

令和元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の解析手法及び共有化システムの構築のための研究」

研究分担報告書

「EHEC 分離株の分子疫学解析について」

研究代表者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
研究分担者	伊豫田 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	李 謙一	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者		地方衛生研究所	

研究要旨 2019年に分離されたEHECについてMLVAおよびPFGE解析を行い、その型別結果に基づいて分離株の動向について調べた。PFGEを用いて293株の解析を行い、BioNumericsデータベースに登録した。MLVAを用いてEHEC 0157 1,652株、026 474株、0111 133株、0103 195株、0121 76株、0145 93株、0165 4株、091 38株、計2,665株を解析し、それぞれ、701、221、76、60、38、24、4、33の型が同定された。0103、0145において集団事例もしくはクラスターが検出され、シンプソンの多様性指数(SDI)が0.895、0.831と比較的低かった。それ以外の血清群のSDIは0.95以上と比較的高い値を示した。5機関以上で検出されたMLVAコンプレックスもしくはタイプに含まれる株は626株であった。当該コンプレックスは0157 12種類、026 1種類、0111 1種類、0121 1種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは0157 10種類、026 2種類、0103 3種類、0121 1種類、0145 2種類であった。これらには広域集団事例に関連したものも含まれた。2018年6月29日に厚生労働省から発出された事務連絡に基づき地研から送付されたMLVAデータの解析を行い、送付された菌株の解析結果と併せて情報還元・共有を行った。送付されたMLVAデータ処理のため、VPSサーバにMLVAシステムの構築を行った。今後、MLVAをはじめとした分子疫学解析手法の手技的側面、データ解析、取り扱いといった側面における技術支援、並びにMLVAシステムの運用検証など、共有に向けたシステムの検討・改良の必要があると考えられた。

A. 研究目的

食品由来感染症は病原体に汚染された食品を摂取することによって発生する。腸管出血性大腸菌は当該感染症の代表的な起原菌の一つである。EHEC感染症は3類感染症

に含まれ、毎年3-4千名の感染者が発生している。これらの中には複数の自治体をまたいで流行する株、広域株も存在し、その感染源を突き止めることはEHEC感染症の制御に重要である。また広域株に限らず、個々

の事例対応においても感染者から分離された菌株を比較し、その類縁性を明らかにしていくことは必須である。

EHEC 流行菌型の解析、すなわち分子疫学解析手法としては、現在パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)、IS-printing system (IS-PS)、反復配列多型解析 (multilocus variable-number tandem repeat analysis、MLVA) の3つの方法が主に使われている。

平成30年6月29日に厚生労働省から発出された事務連絡により、解析手法のMLVAへの統一およびMLVAデータの収集が図られることとなった。

上記のような技術的、また社会的背景の中、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)、並びに血清群 0103、0121、0145、0165、091 (追加5血清群) について、MLVA法を用いて解析し、類縁菌株の情報取得、複数の機関で検出される所謂広域株の解析、及び情報共有について検討を行った。

B. 研究方法

感染研に送付された腸管出血性大腸菌2019年分離株に対してMLVA法を用いた解析を行った。解析結果のデータベース化をBioNumerics (Applied Maths社)により行った。地方衛生研究所から送付されたMLVAデータについても同様にデータベース化を行い、菌株からのデータと合わせて比較解

析を行った。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。送付された菌株を解析したデータ、地衛研から直接送付されたMLVAデータについては定期的に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法に食品大西日本で開発された26遺伝子座を追加した方法で実施した。

MLVAデータに関するシステム構築のため従来のWindowsサーバからVPSサーバに環境を移行した。

C. 研究結果

2019年分離株について、2020年2月26日現在の結果を示す。

1. PFGE

293株を解析した。菌株数が多かった血清群は0 (PCR法による0gを含む。以下同) 5が35株、0113が23株、08が18株、0115が17株、0146が11株であった。得られた情報をBioNumericsデータベースに登録した。

2. MLVA

EHEC 0157 1,652株、026 474株、0111 133株、0103 195株、0121 76株、0145 93株、0165 4株、091 38株、計2,665株をMLVA法で解析した。それぞれ、701、221、76、60、38、24、4、33の型が同定された。各血清群におけるSimpson's Diversity Index (SDI) は表1に示すとおりであった。

表2に検出株数の多かった型上位15を示す。集団事例に関連し、1機関のみで検出さ

れた型が 2 種類 (19m2103、19m0289) あった。それ以外の型は複数機関、ほとんどが 5 機関以上で検出された広域株であった。

3. 広域株の解析

MLVA では、得られた型から関連が疑われるタイプ同士をコンプレックスとして包括している。2019 年分離、解析した EHEC 株のうち、5 機関以上で検出された MLVA コンプレックスもしくは MLVA 型に含まれる株は 626 株であった。このうちコンプレックスは 15 種類 (0157 が 12 種類、026 が 1 種類、0111 が 1 種類、0121 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 18 種類 (0157 が 10 種類、026 が 2 種類、0103 が 3 種類、0121 が 1 種類、0145 が 2 種類) であった。

