

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）
 令和元年度 分担研究報告書
 中四国ブロックにおける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

研究分担者	狩屋 英明	岡山県環境保健センター
研究協力者	山根 拓也	鳥取県衛生環境研究所
	小谷 麻祐子	島根県保健環境科学研究所
	三瀬 博也	岡山市保健所衛生検査センター
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	青田 達明	広島市衛生研究所
	山木戸 聡	〃
	佐藤 香緒里	〃
	栗林 智早	〃
	山本 美和子	〃
	坂本 綾	〃
	上田 久仁子	〃
	尾羽根 紀子	山口県環境保健センター
	佐藤 豪	徳島県立保健製薬環境センター
	関 和美	香川県環境保健研究センター
	木村 千鶴子	愛媛県立衛生環境研究所
	阿部 祐樹	〃
	尾崎 早矢香	高知県衛生環境研究所
	河合 央博	岡山県環境保健センター
	森本 晃司	〃
	仲 敦史	〃
	中嶋 洋	〃

研究要旨

食品由来感染症の広域事例発生時には、症例間の関連性を明らかにするため、各症例由来株の分子疫学解析結果等を各自治体が共有し、病原体分離株の比較・解析を行うことが有用である。地方衛生研究所(地衛研)が実施した分子疫学解析結果を用いて各自治体保健衛生部局が適正に解析等を行うには、地衛研における病原体分離株の分子疫学解析手法の技術維持や解析精度・解析能力の向上による精度管理体制の強化が不可欠であり、また、重要となる。そこで、中四国ブロック内の施設を対象に、腸管出血性大腸菌(EHEC)0157 菌株を用いた IS-printing System、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)及びmultiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA法)による精度管理を実施した。その結果、一部の施設を除いて、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では技術の習熟、改善及び工夫が必要と思われた。また、MLVA法については、現状、MLVA法を導入している地衛研は少ないが、MLVA法を導入する地方衛生研究所が増加傾向にあり、更に全国的な普及が予想されることから、MLVA法を導入する施設に対して、技術研修及び本研究成果に基づくMLVA法導入に係る技術的支援及び導入後の継続的な精度管理の実施が、中四国ブロックにおける検査精度管理体制の強化のためにも必要と考えられた。

令和元年度に中四国ブロックで発生した EHEC による感染事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し、食品保健総合情報処理システム (NESFD) の全国の MLVA 情報も参考としながら比較調査した結果、同一の MLVA 型や同一の IS コードの EHEC 菌株による感染事例が複数の自治体で確認されたが、全国的に有症者が発生した焼肉チェーン店が原因施設として疑われる O157VT2 による集団発生を除いて、中四国ブロック内では同一汚染源による広域的な腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかった。

本研究により、菌株解析をおこなう中四国ブロックの地衛研の技術向上が図られたものとする。更には、EHEC 分子疫学解析手法の精度管理実施により、IS-printing System、PFGE 法、MLVA 法によるサーベイランス技術水準の向上に貢献したものとする。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域的な事例が発生した場合、事例や症例間の関連性を明らかにするためには、分離株の分子疫学解析結果の比較・解析が有用であり、適切に解析を行うには、検査技術の維持と解析能力・解析精度の向上が不可欠かつ重要である。このため、中四国ブロックで各種解析手法の精度管理を実施した。平成 30 年度に引き続き令和元年度も IS-printing System (以下、IS-PS と言う)、パルスフィールドゲル電気泳動法 (以下、PFGE 法と言う)、multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (以下、MLVA 法と言う) について、腸管出血性大腸菌 (以下、EHEC と言う) O157 株を用いた精度管理を実施するとともに、検査手法の問題点や改善点の洗い出しなどを行うことにより解析技術の問題点等を考察した。また、ブロック内での EHEC 発生事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し、NESFD の全国の MLVA 情報も参考としながら、関連性や流行株等を調査し考察した。

B. 研究方法

1. 使用菌株 (表 1)

精度管理：ヒト患者由来 EHEC O157 菌株番号 1, 2, 3, 4 の計 4 株を使用した。

EHEC 感染事例調査：NESFD の全国の MLVA 情報と平成 31 年 4 月から令和 2 年 1 月までに中四国の地衛研で実施した IS-PS、PFGE の結果を含む疫学情報を収集

し、比較調査を行った。

2. 分子疫学解析法及び精度管理

(1) IS-PS

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

(2) PFGE 法

PFGE 法は感染研ニュープロトコール (詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた) に従って実施し、画像解析ソフト (BioNumerics) を使用して泳動像の解析を行った。

(3) MLVA 法及び型別

MLVA 法は、実施可能な 9 施設で、それぞれの施設のプロトコールにより実施した。また、MLVA 型別は、すべての施設が菌株を国立感染症研究所に送付して、実施した。

(4) 精度管理

令和元年度は 10 施設 ((A) ~ (K), (D) を除く) が参加し、精度管理用の EHEC 菌株 4 株 (表 1) を各施設に送付して、解析を行った。IS-PS は 9 施設 ((B) ~ (K), (D) を除く)、PFGE 法は 8 施設 ((C) ~ (K), (D) を除く)、MLVA 法は 9 施設 ((A) ~ (K),

(D)及び(K)を除く)で実施した。IS-PSは、各 primer set の増幅産物の有無から作成した IS コード及び泳動像を、PFGE法は、泳動像と解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを回収し、解析した。また、MLVA法は17遺伝子座のリピート数を比較解析した。

3. 疫学情報の収集と調査

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 法による解析結果又は PFGE 結果を疫学情報とともに収集し、NESFD の全国の MLVA 情報も参考として比較・調査した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) IS-PS による解析

IS-PS の精度管理は、9 施設が参加して実施した。各施設の IS コードによる解析結果は表 2 に、泳動像は図 1 に示した。泳動像はいずれの施設もバンドが認識でき、概ね良好であった。IS コードは多くの施設が一致したが、1 施設 (H) では 1st set primer の IS コードが他施設とは異なった。これは、菌株 3 の「1-03」の判定に違いが見られたことによるものであった。

(2) PFGE 法による解析

PFGE 法の精度管理は、8 施設が参加して実施し、参加した全施設でデンドログラム解析を実施した。各施設の泳動像とデンドログラム解析結果は、図 2 に示し、結果をまとめたものを表 3 に示した。泳動像は、鮮明さ (解像度) 等の影響もあるが、ほとんどの施設はおおむね良好な泳動像が得られた。一部の施設でバンドが薄くなり判定が困難と思われる場合もあったが、バンドパターンを目視により確認し、比較したところ、他施設のものとも一致していた。

また、デンドログラム解析では、類似度の最大値は 100%、最小値は 65% であった。菌株 1 と 4 の類似度は、施設 (K) を除いて 100% 一致していた。菌株 2 と 3 で類似度の順序が施設により異なっていた。

(3) MLVA 法による解析

MLVA 法は 9 施設で実施した。9 施設全て 0157 株の 17 か所の遺伝子座についてリピート数を解析した。その結果を、表 4 に示した。施設 H では各菌株の遺伝子座 0157-3、0157-34 0157-9、0157-25、0157-17、0157-36、0157-37 を共通とする複数の遺伝子座で他施設とは異なる結果となった。施設 I では菌株 1 と 4 の遺伝子座 EH111-11T でリピート数が判明していなかった。

2. EHEC 感染事例の疫学情報の収集と調査結果

NESFD の全国の MLVA 情報と中四国の地衛研で実施した IS-PS、PFGE、MLVA 法の結果を含む疫学情報を収集し、比較調査を行った。

その結果 (中四国の状況を表 5、表 6、表 7、図 3、表 8、表 9 に示す)、中四国ブロック内では同一汚染源による広域的な腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかったものの、同一の MLVA 型及び同一の MLVAcomplex の株が、中四国ブロック内の複数の自治体で検出される事例も見られた。また、全国的に有症者が発生した焼肉チェーン店が原因施設として疑われる 0157VT2 : 「19m0506、19m0508、19m0487、19c058」(MLVA 型、MLVAcomplex の順) による集団発生に関連した患者株も中四国ブロック内に見られた。また、同一 IS コードだが MLVA 型が違う事例、同一 MLVA 型だが IS コードが違う事例、IS コードは異なるが同じ MLVAcomplex の事例も見られた。また、同じ MLVA 型であっても PFGE のデンドログラム解析でわずかに異なる例も見られた。

D. 考察

令和元年度に実施した IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による EHEC 0157 株を用いた精度管理では、一部の施設を除いて、多くの施設で解析結果は良好であった。一部の施設では他施設と異なる結果となり、技術の習熟、改善及び工夫が必要と思われた。更に、中四国ブロック全体では解析技術や解析精度の維持、向上が継続的に必要であると思われた。IS-PS では、IS

コードは多くの施設が一致したが、1施設(H)では1st set primerのISコードが他施設とは異なった。これは、菌株3の「1-03」の判定に違いが見られたことによるものであった。この要因は、バンド位置の確認ミス等の原因が考えられた。正規のバンドかどうかの判定が困難な場合は、必要に応じて再検査の実施や泳動距離が長いゲルを使用する等の工夫をしてバンドの位置確認を正確に行う必要がある。

PFGE法はほとんどの施設でおおむね良好な泳動像が得られたが、部分的にバンドが薄くなり判定が困難と思われる施設もあった。PFGE法はバンドの位置が解析結果に影響するため、明瞭なバンドが出現するよう、菌液濃度の調整やゲルブロックの操作手技等の継続的な技術習熟が必要と思われた。

MLVA法について、施設Hでは菌株1~4の遺伝子座0157-3、0157-34、0157-9、0157-25、0157-17、0157-36、0157-37が他施設とは異なる結果であった。これは、Binの不適切な設定(Binセットのずれ)によるものと考えられた。施設Iでは菌株1と4の遺伝子座EH111-11Tでリピート数が判明していなかった。これもBinの不適切な設定等によるものと推察された。Binの見直しや設定は適宜行い、適切に解析できる体制を維持・整備しておくことが必要と考えられた。

