

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

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

研究分担者	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山城 彩花	茨城県衛生研究所
	中野 剛志	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	佐藤 孝志	埼玉県衛生研究所
	平井晋一郎	千葉県衛生研究所
	古川 一郎	神奈川県衛生研究所
	政岡 知佳	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
	井川由樹子	長野県環境保全研究所
	森主 博貴	静岡県環境衛生科学研究所
	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター

研究要旨 腸管出血性大腸菌 O157 共通菌株を用いて PFGE 法、IS 法の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。いずれの施設も良好な成績ではあったが、PFGE 法では画像が若干不鮮明なもの、IS 法ではエキストラバンドの報告が無いものがあった。今年度から希望参加の形で MLVA 法の精度管理も実施し、8 施設の参加があった。結果はいずれも良好な成績であった。

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

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

A. 研究目的

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

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

(Diffuse Outbreak) 可能性がある。このような場合、原因の食材・食品、感染経路を特定するためには、病原体の詳細な解析が必要である。サルモネラや腸管出血性大腸菌 (EHEC) による患者の症状は重篤に陥ることがあり、病原体の解析は特に重要となる。

また自治体をまたがる事例の場合、各地方衛生研究所での検査結果を比較し判定する必要があることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要である。近年は地研の職員も、異動により部署が変わることが多くあり、技術レベルを一定以上に保つためには定期的な精度管理調査が必要とされている。

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

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

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

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理

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

1) 供試菌株

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

2) PFGE 法

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

3) IS 法

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

4) MLVA 法

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

2. MLVA の実践的プロトコール作成 (執筆協力)

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

3. MLVA 法の普及啓発（研修会への参加）

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

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

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

5. 分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査

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

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理結果

1) PFGE 法

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

2) IS 法

関東ブロック 10 施設で、共通菌株について IS 解析を実施した結果、Primer set 2 では

全ての施設が同一の結果を報告した。これに対し Primer set 1 では、菌株 2 において 2 施設が Primer No.1-03 で誤判定の報告をした。当該株は、エキストラバンドが 1-02 と 1-03 の間および 1-14 と 1-15 の間に出る株であり、2 施設は前者のエキストラバンドを誤判定したものと考えられた（表 2 共通菌株の IS-printing System 成績）。

3) MLVA 法

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

2. MLVA の実践的プロトコール作成（執筆協力）結果

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

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

3. MLVA 法の普及啓発（研修会への参加）結果

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

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

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

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

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

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

D. 考察

病原体の分子疫学解析では、異なる検査施設での結果を比較し、判定する必要も出てくることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることは重要である。そこで、関東ブロック 10 施設全てで実施されている PFGE 法、IS 法について、今年度も共通菌株を用いた精度管理を実施した。菌株は、東京都で 2017 年に分離された O157 株を使用し、IS 法でエキストラバンドが少ない株と、特徴的エキストラバンドが出る株

を取り混ぜて配布した。

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

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

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

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

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

E. 結論

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

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

を行い、MLVA 法の普及を図った。

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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