広域株のうち、広域集団事例に関連した 18m0541 (0157 VT1+VT2)、19c201 (026 VT2)、16m4011 (0103 VT1)、19m6006 (0145 VT2)、19c058 (0157 VT2) について、週別の検出状況を図 1 に示す。また各広域株について、地理的な分布を図 2 に示す。

4. MLVA データ共有に関する活動

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。上記広域集団事例が疑われた株については MLVA 及び PFGE 解析に関する情報を全国 6 ブロックの研究分担者を通じて情報共有を行った

2018 年 6 月の事務連絡に基づき、25 機関から MLVA データの送付があり、670 株のデータに型名を付与した。菌株解析で得られ

た MLVA データおよび地研から送付された MLVA データについては、定期的に厚生労働省と共有し NESFD の掲示板に供された。

上記 670 株のうち、392 株については後日菌株が送付され、MLVA の結果を還元するとともに、精度確認についても情報提供した。地研での MLVA 導入に向け、データ提供、データの照会、フラグメント解析設定ファイルの配布などを行った。

従来の感染研内 Windows サーバの環境を VPS サーバに移行した。移行に伴い、BioNumerics サーバならびに IS-PS システムを終了した。当該環境において IS-PS システムの一部を利用した MLVA システムの構築を検討した。本システムは、Web を介して MLVA データを登録、処理し、型名を付与するための試験システム環境として設計した。

D. 考察

MLVA 法による EHEC 分離菌株の解析から、主要 3 血清群 0157、026、0111 では SDI が比較的高かった。検出数上位の MLVA 型には 0157 ではなく 0103、026 が入った。これらの結果は例年よりも大きなクラスターが少なく、小規模から中規模のクラスターが多数検出されたことが窺えた。

広域集団事例関連株を含むコンプレックス及び MLVA 型はいずれも 2-3 週間に集中的に検出された (図 1)。これらの地理的分布は様々であった。集団事例に関連した県に収集しているものもあれば、19c058 のように全国に広く検出されたものもあった。

2014 年度から稼働し始めた EHEC 主要 3 血清群、並びに 2017 年度から導入した追加 5 血清群の MLVA の結果から、広域株探知に

加え、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、個々の事例においても有用性が示された。

MLVA を活用することで迅速に病原体情報を共有することが期待されている。2018年6月の事務連絡に基づき、地研で実施したMLVA データを使用した解析、並びに共有が開始された。迅速なデータおよび菌株のやり取りが広域事例の対応に生かされた事例も見られた。

VPS サーバに構築中の MLVA システムは、Web ベースでデータを登録、MLVA 型を付与する。今後実際にブロック分担者からのデータを受け付けてその運用を試験し、さらに検証する必要がある。

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る。

2018年6月の事務連絡により、MLVA 法に基づく病原体解析手法の統一化、情報共有に向けた方向性が示された。今後、各地研における導入に向けた支援、試験結果の精度維持にかかる支援、データ授受に関する検討、データ共有のあり方などを含め、検討及び改良を重ねていく必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2018年に分離された腸管出血性大腸菌のMLVA法による解析。IASR、第40巻、81-82、2019年5月

2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析（MLVA法）について。食品衛生学雑誌、第60号第1巻、J-7-8、2019年2月。

3. 泉谷秀昌：広域散発事例探知に向けた取り組み。日本食品微生物学会雑誌、第36巻第1号、10-12、2019年。

4. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌～分子疫学解析を利用した病原体サーベイランス。感染制御と予防衛生、第3巻第2号、75-80、2019年。

2) 学会発表等

1. 李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真：WGS 解析による MLVA の評価と効率的腸管出血性大腸菌 0157 サーベイランス手法の確立。第92回日本細菌学会総会、2019年4月、北海道札幌市

2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について。衛生微生物技術協議会第40回研究会、2019年7月、熊本県熊本市。
泉谷秀昌：MLVA 法の概要について。令和元年度特別区専門研修「検査技術」、2019年9月、東京都。

3. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 株の MLVA 解析について。令和元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、2019年11月、東京都。

4. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2018年における腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析。第40回日本食品微生物学会学術総会、2019年11月、東京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

表 1. 2019 年株における MLVA 試験菌株数、型数及び Diversity Index

0 群	株数	型数	SDI
0157	1652	701	0.995
026	474	221	0.980
0111	133	76	0.961
0103	195	60	0.895
0121	76	38	0.947
0145	93	24	0.831
0165	4	4	1
091	38	33	0.993