全国的なMLVA法の導入に係る通知に基づいて、各地衛研でも導入を進めているが、導入に関して十分な研修、準備が必要であり、今後の導入に当たっては技術的支援や、導入後の精度管理の重要性が示された。

中四国ブロックで本年度発生した事例における患者等由来株のIS-PSやMLVA法による解析結果又はPFGE結果を疫学情報とともに収集し、また、NESFDの全国のMLVA情報も参考として比較調査を行った。その結果、同一のMLVA型及びMLVAcomplexの株が、中四国ブロック内の複数の自治体で検出される事例も見られた。しかし、中四国ブロック内では共通

の汚染源による広域的な腸管出血性大腸菌食中毒の発生はないものと考えられた。

ISコードが同じであってもMLVA型が異なる事例やISコードが異なってもMLVA型が同じ事例、ISコードは異なるが同じMLVAcomplexの事例もあった。これはIS-PS法の鑑別能がMLVAよりも劣ることによるものと考えられる。以上のことから、集団事例の探知や感染源の特定のためには、これらの手法による病原体の解析のみでは結論を出すには十分と言えず、患者等の喫食調査・行動調査等の疫学調査結果も十分検討した総合的判断が重要と思われた。

E. 結論

1. 腸管出血性大腸菌0157株を用いて、IS-PS、PFGE法及びMLVA法による精度管理を実施した。IS-PS、PFGE法では、ほとんどの施設では概ね良好な結果が得られたが、MLVA法では一部の施設で結果が大きく異なった。

2. MLVA法は、結果が他施設と大きく異なる施設があり、MLVA法導入に関して十分な研修、準備の必要性が認められた。

また、Binの見直しや設定を適宜行うこと等により検査精度の維持・向上が必要と思われた。

3. IS-PSでは、バンド位置の確認ミスが見られた。また、PFGE法では、バンドが薄かった施設があった。いずれの方法でも、鮮明な泳動像が得られ、正確に判定できるよう継続的な検査技術の習熟や工夫が必要である。

4. 集団事例の探知やその感染源の特定のためには、病原体のゲノム解析のみならず、患者等の喫食調査・行動調査等の疫学調査結果も十分検討した総合的判断が重要と思われた。

F. 研究発表

なし。

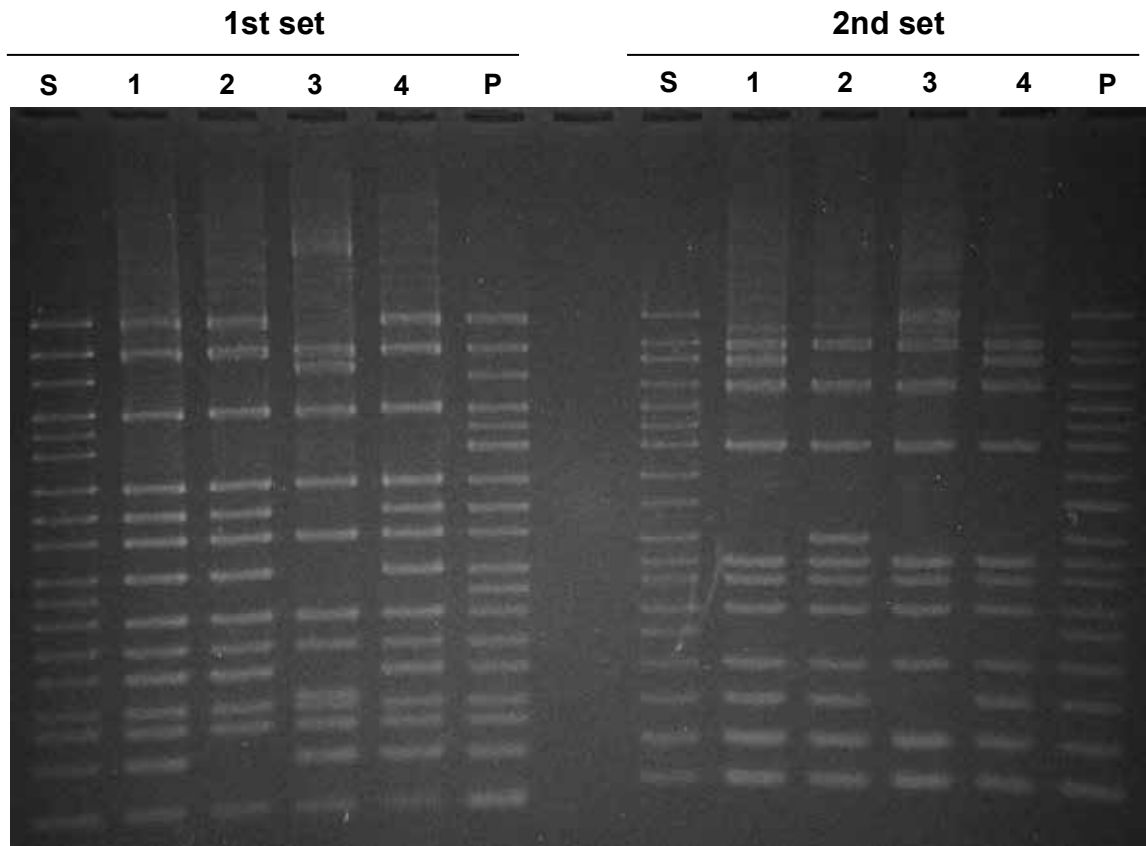
表 1 精度管理使用 EHEC 菌株

菌株 No.	血 清 型			由来
	O群	H型	STx型	
1	O157	7	1,2	2019 患者
2	O157	7	1,2	2019 患者
3	O157	-	1,2	2019 患者
4	O157	7	1,2	2019 患者

表 2 IS-PS による解析結果

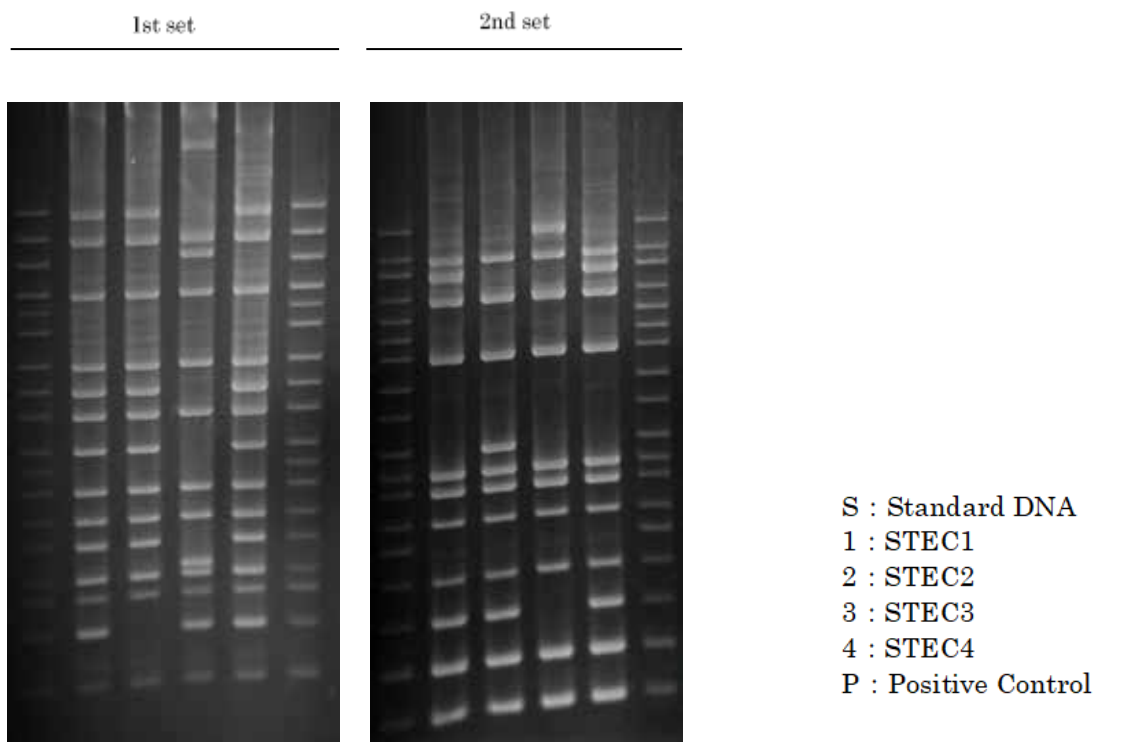
施設名	菌株1		菌株2		菌株3		菌株4	
	1st Primer set	2nd Primer set	1st Primer set	2nd Primer set	1st Primer set	2nd Primer set	1st Primer set	2nd Primer set
A	-	-	-	-	-	-	-	-
B	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657
C	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657
D	-	-	-	-	-	-	-	-
E	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657
F	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657
G	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657
H	317577	611657	317575	211757	615457	311656	317577	611657
I	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657
J	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657
K	317577	611657	317575	211757	215457	311656	317577	611657

(E)