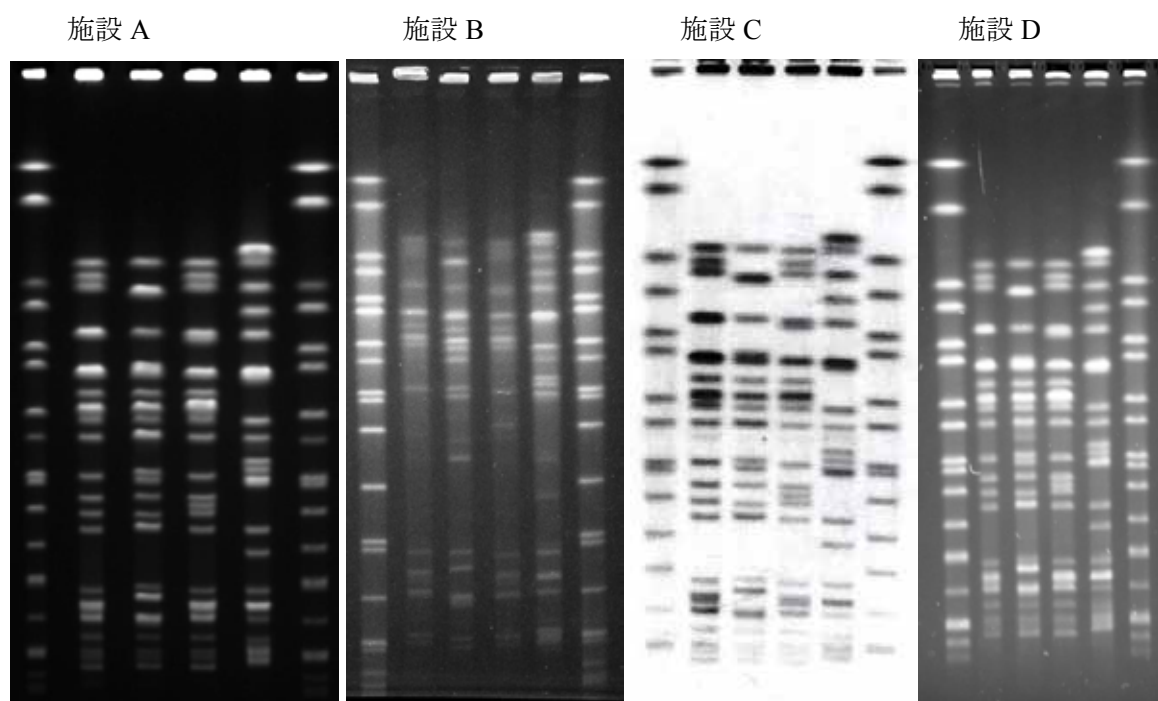
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 共通供試菌株 (2017 年分離腸管出血性大腸菌 O157 株)