表 2. 2019 年検出数上位 MLVA 型

MLVA 型	0 群	VT 型	株数	機関	コンプレックス
16m4011	0103	VT1	59	7	
19m2033	026	VT2	45	7	19c201
19m0046	0157	VT2	38	20	19c010
19m2103	026	VT1	37	1	19c208
19m6006	0145	VT2	35	12	
19m0080	0157	VT1+VT2	34	2	19c007
19m0169	0157	VT1+VT2	32	2	19c031
16m0103	0157	VT2	31	12	19c028
19m0488	0157	VT2	25	16	19c058
19m3035	0111	VT1	24	3	19c305
19m0112	0157	VT1+VT2	22	3	19c044
18m0249	0157	VT1+VT2	22	6	19c011
18m0541	0157	VT1+VT2	22	13	
19m0487	0157	VT2	21	12	19c058
19m0289	0157	VT1+VT2	21	1	
16m0399	0157	VT1+VT2	21	11	19c030

図1. 広域株の検出状況（週別）。点線は送付株全体（縦軸右）。

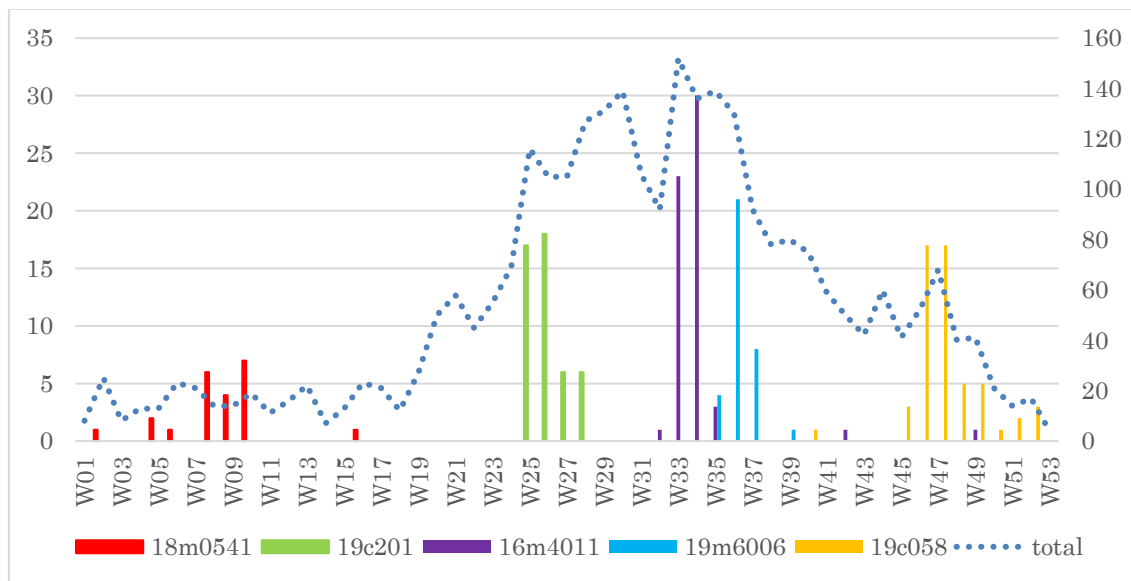
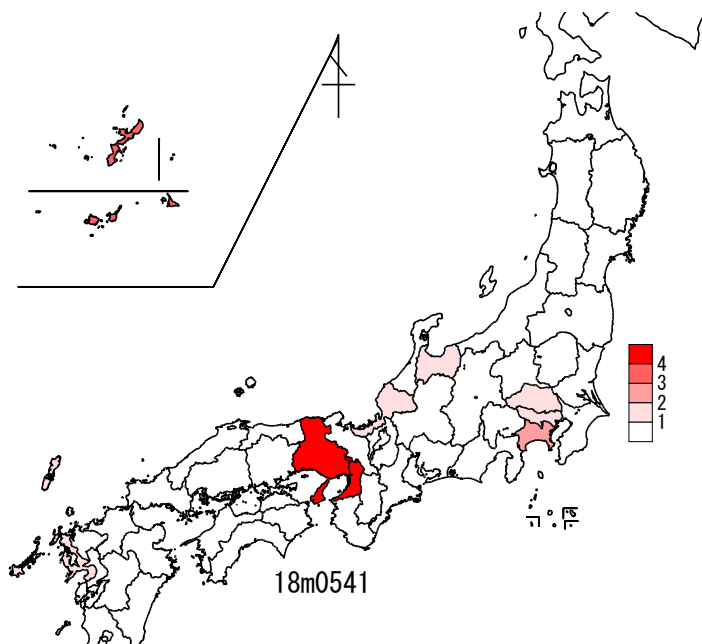
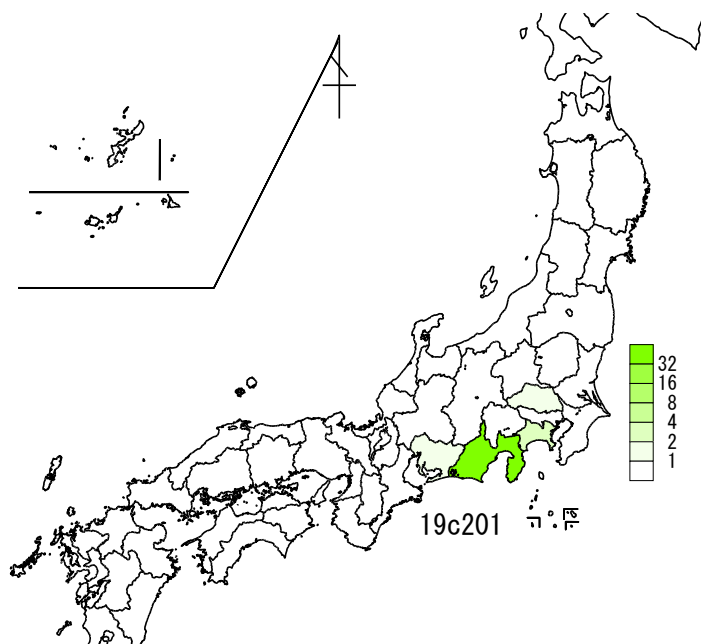