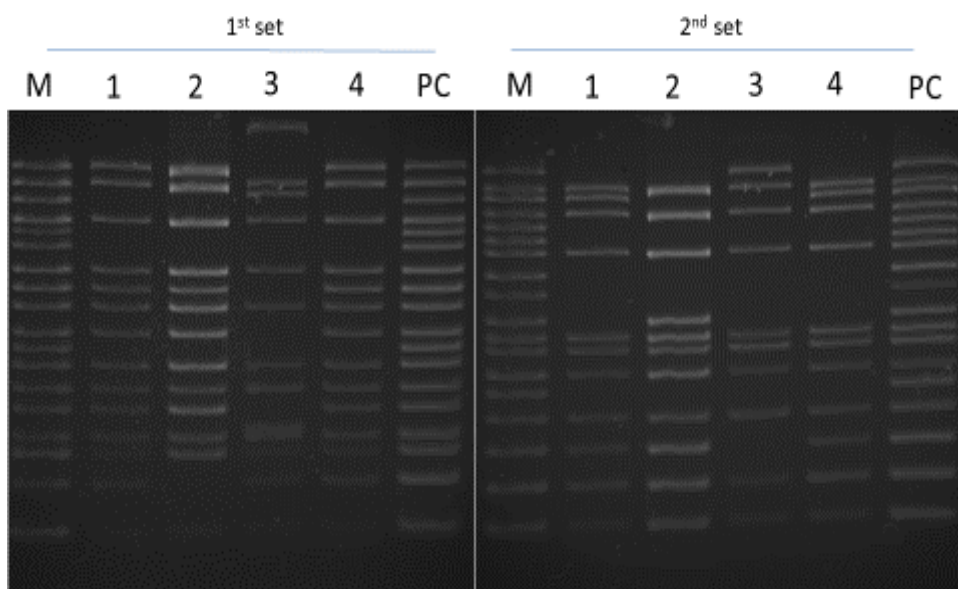
S : Standard DNA
1 : STEC1
2 : STEC2
3 : STEC3
4 : STEC4
P : PCR Template DNA

(F)



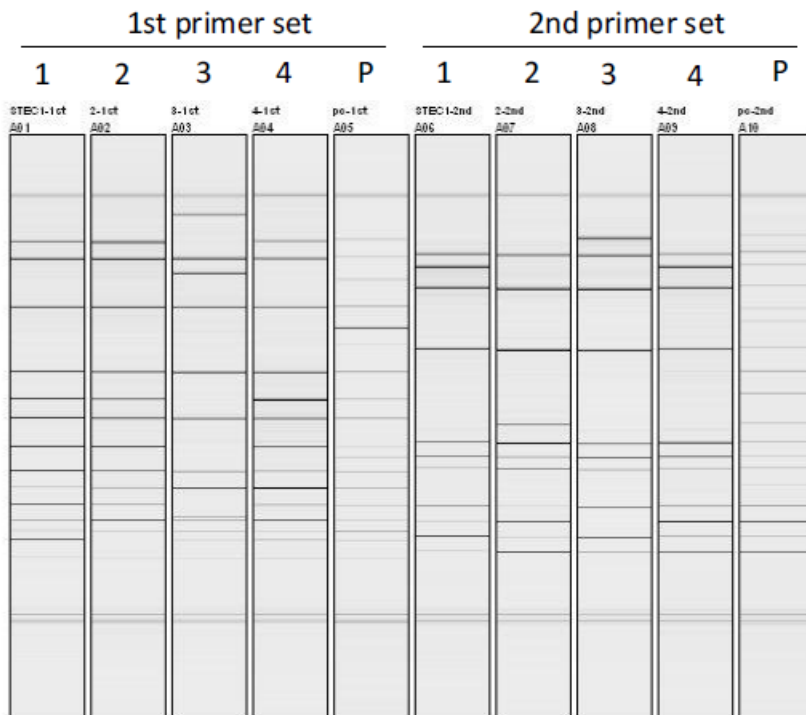
(G)

O157 IS-printing



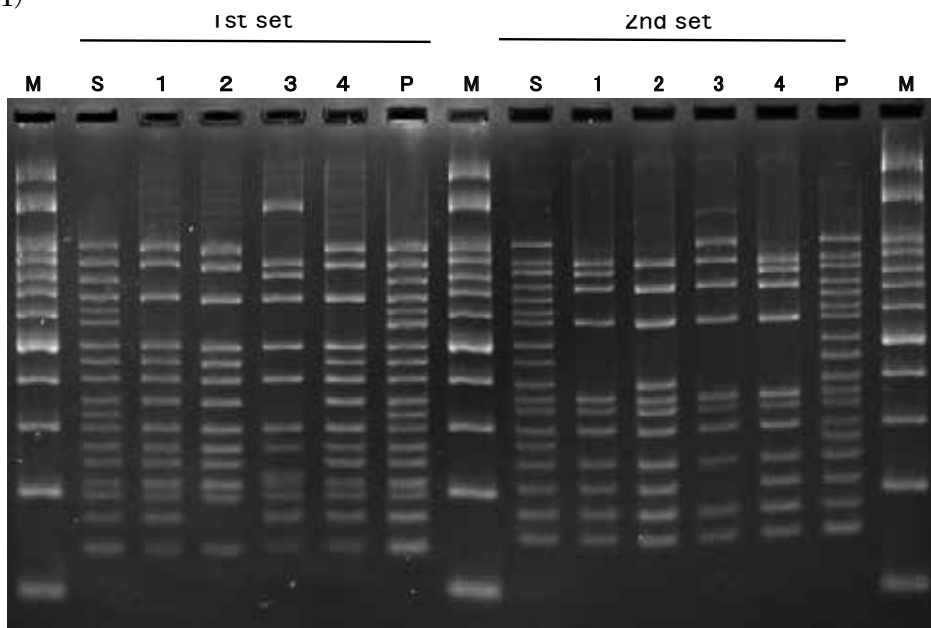
H31 外部精度管理

(H)



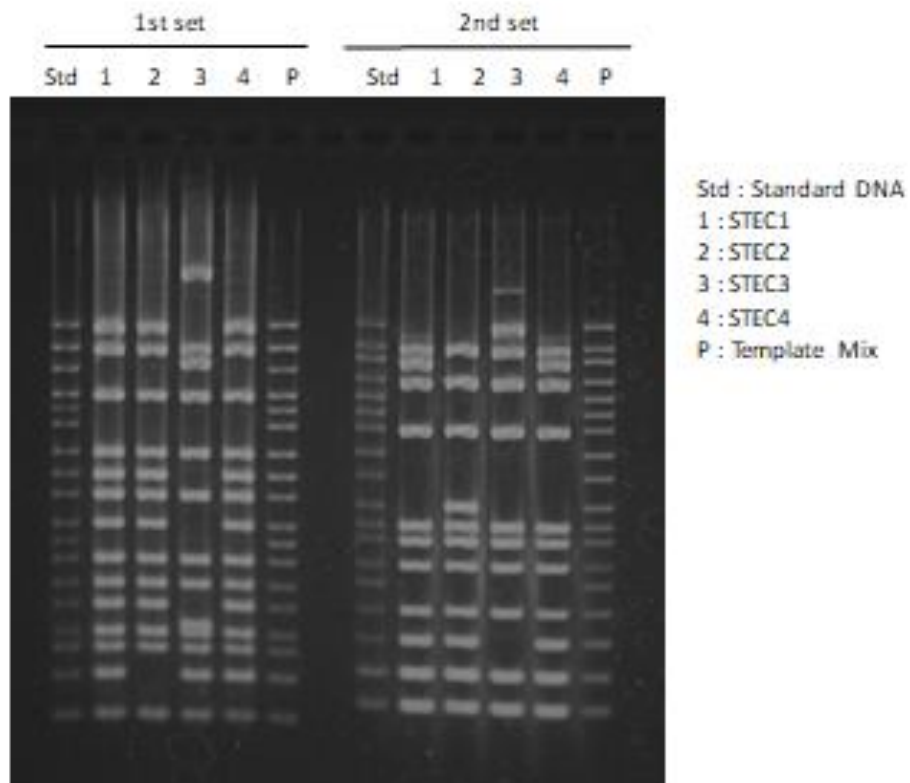
1 : STEC 1
2 : STEC 2
3 : STEC 3
4 : STEC 4
P : Positive control

(I)

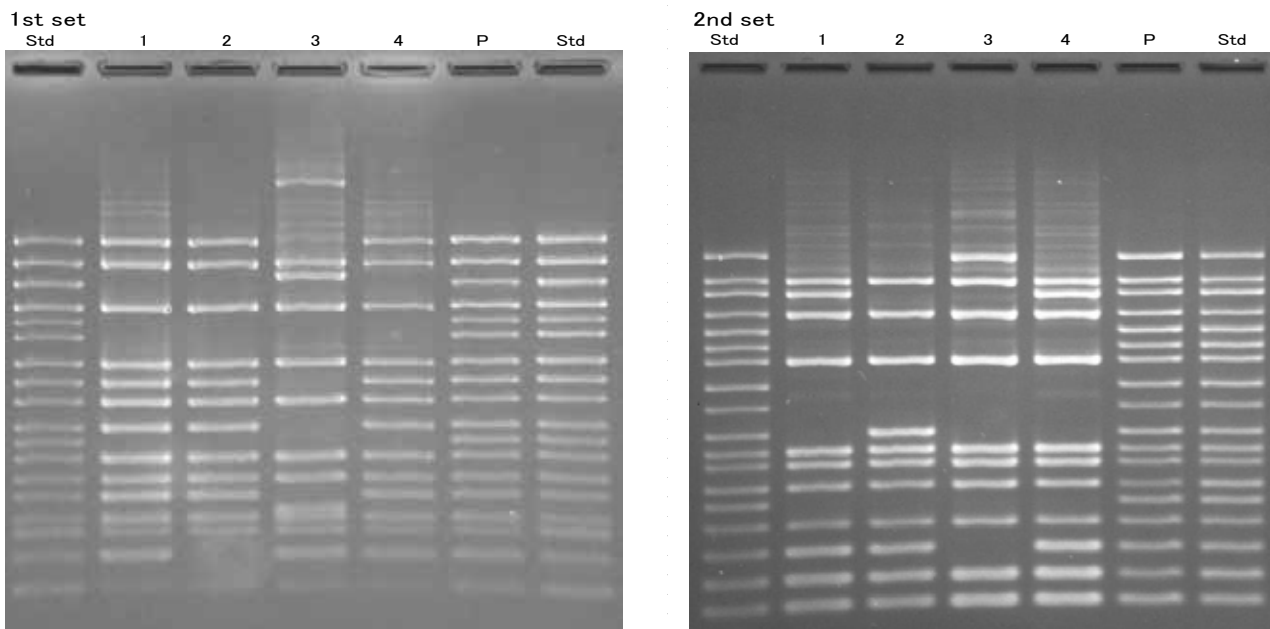


M: Marker
S: Standard DNA
P: Positive control
1: STEC 1
2: STEC 2
3: STEC 3
4: STEC 4

