には、一致度が高い法から低い方に赤色から青色へのグラデーションでカラーリングを施した。左上部から右下部にかけての対角線上に暖色系(特に赤の頻度が高い)ことが分かる。つまり、同じサンプルは、アッセイ間変動が多少存在しても高い相関係数を示した。逆に、異なる株は寒色系(青色)の頻度が高くなる。

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

Trial of rotavirus typing system using MultiNA

● MultiNAおよびPAGEの遺伝子型別検出率

Genotype	No. of Samples	Detection rates	
		MultiNA	PAGE
Total	116	73 (73%)	78 (78%)
G1[Wa]	34	27 (79%)	29 (85%)
G3[PS-1]	29	18 (64%)	20 (73%)
G3	10	8 (80%)	8 (80%)
G3	3	3 (100%)	2 (67%)
G9	25	17 (68%)	19 (76%)

▶ MultiNAの検出感度はPAGEと同程度

全 100 検体のロタウイルス陽性サンプルは、全ゲノム塩基配列を次世代シーケンサーによってあらかじめ決定した。このシーケンスデータの基づきあらかじめ遺伝子型を決定した。MultiNA と PAGE の検出率は、シーケンスデータに基づいて決定された遺伝子型との一致

率を示す。図 4 の結果から、MultiNA による遺伝子型分類正解率は、RNA-PAGE よりも若干劣っていた。しかし、RNA-PAGE では、PAGE のアッセイ間比較が非常に困難である事、ラボ間比較はほぼ不可能に近いことを考慮すると、これらを全て On line で可能とする MultiNA を用いた株判定システムの正解率は、十分に実用化できるレベルであると評価できる。特に、GP タイピングで G1P[8] と判定される DS-1 like G1P[8] の判定的中率が 60% を超えているのは、高く評価できる。また、本システムの場合、標準株、既報の株に一致しないパターン、つまり新しい遺伝子型の可能性がある場合、Not assigned (NA) と表示されるため、新型の流行をいち早く感知できるメリットがある。また、A 群ロタウイルスだけではなく、それ以外の B 群、C 群と他ウイルスに対しても、理論上判定が可能であるというメリットがある。

以下、最終年度に実施した β テストの結果と考察を示す。

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

遺伝子型別の正答率			
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	3	0 (0.0%)	全てG2判定
Total	34	20 (58.8%)	

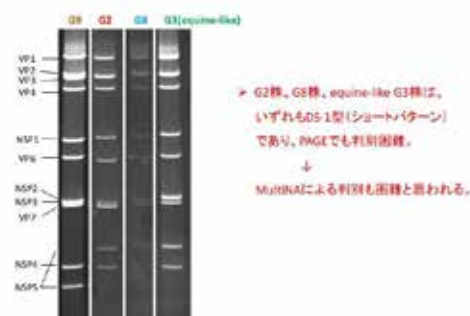
- ▶ 従来のG3(Wa型)は標準株の再検討で対応可能かもしれない。
- ▶ 近年流行し始めたequine-like G3(DS-1型)は全てG2判定となる。
- ▶ G3(DS-1型)も標準株が存在せず全てG2判定となる。

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**.
10. Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, Tsuchiaka S, Naoi Y, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Aoki H, Katayama Y, Oba M, Oka T, Ichimaru T, Yamasato H, Ouchi Y, Shirai J,

- Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan. *Virus Genes*. 2017 May 8. doi: 10.1007/s11262-017-1464-9. [Epub ahead of print]
11. Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, **Katayama K**, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K. Evolutionary Constraints on the Norovirus Pandemic Variant GII.4_2006b over the Five-Year Persistence in Japan. *Front Microbiol*. 2017 Mar 13;8:410. doi: 10.3389/fmicb.2017.00410. eCollection 2017.
 12. Ito M, Kuroda M, Masuda T, Akagami M, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Naoi Y, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Mukono I, Ouchi Y, Yamasato H, Shirai J, **Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination. *Infect Genet Evol*. 2017 Jun;50:38-48. doi: 10.1016/j.meegid.2017.02.008. Epub 2017 Feb 9.
 13. Hayashi-Miyamoto M, Murakami T, Minami-Fukuda F, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Naoi Y, Asano K, Ichimaru T, Haga K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Shirai J, Ishida M, **Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Diversity in VP3, NSP3, and NSP4 of rotavirus B detected from Japanese cattle. *Infect Genet Evol*. 2017 Apr;49:97-103. doi: 10.1016/j.meegid.2017.01.003. Epub 2017 Jan 4.
 14. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, **Katayama K**, Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc*. 2016 Oct 6;4(5). pii: e01099-16. doi: 10.1128/genomeA.01099-16.
 15. Sano K, Naoi Y, Kishimoto M, Masuda T, Tanabe H, Ito M, Niira K, Haga K, Asano K, Tsuchiaka S, Omatsu T, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Ouchi Y, Yamasato H, Ishida M, Shirai J, **Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Identification of further diversity among posaviruses. *Arch*

- Viol. 2016 Dec;161(12):3541-3548.
Epub 2016 Sep 12.
16. Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiol Immunol* 60, 609-616, 2016.
 17. Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld enable murine norovirus to internalize into host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 11;113(41):E6248-E6255., 2016.
 18. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep*. 2016 Jul 7;6:29400. doi: 10.1038/srep29400.
 19. Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan. DOI: 10.7883/yoken. Jpn J Infect Dis. 2016 Jun 30. [Epub ahead of print] impact factor 1.14
 20. Suzuki Y, Doan H. Y., Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K. Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan. *Microbiol and Immunol*. 60, 418-426, 2016.
 21. Doan HY, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon-Tanaka N, and Katayama K. Genetic analysis of human rotavirus C: the appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries. *Infect Genet Evol*. 2016 Apr 9;41:160-173. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.027. [Epub ahead of print]

22. Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Infect Genet Evol. 2016 Mar;38:90-5. doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.013. Epub 2015 Dec 18.
23. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. PLoS One. 2015 Nov 5;10(11):e0141739. doi: 10.1371/journal.pone.0141739. eCollection 2015.
24. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events. PLoS One. 2015 Sep 30;10(9):e0139381. doi: 10.1371/journal.pone.0139381. eCollection 2015.
25. Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. J Vet Med Sci. 2015 Sep 11. [Epub ahead of print]
26. Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T and Tohya Y. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. Veterinary Microbiology. 2016 Mar 15;185:62-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.005. Epub 2016 Feb 10.
27. Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki

- H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep*. 2015 Sep 4;5:13806. doi: 10.1038/srep13806.
28. Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A. Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus. *Microbiol Immunol*. 2015 Aug 14. doi: 10.1111/1348-0421.12317. [Epub ahead of print]
29. Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan. *Virus Res*. 2015 Aug 7;210:205-212. doi:10.1016/j.virusres.2015.08.001. [Epub ahead of print]
30. Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. *J Vet Med Sci*. 2015 Sep 11. [Epub ahead of print]
31. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan HY, Katayama K, Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Eurosurveillance* July 2, 1-6, 2015.
32. Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Park Y, Hall AJ, Vinjé J, Huang JC, Wu HS. Epidemiology and molecular characteristics of norovirus GII.4 Sydney outbreaks in Taiwan, January 2012-December 2013. *J Med Virol*. 2015 May 6. doi: 10.1002/jmv.24208. [Epub ahead of print]
33. Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Thant KZ, Thu HM, Win MM, Oo HN,

Htut T, Wakuda M, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen SV, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar. PLoS One. 2015 May 4;10(5):e0124965. doi: 10.1371/journal.pone.0124965. eCollection 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」
平成 27-29 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、開発を行った。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。三年間にわたる研究の最終目標として、世界三大データベースのオートパイロットシステムと、速度アップと、GatVirusWebの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。)とのリンク作成、などによる、作業効率アップを目標とした。最終年度には、サブデータバンク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サーバー依存性であった検索速度を改善することも目的とした。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ができるウェブサイトを立て上げに挑んだ。