図2. 広域株の地理的分布

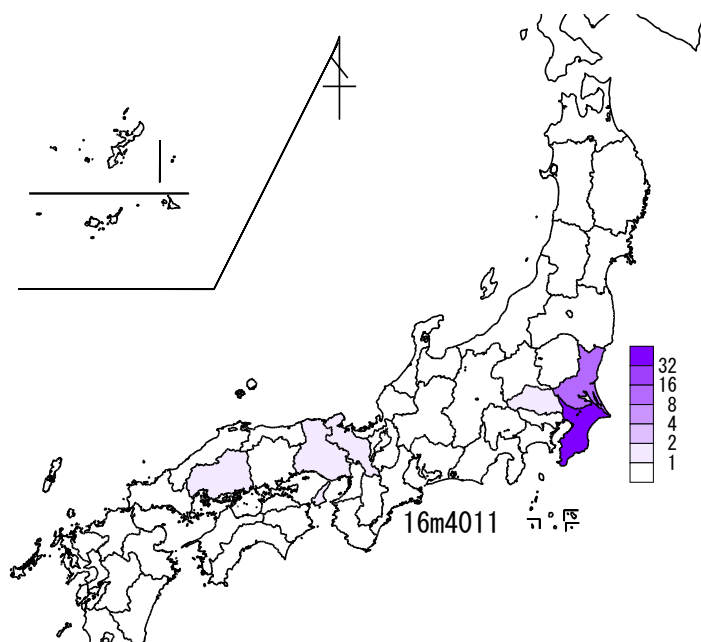
a) 0157 VT1+VT2 18m0541 (22株、13機関)



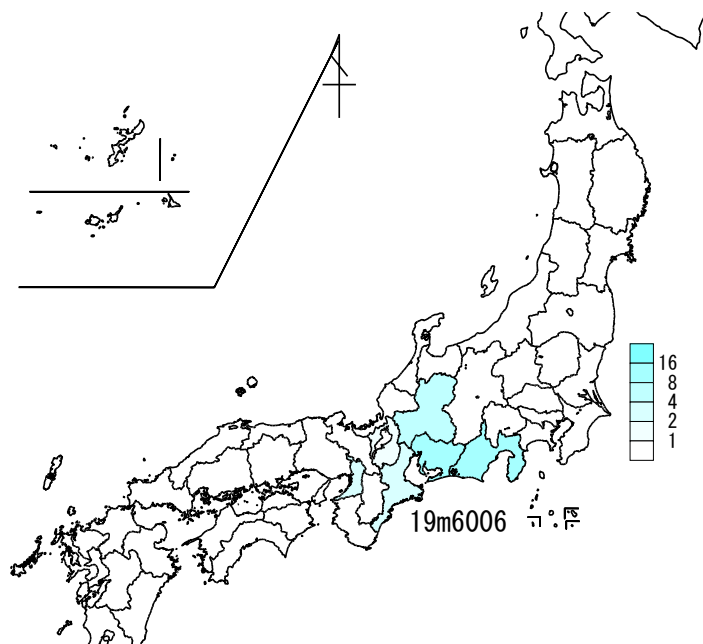
b) 026 VT 19c201 (47 株、7 機関)



c) 0103 VT1 16m4011 (59 株、7 機関)



d) 0145 VT2 19m6006 (35 株、12 機関)



e) 0157 VT2 19c058 (60 株、27 機関)