(J)



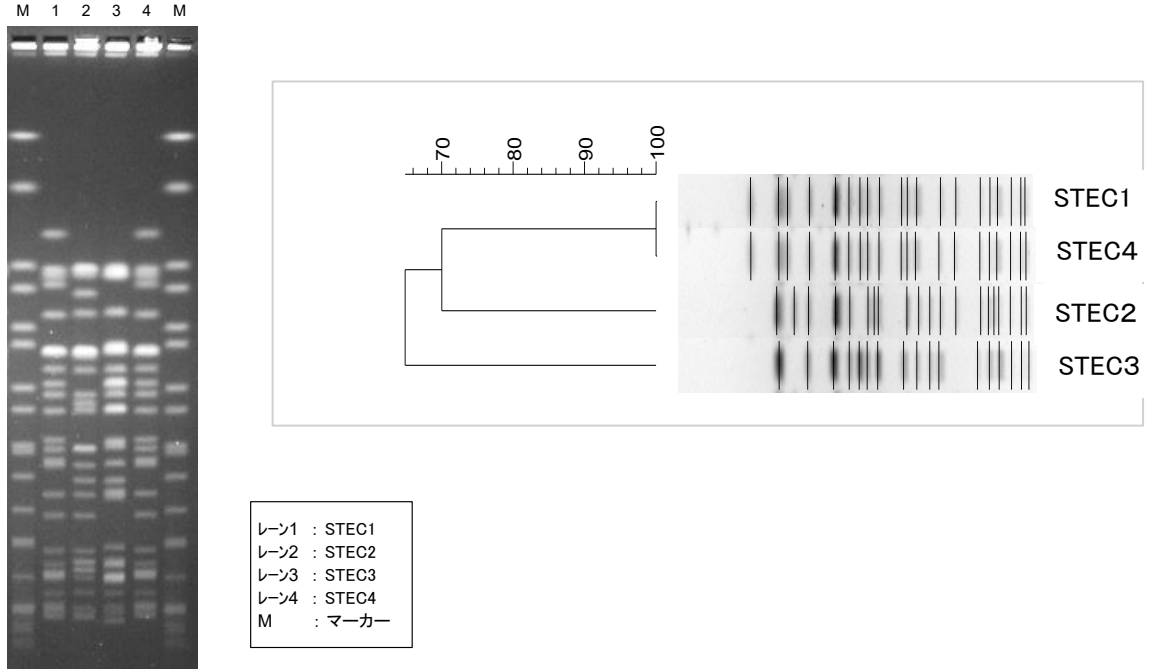
(K)



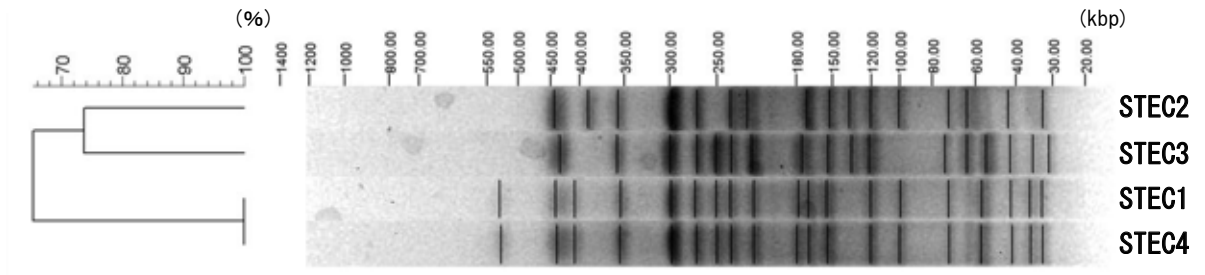
Std :Standard DNA
1 :STEC1
2 :STEC2
3 :STEC3
4 :STEC4
P :Positive control

図 2 PFGE 法による泳動像とデンドログラム解析結果

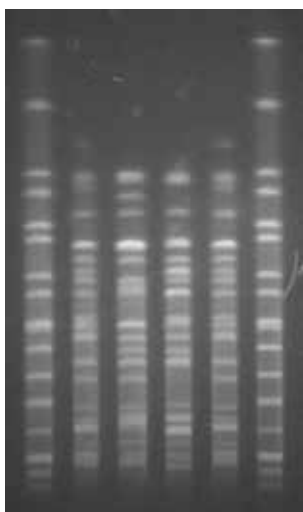
(C)



(E)



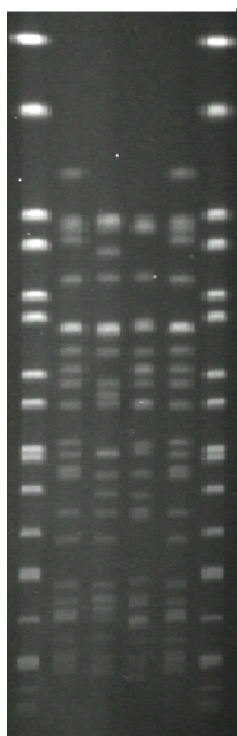
M 1 2 3 4 M



レーン 1 : STEC1
 2 : STEC2
 3 : STEC3
 4 : STEC4
 M : マーカー
 (*Salmonella* Braenderup H9812 株)

(F)

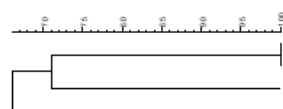
M 1 2 3 4 M



1 : STEC1 19019
 2 : STEC2 19020
 3 : STEC3 19021
 4 : STEC4 19022
 M : Marker (*S. Braenderup*)

PFGE-XbaI

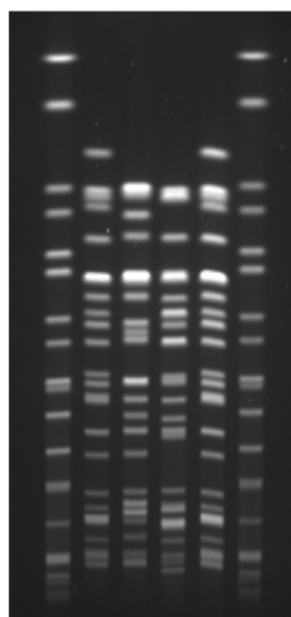
PFGE-XbaI



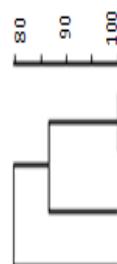
(G)

PFGE(Xba1)