C. 研究結果および考察

【新サーバーへの移行】

- 仮想サーバーの導入により、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。

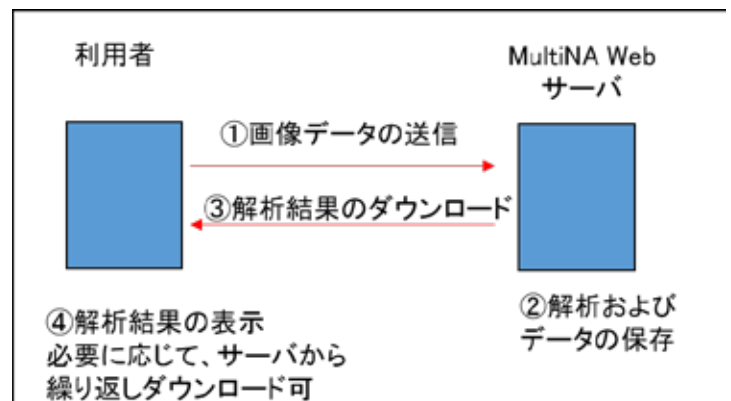
【ウイルスデータベース登録数】

	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サーバーの構築】

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）の最適化を行った。

MultiNAWebサーバーの概念図



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

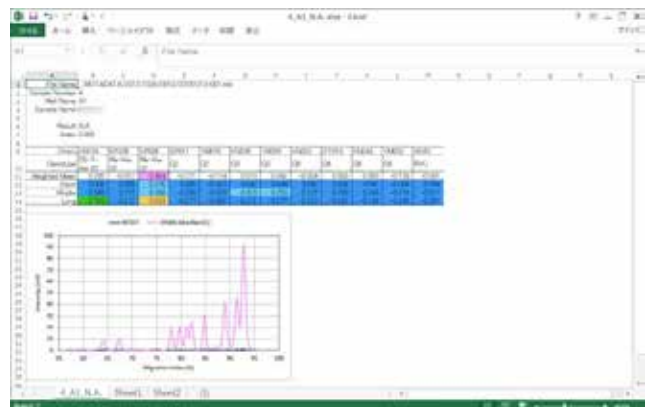


(zip 形式でダウンロード)

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。さらに、データキャパシティの大幅なアップも達成した。Noronet とのリンクにより、国際標準法として認識されている 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パブリック β 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 27-29 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
Kayali AY, Escalante-Maldonado O, Vuddhakul V, Seto K, Nakaguchi Y, Nishibuchi M	Development of a method for detection of Shigatoxin-producing <i>Escherichia coli</i> belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immuno-magnetic separation and loop-mediated isothermal amplification.	Int. J. Immunol. Immunother.	2	1	2015
Harada T, Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y	Multiplex real-time PCR assays for screening of Shiga toxin 1 and 2 genes, including all known subtypes, and <i>Escherichia coli</i> O26-, O111-, and O157-specific genes in beef and sprout enrichment cultures.	J. Food Prot.	78	1800-1811	2015
Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, Kumeda Y, Suzuki Y	Characterization of third-generation-cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Japan.	J. Clin. Microbiol.	53	3035-3038	2015
Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K.	Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand.	PLoS One.	10	e0141739	2015
Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K.	Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events.	PLoS One.	10	e0139381	2015

Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H.	Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I.	Sci Rep.	5	13806	2015
Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A.	Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus.	Microbiol Immunol.	59	586-596	2015
Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T.	Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan.	Virus Res.	210	205-212	2015
Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan HY, Katayama K, Shimizu H.	Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region.	Euro Surveill.	20	21173	2015

Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Park Y, Hall AJ, Vinjé J, Huang JC, Wu HS.	Epidemiology and molecular characteristics of norovirus GII.4 Sydney outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013.	J Med Virol.	87	1462–1470	2015
Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Thant KZ, Thu HM, Win MM, Oo HN, Htut T, Wakuda M, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen SV, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K.	Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar.	PLoS One.	10	e0124965	2015
Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H.	<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004.	Epidemiol Infect.	144	1241–1247	2016
Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H.	Molecular epidemiology of <i>Vibrio cholerae</i> O1 in northern Vietnam (2007–2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis.	J Med Microbiol.	65	1007–1012	2016
Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T	Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> .	Front. Microbiol.	7	765	2016

Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, Shimizu H.	Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016.	Genome Announc.	4	e01099-16	2016
Sano K, Naoi Y, Kishimoto M, Masuda T, Tanabe H, Ito M, Niira K, Haga K, Asano K, Tsuchiaka S, Omatsu T, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Ouchi Y, Yamasato H, Ishida M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Identification of further diversity among posaviruses.	Arch Virol.	161	3541-3548	2016
Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K.	Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation.	Microbiol Immunol	60	609-616	2016
Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K.	Functional receptor molecules CD3001f and CD3001d enable murine norovirus to internalize into host cells.	Proc Natl Acad Sci U S A.	113	E6248-E62 55	2016
Suzuki Y, Doan H. Y., Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K.	Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan.	Microbiol and Immunol.	60	418-426	2016

Doan HY, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon-Tanaka N, and Katayama K.	Genetic analysis of human rotavirus C: the appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries.	Infect Genet Evol.	41	160-173	2016
Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Whole genome analysis of Japanese bovine toroviruses reveals natural recombination between porcine and bovine toroviruses.	Infect Genet Evol.	38	90-95	2016
Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan.	J Vet Med Sci.	78	321-324	2016
Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T and Tohya Y.	Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation.	Veterinary Microbiology.	185	62-67	2016

<p>Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto–Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H.</p>	<p>Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II.</p>	<p>Sci Rep.</p>	<p>6</p>	<p>29400</p>	<p>2016</p>
<p>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</p>	<p>Population structure of <i>Escherichia coli</i> O26 : H11 with recent and repeated <i>stx2</i> acquisition in multiple lineages.</p>	<p>Microbial Genomics</p>	<p>3</p>		<p>2017</p>
<p>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.</p>	<p>Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974–2015.</p>	<p>Front Microbiol.</p>	<p>8</p>	<p>2399</p>	<p>2017</p>

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
Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, Tsuchiaka S, Naoi Y, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Aoki H, Katayama Y, Oba M, Oka T, Ichimaru T, Yamasato H, Ouchi Y, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan.	Virus Genes.	53	593-602	2017
Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K.	Evolutionary Constraints on the Norovirus Pandemic Variant GII.4_2006b over the Five-Year Persistence in Japan.	Front Microbiol.	8	410	2017

Ito M, Kuroda M, Masuda T, Akagami M, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Naoi Y, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Mukono I, Ouchi Y, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination.	Infect Genet Evol.	50	38-48	2017
Hayashi-Miyamoto M, Murakami T, Minami-Fukuda F, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Naoi Y, Asano K, Ichimaru T, Haga K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Shirai J, Ishida M, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Diversity in VP3, NSP3, and NSP4 of rotavirus B detected from Japanese cattle.	Infect Genet Evol.	49	97-103	2017
Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T.	Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan.	Jpn J Infect Dis.	70	167-170	2017
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

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
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
泉谷秀昌、石原朋子、 伊豫田淳、大西真	2014年に分離された腸管出血性大 腸菌 0157、026 および 0111 株の MLVA 解析について	IASR	36	83-84	2015
市川健介、小西典子、 甲斐明美他：	生サラダが原因と推定されたチフ ス菌による食中毒事例—東京都、 ISAR、第 36 巻、162-163、2015	IASR	36	162-163	2015
四宮博人、勢戸和 子、川瀬遵、有川健 太郎、船渡川圭次、 鈴木匡弘、久保田寛 顕、調恒明	地方衛生研究所における細菌学的 検査・研究の最新事情.	日本細菌学雑誌	70	309-318	2015

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