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

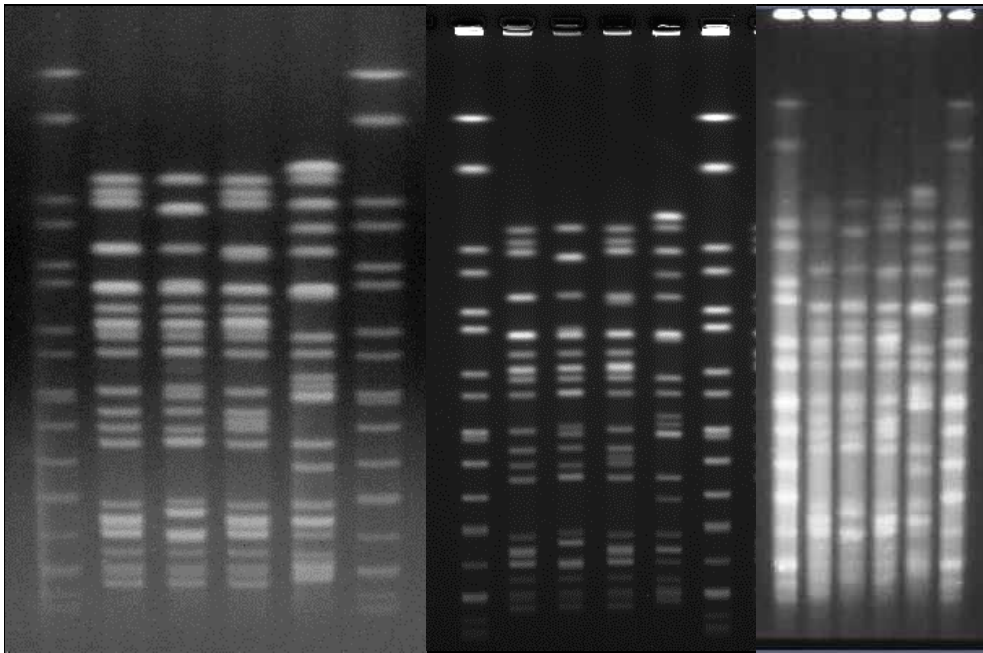
図 1 共通菌株の PFGE 像



施設 E

施設 F

施設 G



施設 H

施設 I

施設 J

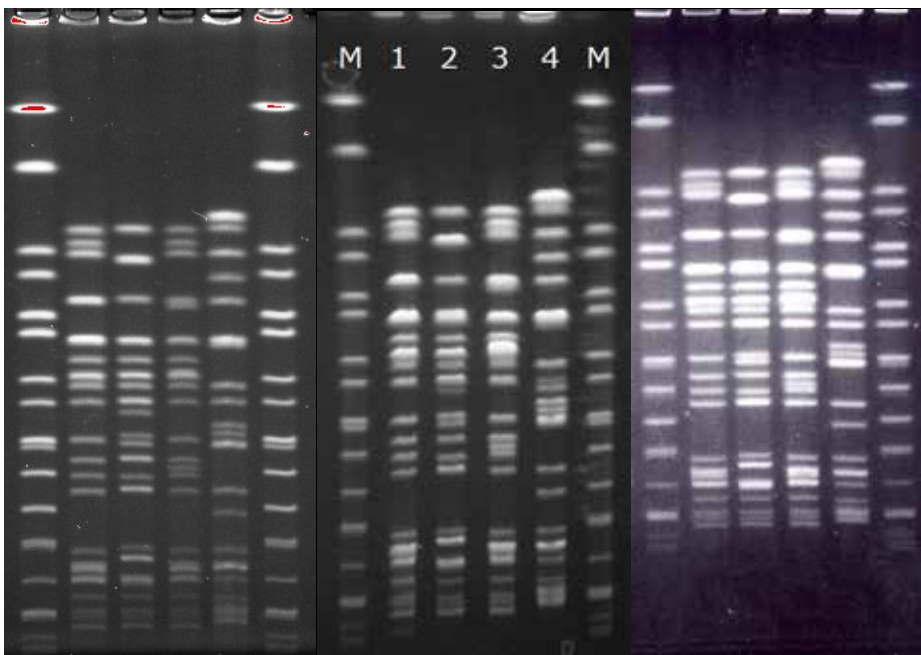


表2 共通菌株の IS-printing System 成績

Primer set 1

菌株 1

Prime No. 菌株 No.	1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hly 137	非特異バンド	備考
A	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
B	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
C	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
D	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01(974 bp)より 大きい位置	
E	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
F	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	>1500bp	
G	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上 (>1500bp)	
H	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1(>1000bp)	
I	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上	
J	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		

菌株 2

Prime No. 菌株 No.	1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hly 137	非特異バンド	備考
A	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02,03の間 及び1-14,15の間 にエキストラバンド あり。	
B	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間 (80bp付帯) 1-14と1-15の間 (220bp付帯)	
C	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	2と3の間 ・15の上	
D	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-14(241 bp)と1- 15(211 bp)の間の 位置	
E	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間	
F	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	約220bp(1-15の すぐ上)	
G	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間 ・1-14と1-15の間	
H	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1(83bpと74bpの間) 1(241bpと211bpの間)	
I	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-02と1-03の間 1-14と1-15の間	
J	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	上から2本目と3本 目の間	

Primer set 1

菌株 3

Primer No. 菌株 No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hly	非特異バンド	備考
	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137		
A	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
B	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
C	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
D	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01(974 bp)より 大きい位置	
E	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
F	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
G	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上 (>1500bp)	
H	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1(>1000bp)	
I	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上	
J	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		

菌株 4

Primer No. 菌株 No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hly	非特異バンド	備考
	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137		
A	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
B	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
C	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
D	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
E	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
F	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
G	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
H	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
I	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
J	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		

Primer set 2

菌株 1

Primer No. 菌株 No.	2-01 987	2-02 861	2-03 801	2-04 710	2-05 642	2-06 599	2-07 555	2-08 499	2-09 449	2-10 394	2-11 358	2-12 331	2-13 301	2-14 278	2-15 240	2-16 211	stx2 181	stx1 151	非特異バンド	備考
A	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
B	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
C	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	・1と2の間	
D	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01 (987 bp) より大きい位置	
E	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
F	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	>1500bp	
G	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上 (>1500bp)	
H	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1 (>1000bp)	
I	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上	
J	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		