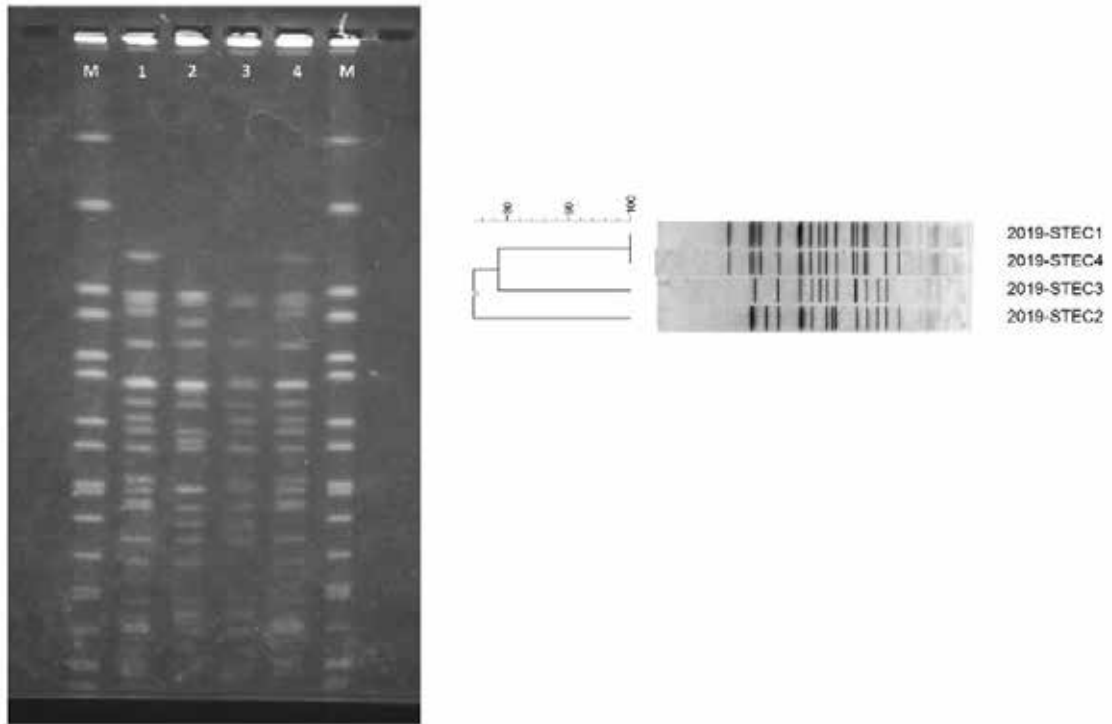
M 1 2 3 4 M



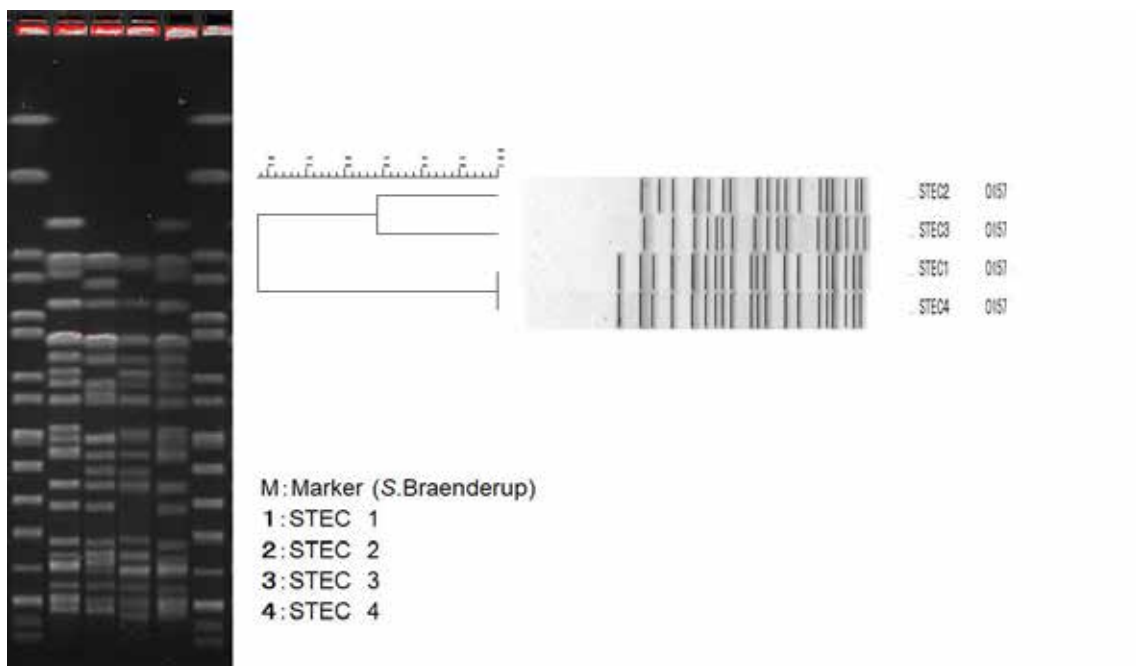
デンドログラム(UPGMA法、係数;Dice)



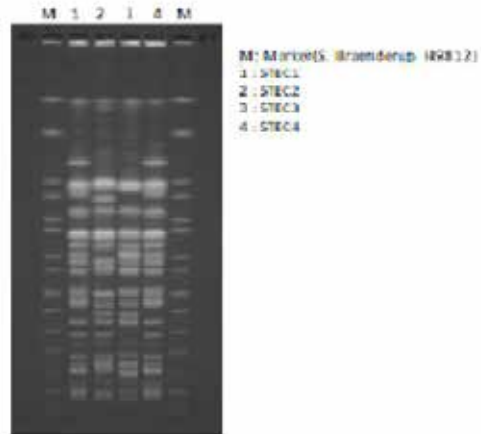
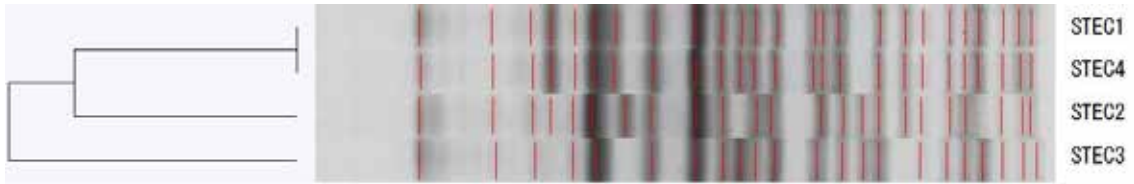
(H)



(I)



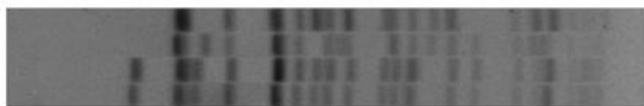
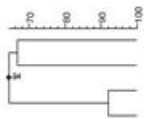
(J)



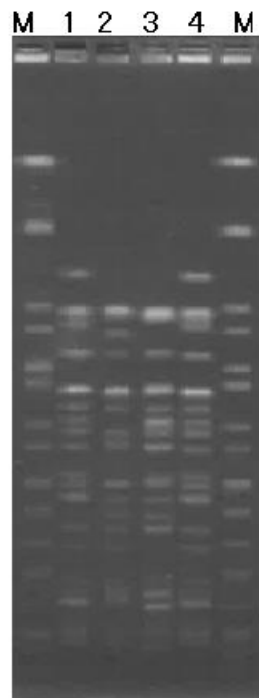
(K)

PFGE-XbaI

PFGE-XbaI



STEC3 2019-11-20 14:35:34
STEC2 2019-11-20 14:35:25
STEC4 2019-11-20 14:35:54
STEC1 2019-11-20 14:35:09



M: Marker(*S. Braenderup* H9812)
1: STEC1
2: STEC2
3: STEC3
4: STEC4

表3 PFGE法によりデンドログラム解析結果

施設名	デンドログラム解析結果
(A)	PFGE実施せず
(B)	PFGE実施せず
(C)	菌株1=菌株4－菌株2⇒>菌株3(100－65%)
(D)	PFGE実施せず
(E)	菌株1=菌株4⇒>菌株2－菌株3(100－65%)
(F)	菌株1=菌株4－菌株3⇒>菌株2(100－66%)
(G)	菌株1=菌株4－菌株3⇒>菌株2(100－80%)
(H)	菌株1=菌株4－菌株3⇒>菌株2(100－75%)
(I)	菌株1=菌株4⇒>菌株3－菌株2(100－69%)
(J)	菌株1=菌株4－菌株2⇒>菌株3
(K)	菌株1－菌株4⇒>菌株2－菌株3(92－65%)

= : 左右の菌株で100%一致

－: 左右の菌株でグループ形成

⇒>: 矢印の方向へ類似度が低くなる

表 4 MLVA 法による解析結果

菌株	施設名													遺 伝 子 座												
	EH111-11T	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									
1	A	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	B	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	C	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	E	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	F	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	G	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	H	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	9	10	11	6	6	6	1	6									
	I	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	J	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
	2	A	2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6								
B		2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6									
C		2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6									
E		2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6									
F		2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6									
G		2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6									
H		2	-2	1	4	-2	7	4	14	9	10	10	4	5	6	6	5									
I		2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6									
J		2	-2	1	4	-2	7	4	15	10	12	12	5	6	6	8	6									
3		A	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6								
	B	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6									
	C	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6									
	E	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6									
	F	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6									
	G	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6									
	H	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	21	8	8	1	10	6	2	5									
	I	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6									
	J	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	22	10	10	2	11	6	4	6									
	4	A	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7								
B		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
C		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
E		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
F		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
G		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
H		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	9	10	11	6	6	1	6										
I		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									
J		3	-2	1	4	-2	5	4	-2	10	12	13	7	7	6	3	7									

表5
施設F

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)	感染研 PF-GE型	感染研 MLVA型	感染研 MLVA complex	備考(疫学的関連など)
F	19005	4	26	11	1				19m2013		
F	19006	6	103	2	1				19m4010		
F	19007	7	103	2	1				19m4014		家族内事例、菌株No.19008の夫
F	19008	7	103	2	1				19m4014		家族内事例(妻)
F	19009	8	121	19	2				19m5016		
F	19011	9	103	2	1				19m4023		家族内事例(妹)
F	19013	9	103	2	1				19m4023		家族内事例、菌株No.19011の兄
F	19014	9	157	7	2	305457	211642		19m0301		
F	19015	9	26	11	1				19m2121		
F	19017	9	111	8	1				19m3055		
F	19018	10	157	7	1-2	214457	311656		19m0133	19c016	家族内事例
F	19023	10	157	7	1-2	214457	311656		19m0133	19c016	家族内事例、菌株No.19018の母
F	19024	10	157	7	2	305457	211242		19m0046	19c010	
F	19025	10	157	7	1-2	717557	611657		16m0399	19c030	
F	19026	10	157	7	2	002057	214442		19m0409		
F	19027	10	157	7	1-2	717557	611657		19m0466		
F	19032	12	OUT	HNM	2						
F	19034	12	157	7	2	305457	211242		19m0046	19c010	
F	20001	1	157	7	2	305457	211242		19m0046	19c010	家族内事例(子)
F	20002	1	157	7	2	305457	211242		19m0046	19c010	家族内事例、菌株No.20001の父
F	20003	1	157	7	2	305457	211242		19m0046	19c010	家族内事例、菌株No.20001の母

表6
施設G

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)	感染研 PFGE型	感染研 MLVA型	感染研 MLVA complex	備考(疫学的関連など)
G	19Y01	4月	0g103	Hg11	1				19m4002		発症2日前もつ鍋、8日前焼き鳥バーベキュー
G	19Y02	5月	0157	H7	1+2	717577	611657		19m0051	19c053	発症1日前外食(ハンバーグ)、3日前焼肉(ホルモン等)
G	19Y03	5月	0157	H7	1+2	717577	611657		19m0054		発症1日前焼肉(自宅)
G	19Y04	5月	0157	Hg7	1+2	717577	611657		19m0051	19c053	調理従事者による検便検査による検出。採便日(5/7)2日前に友人連ともつ鍋等喫食
G	19Y05	5月	026	Hg11	1				19m2031		姉妹。発症前に焼き肉店で喫食。
G	19Y06	5月	026	Hg11	1				19m2031		
G	19Y07	6月	026	Hg11	2				19m2038		散発。発症3日前に食堂でから揚げ、4日前に焼肉バイキング、祭りだから揚げ、焼き鳥を喫食。
G	19Y08	7月	0157	Hg7	1+2	301457	307447		19m0040		
G	19Y09	7月	026	Hg11	1				15m2113		
G	19Y10	7月	026	Hg11	1				15m2113		19Y09～11家族(発症前に焼き肉喫食歴あり)
G	19Y11	8月	026	Hg11	1				15m2113		
G	19Y12	8月	0157	Hg7	1+2	717577	611657		19m0054		発症4日前ホルモン喫食
G	19Y13	9月	0157	Hg7	1+2	215657	311656		19m0317		Y市の患者(co192608)とS市で一緒に喫食したとのこと。
G	19Y14	10月	0157	Hg7	1+2	717577	611657		19m0454	19c053p	コンビ二等のから揚げを喫食のみ

