

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* 01 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* 01 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