菌株 2

Primer No. 菌株 No.	2-01 987	2-02 861	2-03 801	2-04 710	2-05 642	2-06 599	2-07 555	2-08 499	2-09 449	2-10 394	2-11 358	2-12 331	2-13 301	2-14 278	2-15 240	2-16 211	stx2 181	stx1 151	非特異バンド	備考
A	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
B	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
C	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
D	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	2-01 (987 bp) より大きい位置	
E	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
F	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	約1400bp	
G	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	2-01の上 (1000-1500bpの間) 2-01の上	
H	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
I	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
J	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		

Primer set 2

菌株 3

Primer No. 菌株 No.	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1	非特異バンド	備考
	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151		
A	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
B	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
C	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	・1と2の間	
D	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01(987 bp)より大きい位置	
E	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
F	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	>1500bp	
G	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上(>1500bp)	
H	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1(>1000bp)	
I	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2-01の上	
J	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		

菌株 4

Primer No. 菌株 No.	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1	非特異バンド	備考
	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151		
A	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
B	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
C	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
D	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
E	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
F	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
G	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
H	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
I	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
J	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		

図2 共通菌株の IS 像

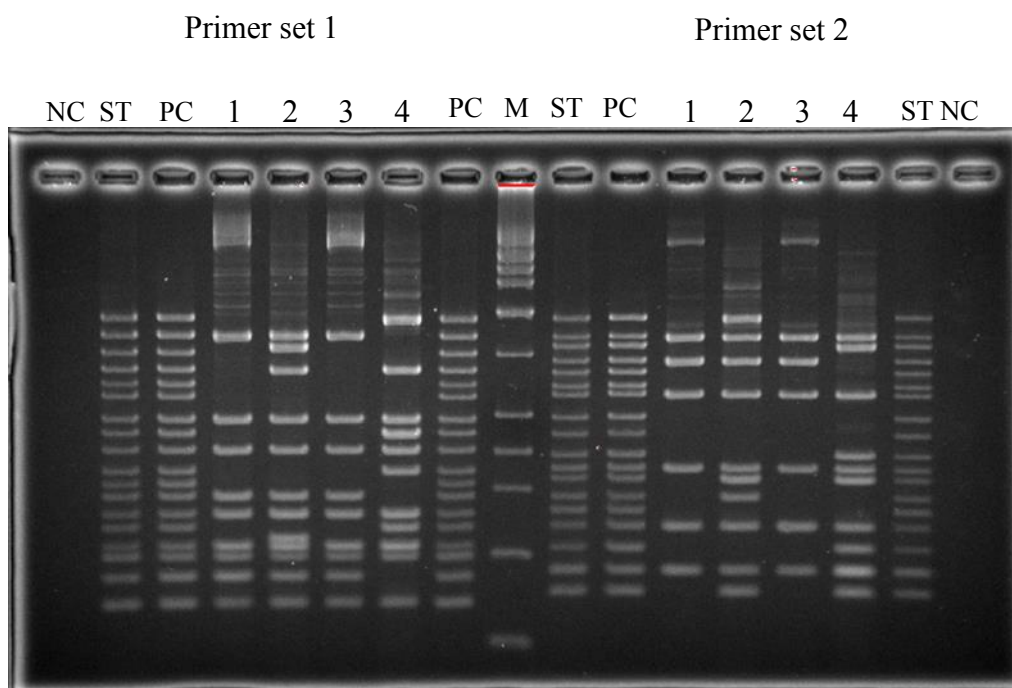


表3 共通菌株の MLVA 成績
菌株 1

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

菌株 2

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

菌株 3

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

菌株 4

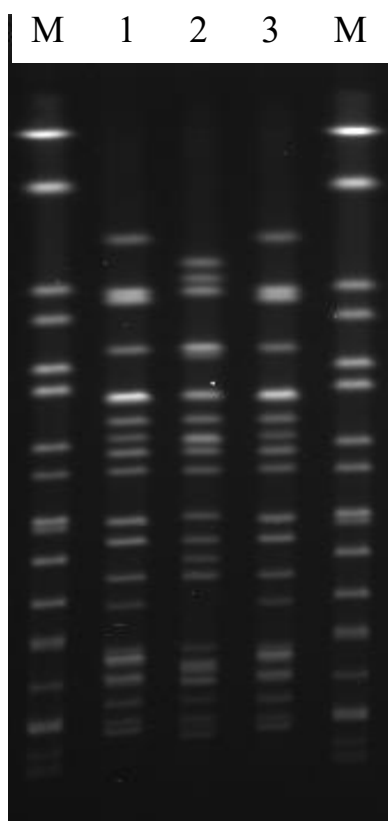
Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	12	12	12	12	348.33	351.5	12	12	12
EHC-1	70-210	VIC	緑	5	5	5	5	98.45	100.0	5	5	5
EHC-2	220-460	VIC	緑	4	4	4	4	232.90	233.9	4	4	4
O157-9	480-600	VIC	緑	17	17	17	17	561.97	561.3	17	17	17
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	9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

分子疫学解析が有効に活用された事例集

事例 1. 焼肉店で発生した食中毒事例

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

この2菌株について制限酵素 *Xba* I を用いて PFGE を行ったところ、患者①と②は同一の泳動パターンを示した。患者2人に接触歴および共通の感染経路はなく、共通食は当該施設で提供された食事のみということで、横浜市保健所は原因施設である焼き肉店 A に対し、営業禁止処分を行った。



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

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

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

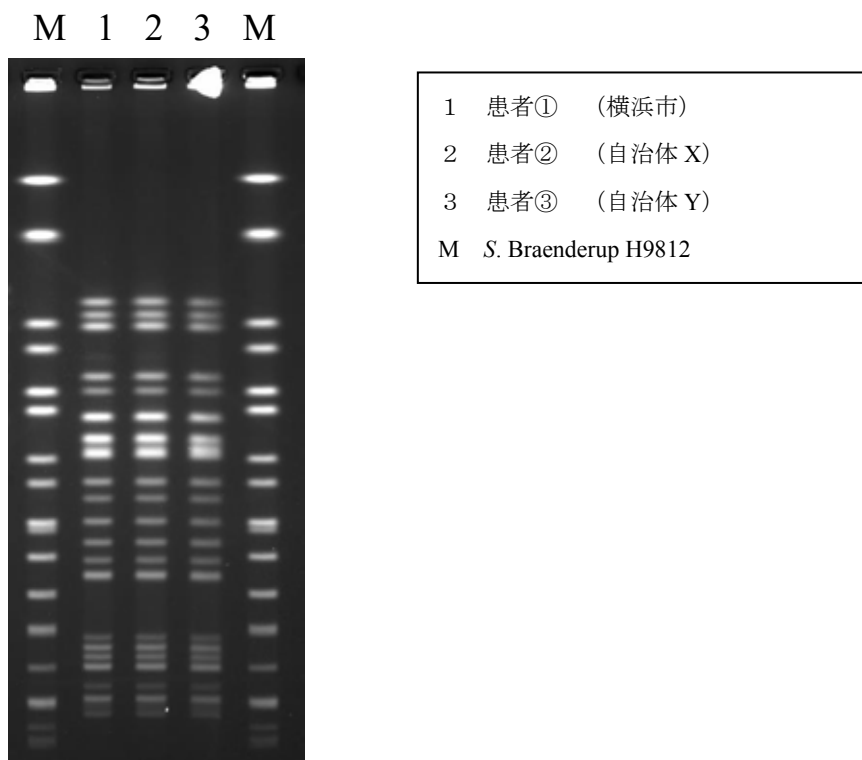
本事例は、患者の主症状及び潜伏期間が、腸管出血性大腸菌 O157 によるものと一致したこと、患者の共通食が、原因施設で提供された食事限定された事、患者4名から分離された菌株の MLVA パターンが一致したことなどから、当該施設で提供された食事を原因とする腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT2)による食中毒事例とされた。

表1 分離株の MLVA パターン

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

事例 3. 焼肉店で発生した食中毒事例 2

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



事例 4. 飲食店で発生した EHEC O157 による集団食中毒事例

【事例概要】

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

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

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

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

③ 保健所による疫学的調査の追加実施（12 月 4 日）

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

④ 飲食店 S を営業停止処分（12 月 5 日）

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

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

【まとめ】

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

感染源が飲食店 S の食事であることが発覚する手掛かりとなった。

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