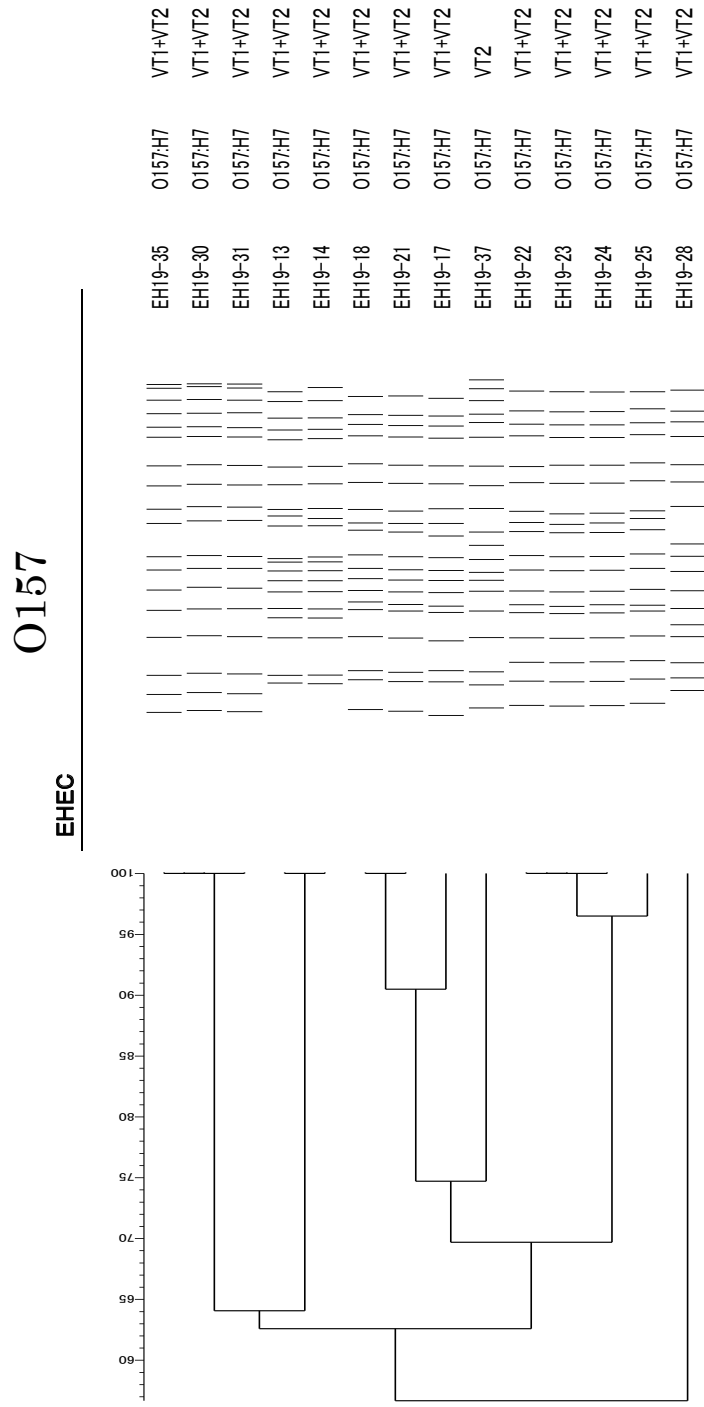
表 7
施設 H

菌株No	発生日	分類	年代	O型	H型	VT型	ISコード(1st)	ISコード(2nd)	感染研MLVA型	備考
1	2019年6月	患者	5-10歳代	O157	H7	VT1,2	317577	611657	19m0112(19c044)	
2	2019年6月	患者	70歳代	O157	H7	VT1,2	517555	601657	18m0331	
3	2019年7月	患者	10歳代	O157	H7	VT1,2	717557	611657	19m0149(19c030)	家族①
4	2019年7月	患者	20歳代	O157	H7	VT1,2	717552	611603	19m0149(19c030)	
5	2019年7月	患者	10歳代	O157	H21	VT1,2	717557	611657	19m0149(19c030)	家族①
6	2019年7月	患者	40歳代	O26	H11	VT1			18m2064	
7	2019年7月	患者	50歳代	O157	H7	VT1,2	717557	611657	19m0149(19c030)	
8	2019年9月	患者	20歳代	O157	H-	VT2	002057	214442	19m0392	
9	2019年10月	患者	20歳代	O157	H7	VT1,2	717557	611657	19m0460	家族②
10	2019年10月	接触者	10歳代	O157	H-	VT2	002057	214442	17m0435(19c025)	菌株No.8(患者)の友人
11	2019年10月	接触者	60歳代	O157	H7	VT1,2	717557	611657	19m0460	家族②
12	2019年10月	患者	70歳代	O157	H7	VT1,2			19m0516(19c061)	
13	2019年10月	患者	80歳代	O157	H7	VT1,2			19m0530(19c061)	

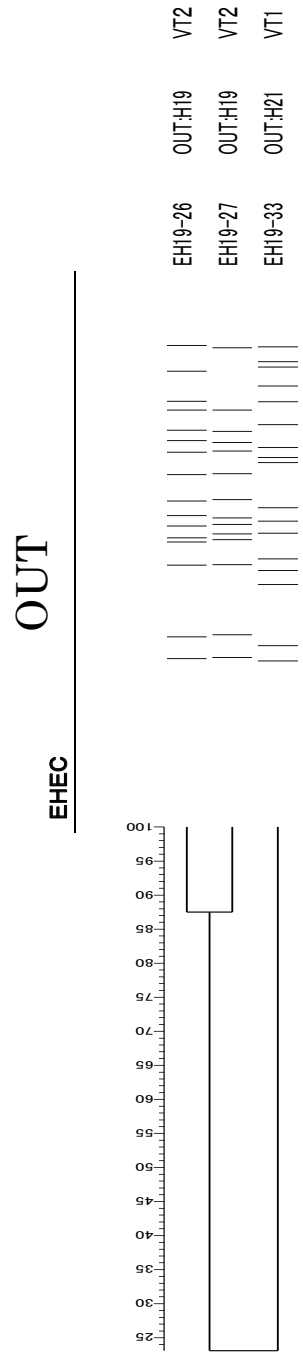
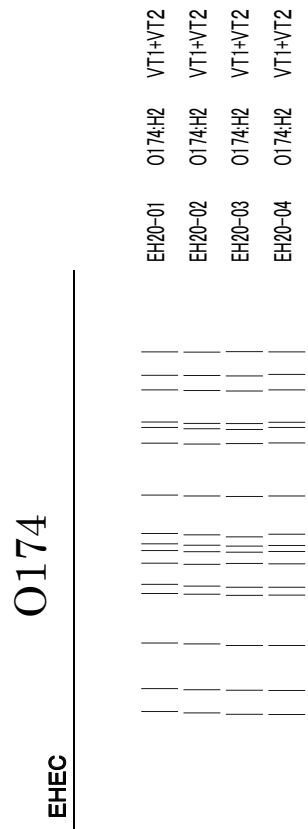
菌株 No.12 以降は IS - Printing は行っておらず。

図 3

PFGE 解析結果 (施設 I)



PFGE 解析結果 (施設 I)



PFGE 解析結果 (施設 I)

EHEC 全体

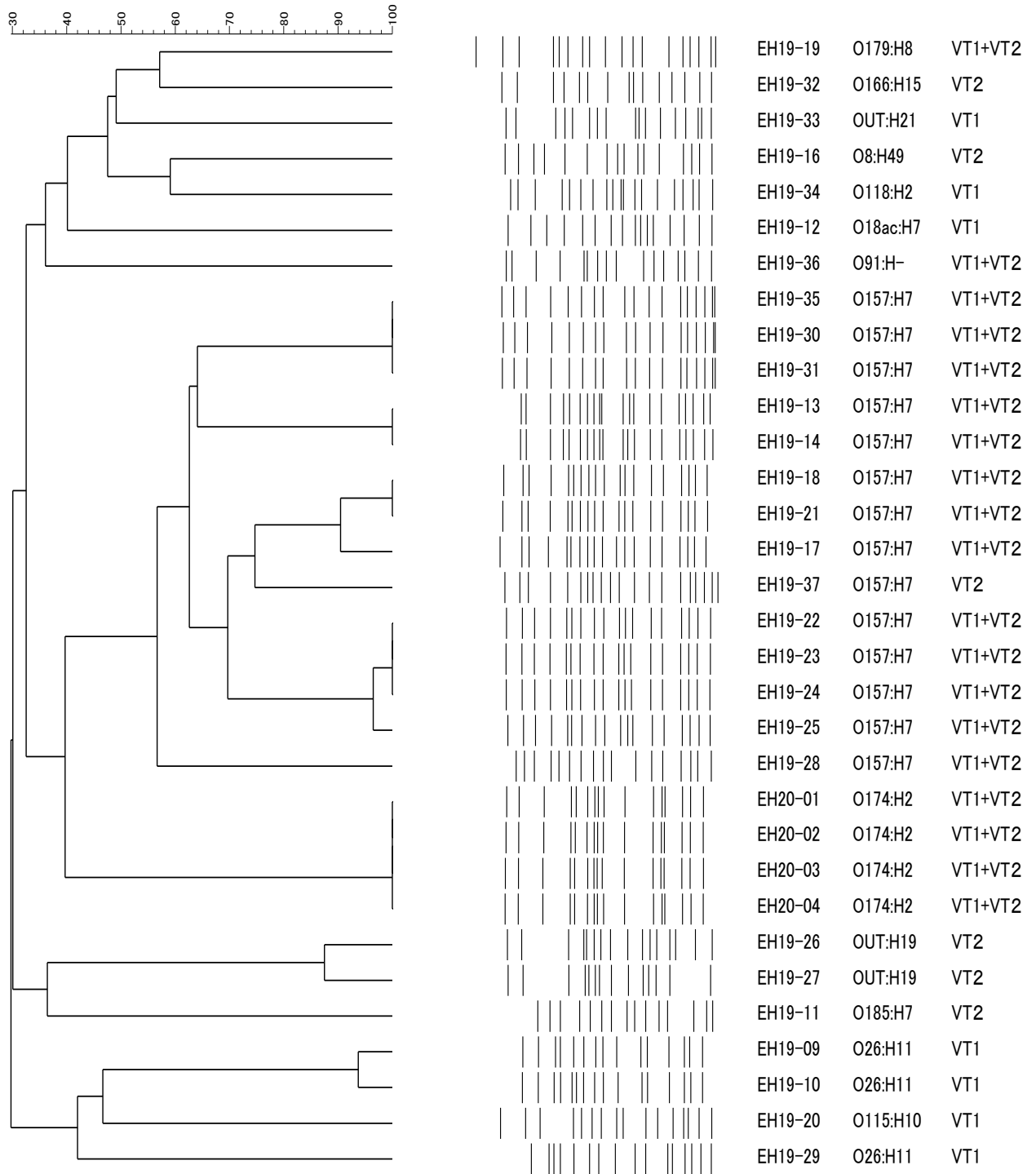


表 8

施設 I

中四国ブロック患者由来STEC株 (2019年度)

県名	菌株番号	発生日	O血清群	H型	VT型	ISコード (1st)	ISコード (2nd)	感染研 PFGE型	感染研 MLVA型	感染研 MLVA complex	備考 (疫学的関連など)
I	EH190009	5月	26	11	1				19m2023		患者 (EH190009、10は親子)
I	EH190010	5月	26	11	1				19m2023		保菌者 (EH190009、10は親子)
I	EH190011	4月	185	7	2						保菌者
I	EH190012	5月	18ac	7	1						保菌者
I	EH190013	6月	157	7	1, 2	317577	211757		19m0103		患者 (EH190013、14は親子)
I	EH190014	6月	157	7	1, 2	317577	211757		19m0103		患者 (EH190013、14は親子)
I	EH190016	6月	8	49	2						保菌者
I	EH190017	7月	157	7	1, 2	717577	611657		19m0117	19c014	患者
I	EH190018	6月	157	7	1, 2	617557	611657		19m0118	19c014	患者
I	EH190019	6月	179	8	1, 2						保菌者
I	EH190020	6月	115	10	1						保菌者
I	EH190021	7月	157	7	1, 2	617557	611657		19m0118	19c014	患者
I	EH190022	8月	157	7	1, 2	717557	611657		19m0341		患者 (EH190022、24は家族)
I	EH190023	8月	157	7	1, 2	717557	611657		19m0341		患者
I	EH190024	8月	157	7	1, 2	717557	611657		19m0341		保菌者 (EH190022、24は家族)
I	EH190025	8月	157	7	1, 2	717557	611657		19m0341		患者
I	EH190026	8月	UT	19	2						保菌者 (EH190026、27は親子)
I	EH190027	8月	UT	19	2			similar to EH190026			保菌者 (EH190026、27は親子)
I	EH190028	8月	157	7	1, 2	114055	303477		19m0342	19c040	患者
I	EH190029	9月	26	11	1				19m2123		患者
I	EH190030	9月	157	7	1, 2	317155	211757		19m0369		患者 (EH190030、31は親子)
I	EH190031	9月	157	7	1, 2	317155	211757		19m0369		保菌者 (EH190030、31は親子)
I	EH190032	9月	166	15	2						保菌者
I	EH190033	9月	UT	21	1						保菌者
I	EH190034	10月	118	2	1						患者
I	EH190035	10月	157	7	1, 2	317155	211756		19m0369		患者
I	EH190036	11月	91	14	1, 2				19m8021		保菌者
I	EH190037	12月	157	7	2	114057	203443		16m0385		保菌者
I	EH200001	12月	174	2	1, 2			解析中			保菌者 (EH200001-4は同一施設)
I	EH200002	12月	174	2	1, 2			解析中			保菌者 (EH200001-4は同一施設)
I	EH200003	12月	174	2	1, 2			解析中			保菌者 (EH200001-4は同一施設)
I	EH200004	12月	174	2	1, 2			解析中			保菌者 (EH200001-4は同一施設)

表9

施設 I

中四国ブロック患者由来STEC株 (2019年度)

県名	菌株番号	O血清群	H型	MLVA 遺伝子座																
				EH111-11T	EH111-14BB	EH111-80	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	0157-3W	0157-34Y	0157-9M	0157-25J	0157-17Z	0157-19L	0157-36AA	0157-37V
I	EH190009	26	11	2	1	1	2	3	9	17	2	10	-2	1	11	2	-2	1	-2	5
I	EH190010	26	11	2	1	1	2	3	9	17	2	10	-2	1	11	2	-2	1	-2	5
I	EH190013	157	7	2	-2	1	4	-2	6	4	-2	-2	10	11	11	5	7	6	6	6
I	EH190014	157	7	2	-2	1	4	-2	6	4	-2	-2	10	11	11	5	7	6	6	6
I	EH190017	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	12	7	8	6	3	5
I	EH190018	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	12	7	8	6	3	6
I	EH190021	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	12	7	8	6	3	6
I	EH190022	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	2	-2	8	12	10	8	6	6	3	20
I	EH190023	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	2	-2	8	12	10	8	6	6	3	20
I	EH190024	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	2	-2	8	12	10	8	6	6	3	20
I	EH190025	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	2	-2	8	12	10	8	6	6	3	20
I	EH190028	157	7	2	-2	1	1	-2	4	5	-2	-2	8	9	10	3	4	-1	8	8
I	EH190029	26	11	2	1	1	2	5	7	13	10	12	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
I	EH190030	157	7	2	-2	1	4	-2	6	4	14	9	10	12	-2	5	7	6	7	7
I	EH190031	157	7	2	-2	1	4	-2	6	4	14	9	10	12	-2	5	7	6	7	7
I	EH190035	157	7	2	-2	1	4	-2	6	4	14	9	10	12	-2	5	7	6	7	7
I	EH190037	157	7	2	-2	1	1	-2	7	5	2	-2	7	10	12	3	3	5	7	6

広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学解析(2019 年度)

研究協力者 広島市衛生研究所

青田 達明 山木戸 聡 佐藤 香緒里

栗林 智早 山本 美和子 坂本 綾 上田 久仁子

研究要旨

広島市において 2019 年度に分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 11 株について、分子疫学解析手法である Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法及び mismatch amplification mutation assay (MAMA)-PCR 法によるクレード分類を実施した。解析の結果、疫学的関連性の認められない複数の事例で分離された菌株が同一 MLVA 型となったが、複数の自治体において分離報告がある MLVA 型であることから、広域的な散発事例株であることが示唆された。また、MAMA-PCR 法では、3 事例由来株 6 がクレード 8 と判定され、本市においてクレード 8 に分類される O157:H7 の集積が示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症は、全国で年間 3,000~4,000 件の届出があり、最も多く検出される血清型は O157 である¹⁾。腸管出血性大腸菌感染症の臨床症状には、下痢や血便、溶血性尿毒症症候群(HUS)等あり、無症状から重症状まで様々な症状を呈する。また、O157:H7 のうちクレード 8 に属する株は、患者の HUS 発症率がその他のクレードより高いことが報告されている²⁾。伊豫田らは、クレード 8 特異的遺伝子配列を利用した mismatch amplification mutation assay (MAMA)-PCR 法により、クレード 8 とその他のクレード(クレード 1~7 及び 9)を簡便に分類する PCR 法を報告した³⁾。

本市において 2019 年度に分離された O157:H7 11 株について、国内で統一された分子疫学解析手法である Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法を実施し、MLVA 型により他自治体における分離菌株との比較を迅速に行

った。さらに、クレード分類法の MAMA-PCR 法を実施し、分類結果と MLVA 解析結果、患者疫学情報との関連性について検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2019 年 4 月から 2020 年 1 月に本市で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 11 株を用いた。

2. 方法

(1) 血清型別試験

病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型を決定した。市販の血清型別試験で型別できなかった株については、病原体検出マニュアルの方法⁴⁾により、PCR 法での型別を行った。

(2) MLVA 法

腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブックの方法⁵⁾にもとづき実施し、17 遺伝子座の各リポート数を求めた。解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)

及び Gene Mapper(Applied Biosystems 社)を用いた。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ[®] Size Standard, Ver. 2.0(Applied Biosystems 社)を使用した。得られた 17 遺伝子座のリポート数を国立感染症研究所細菌第一部へ送付し MLVA 型を決定した。

(3) MAMA-PCR 法

伊豫田らの方法³⁾にもとづき実施した。クレード 8 特異的 SNP を検出するプライマー(2357-F3 及び 539A-R)で 222bp の増幅が認められたものをクレード 8 と判定し、その他のクレードを検出するプライマー(2357-F3 及び 539C-R)で 222bp の増幅が認められたものをその他のクレードと判定した。

C. 研究結果

1. 血清型別

供試した 11 株全て O157:H7(うち 3 株は

Hg7)であった。なお、11 株中 3 株は市販血清で H 型別が決定できなかったため、PCR 法により H 遺伝子型を決定した。

2. MLVA 法

各菌株の MLVA 型を表 1 に示した。11 株は 6 種類の MLVA 型に分類された。家族内発生事例由来の菌株番号 2 及び 3 が同一 MLVA 型(19m0133)となった。また、菌株番号 4、8、9、10 及び 11 が同一 MLVA 型(19m0046)となった。

3. MAMA-PCR 法

表 1 に分類結果を示した。菌株番号 1、4、8、9、10 及び 11 がクレード 8 に、菌株番号 2、3、5、6 及び 7 がその他のクレードに分類された。

D. 考察

MLVA 解析の結果、分離株 11 株には 6 種類の MLVA 型が付与された。このうち、複数菌株で同一 MLVA 型となったものは、

表 1 菌株の患者疫学情報及び解析結果

No.	発生月	年齢	症状	入院	毒素型	MLVA 型	クレード
1	9	33	腹痛、水様性下痢、血便、発熱	有	Stx2	19m0301	clade8
2	10	27	腹痛、水様性下痢、嘔吐	無	Stx1+Stx2	19m0133	other clades
3	10	65	無症状	無	Stx1+Stx2	19m0133	other clades
4	10	37	腹痛、水様性下痢、血便、発熱	無	Stx2	19m0046	clade8
5	10	73	腹痛、水様性下痢、血便	無	Stx1+Stx2	16m0399	other clades
6	10	62	腹痛、水様性下痢、血便、発熱	有	Stx2	19m0409	other clades
7	10	8	腹痛、水様性下痢、血便、発熱	無	Stx1+Stx2	19m0466	other clades
8	12	59	腹痛、水様性下痢、血便	有	Stx2	19m0046	clade8
9	1	2	水様性下痢、血便	無	Stx2	19m0046	clade8
10	1	33	腹痛、水様性下痢、嘔吐	無	Stx2	19m0046	clade8
11	1	35	水様性下痢	無	Stx2	19m0046	clade8

19m0133 及び 19m0046 であった。19m0133 の 2 株は家族内発生事例であったが、19m0046 は散発事例 2 株と、家族内発生事例 3 株(菌株番号 9、10 及び 11)が含まれていた。19m0046 の菌株が分離された患者の疫学調査の結果からは、事例間の関連性は認められなかった。他自治体においても 19m0046 となる菌株の分離が複数報告されていることから、広域的な散発事例の発生が示唆された。

MAMA-PCR 法によるクレード分類の結果、11 株中 6 株がクレード 8 と判定され、残り 5 株がその他のクレードと判定された。クレード 8 と判定された 6 菌株のうち、家族内発生事例由来菌株は 3 株であった。

クレード 8 と判定された 2 つの MLVA 型の各リピート数について比較した結果、互いに 5 遺伝子座のリピート数が異なっていたことから、これらの株は遺伝的関連性の低い菌株であることが示唆された。

クレード分類結果と患者疫学情報との関連性を検討したところ、血便症状を呈した患者は、クレード 8 は 6 人中 4 人(66.6%)、その他のクレードは 5 人中 3 人(60.0%)となった。また、入院をした患者は、クレード 8 は 6 人中 2 人(33.3%)、その他のクレードは 5 人中 1 人(20%)となった。今回行った調査では、クレードの違いによる明確な差は認められなかった。

E. 結論

1. 互いに疫学的関連性の認められない患者から、同一 MLVA 型となる菌株が分離された。これらは広域的な散発事例株と考え

られた。

2. クレード 8 には異なる 2 つの MLVA 型が含まれており、これらは遺伝的関連性の低い菌株であることが示唆された。

3. クレードの違いによる患者症状の明確な差は認められなかった。ただし、今回の供試菌株数は 11 株と限定的であるため、解析株数を増やして検討する必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 病原微生物検出情報：腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 3 月現在, 40(5), 71~72(2019)

2) Manning SD et al.: Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks, Proc Natl Acad Sci USA, 105(12), 4868~4873(2008)

3) Iyoda S et al.: Phylogenetic Clades 6 and 8 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 With Particular *stx* Subtypes are More Frequently Found in Isolates From Hemolytic Uremic Syndrome Patients Than From Asymptomatic Carriers, Open Forum Infect Dis, 1(2), ofu061(2014)

4) 腸管出血性大腸菌(EHEC)検査・診断マニュアル 2019 年 9 月改定版

5) 腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (O157、O26、O111 編) 第一版(Ver1.2)

2019年8月に岡山県内で発生した *Salmonella* Stanley による
4件の食中毒事例株の PFGE 解析について

研究分担者 岡山県環境保健センター
狩屋英明

研究協力者 河合央博 森本晃司 仲 敦史 中嶋 洋

研究要旨

2019年8月13日から15日にかけて、岡山県内で4件（事例A, B, C, D）の食中毒が発生した。病因物質はどの事例もサルモネラ 04 *Salmonella* Stanley (04, 12:d:1, 2)であった。事例Aでは検食を保存してあり、4検体から *Salmonella* Stanley が分離された。事例Aの保存食由来4株及び従事者便由来3株、事例Dの従事者便由来1株、4事例(A~D)の患者由来19株のPFGE解析を行った。その結果、解析したすべての *Salmonella* Stanley は同一バンドパターンを示し、4事例に共通の感染源があったことが示唆された。

A. 研究目的

サルモネラを病因物質とする感染症、食中毒が発生した場合、感染源究明のため、主として、原因菌株のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による解析が利用される。2019年8月13日から15日にかけて、岡山県内で4件（事例A, B, C, D）の食中毒が発生した。どの事例も患者便等から *Salmonella* Stanley (04, 12:d:1, 2) が分離された。事例Aでのみ、保存食4件からも *Salmonella* Stanley が分離された。4事例における原因菌株について、PFGEを用いた分子疫学的解析を実施し、事例の関連性を調べた。

B. 研究方法

1. 供試菌株

4事例の患者由来19株、従事者由来4株、保存食由来4株の *Salmonella* Stanley

を使用した。

2. 方法

(1) 血清型別試験

サルモネラ免疫血清「生研」（デンカ生研）及びサルモネラ相誘導用免疫血清「生研」（デンカ生研）を用いて血清型別試験を実施し、Kauffmann-Whiteの様式により血清型を確認した。

(2) PFGE

制限酵素 *Xba* I を用いて、国立感染症研究所で示された方法¹⁾を参考に実施した。泳動条件は、6.0V/cm、2.2~54.2s、19時間、バッファー温度は14℃とした。

C. 研究結果

1. 血清型別試験

供試した株は全て *Salmonella* Stanley (04, 12:d:1, 2)であった。

2. PFGE

図1に解析結果の一部を示す。
患者株19株(事例A~D)・従事者株4株
(事例A, D)・保存食由来株4株(事例A)
は制限酵素 *Xba*I ですべて同じバンドパ
ターンを示した。

D. 考察

原因菌株の PFGE 法による解析により、
事例A~Dは共通する食材を感染源とする
食中毒であったことが強く示唆された。
保健所では食材の遡り調査を行ったが、
共通感染源の特定には至らなかった。

食中毒や感染症事例が発生した場合、
原因菌を可能な限り早く分子疫学解析す
ることによって、感染源を特定し、感染
拡大防止につなげることができる。

今回の事例では、4事例とも病因物質が
Salmonella Stanley (04, 12:d:1, 2) であり、
PFGE により、何らかの食材由来の共通感
染源を示唆することができた。感染源の
特定までには至らなかったが、菌株の
PFGE 法による解析は、サルモネラ等の食
品由来感染症の病原体の解析手法として、
有用な手法であることが再確認できたも
のと思われる。

E. 結論

2019年8月に、岡山県内で4件(事例
A, B, C, D) の食中毒が発生し、どの事例
からもサルモネラ 04 *Salmonella*
Stanley (04, 12:d:1, 2) が検出された。事
例Aの保存食由来4株及び従事者便・患
者便由来株の PFGE 解析で、すべての
Salmonella Stanley は同一バンドパター
ンを示し、4事例に共通感染源があったこ

とが示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 寺嶋 淳 他 (2004) : 食品由来感染
症の細菌学的疫学指標のデータベース化
に関する研究 平成15年度総括・分担研
究報告書, 10-21

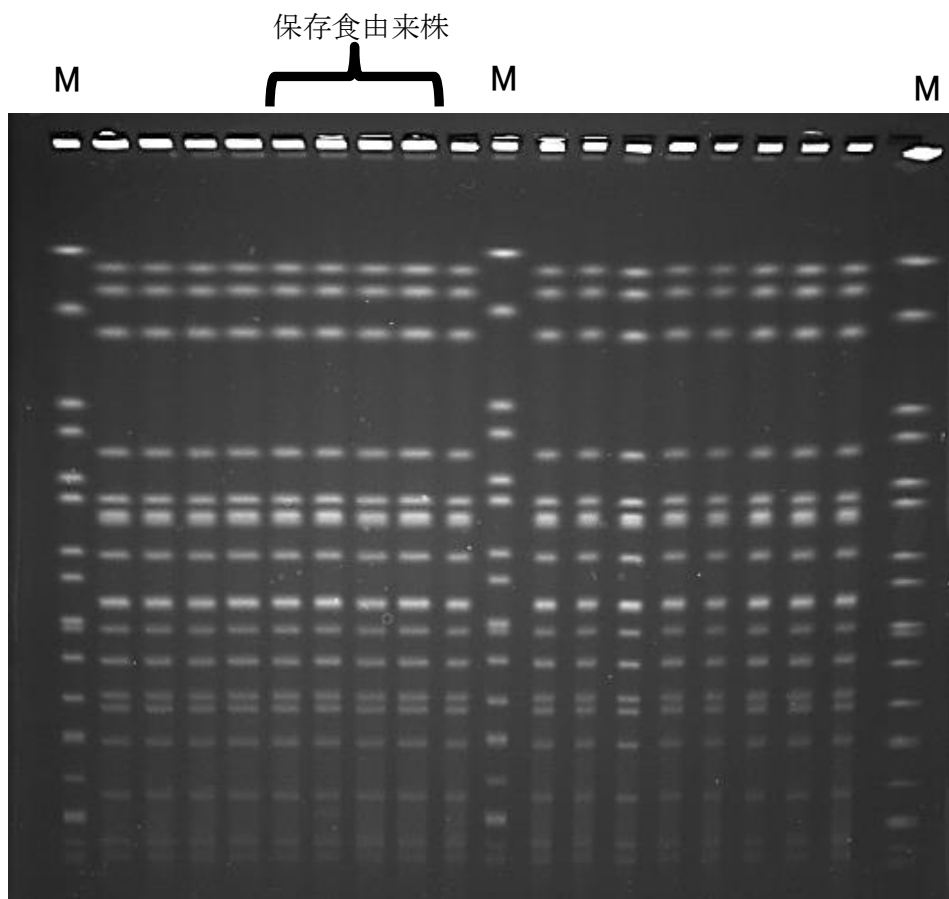


図1 患者便等由来 *Salmonella* Stanley の PFGE 解析結果 (制限酵素 *Xba* I 使用)
 M : マーカー (*S. Braenderup*)