

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」

令和元年度分担研究報告書

九州ブロックの菌株解析及び精度管理に関する研究
—IS 型データベースの運用、EHEC 検出状況、集団発生事例の集約及び精度管理
(PFGE、ISPS 及び MLVA) —

研究代表者	泉谷秀昌	国立感染症研究所
研究分担者	濱崎光宏	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
	藤崎道子	北九州市保健環境研究所
	木村碧	佐賀県衛生薬業センター
	右田雄二	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
	槐島翔一郎	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
	八木一真	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
	宮原聖奈	宮崎県衛生環境研究所
	上村晃秀	鹿児島県環境保健センター
	宮平勝人	沖縄県衛生環境研究所
	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
	大石明	福岡県保健環境研究所

要旨

九州ブロックでは、①IS-printing System (以下「ISPS」という。)による IS 型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、③EHEC による集団発生事例の集約及び④精度管理の 4 項目について取り組んだ。

九州ブロックにおける腸管出血性大腸菌 0157 (以下「0157」という。) の IS 型の登録数は、令和 2 年 2 月 10 日現在で 2,056 件であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。令和元年度に九州ブロックで収集された EHEC は 477 株であった。その O 群血清型の内訳は 0157 が 246 株と最も多く、腸管出血性大腸菌 026 (以下「026」という。) が 114 株、腸管出血性大腸菌 0111

(以下「0111」という。)が42株の順であった。令和元年度のEHECによる集団発生事例は13事例であった。その0群血清型の内訳は、0157によるものが7事例と最も多く、026によるものが5事例、0111によるものが1事例であった。精度管理は、パルスフィールド・ゲル電気泳動法(以下「PFGE」という。)を必須項目としISPS及びMultiple-locus variable-number tandem repeat analysis(以下「MLVA」という。)については、それぞれの地方衛生研究所(以下「地衛研」という。)の実情に合わせて選択項目とした。PFGE及びISPSの精度管理において、結果は概ね良好であった。MLVAの精度管理においては、一部誤判定がみられた。今後、EHECの分子疫学解析手法がMLVAに移行すること、及び地衛研によっては人事異動等で職員の入れ替わりにより技術の継承が困難になっていることを考慮すると、MLVAの継続的な精度管理及び研修が必要と考えられる。

A. 研究目的

食中毒や感染症等の集団発生事例において、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。平成26年度以降、0157、026及び0111に対しては、迅速性と分解能の両立を目指した遺伝子型別解析方法として、国立感染症研究所からMLVAにより情報還元が開始された。令和元年11月30日の時点で、九州ブロックではMLVAを実施している地衛研は4施設であり、ほとんどの地衛研ではPFGEを用いて実施されている。また、九州ブロックでは、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、PFGE、ISPS及びMLVAの精度管理を実施した。

また、EHECの検出状況、集団発生事例及びISPSのデータベースの運用状況についても集約した。

B. 研究方法

B-1. IS型データベースの運用状況

IS型は、Insertion sequenceの分布に由来する32種の増幅バンド(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. 6.6 (Applied Maths)を用いてMinimum spanning tree (MST)解析を行った。

B-2. 九州ブロックのEHEC検出状況、集団発生事例及び分子疫学解析法の実施状況

EHECの検出状況、集団発生事例及び分子疫学解析法の実施状況については、九州ブロックの各地衛研から得られた情報を集約した。

B-3. 精度管理

精度管理は、PFGE を必須項目とし ISPS 及び MLVA については、選択項目とした。本年度の精度管理は、同一株を同一と判定できることを目的とし、0157 の 4 株を参加地衛研に配布した（表 1）。PFGE の精度管理は、配布した 4 株のうちの 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 1）。試験方法については、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

C-1. IS 型データベースの運用状況

平成 22 年 4 月から令和 2 年 2 月 10 日までの九州ブロックにおける 0157 の IS 型の登録数は 2,056 件であり、平成 29 年度は 128 件、平成 30 年度は 139 件と一旦減少したが、例年 200 件前後の登録で推移している（表 2）。

登録された 2,056 件の 0157 の IS 型数は 374 種類に分類された。最も多く登録されている IS 型は「66324257743」で 213 株（10.4%）が九州ブロックの全ての地衛研から登録された（表 3）。また、9 年間で 21 株以上登録された IS 型数は 21 種類で、それに属する株は合計 1038 株（50.5%）であった。また、MST 解析の結果から、IS 型の 0157 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 2.1、2.2）。

ISPS は操作が簡便で迅速性に優れた特徴を有する一方で、エキストラバンドの出現により誤判定が生じることから精度管理等で解析能力の向上に努める必要があると考えられる。

C-2. 九州ブロックの EHEC 検出状況

九州ブロックの地衛研における EHEC の 0 群血清型の検出状況について解析した。

平成 31 年 4 月から令和元年 12 月 28 日までに 477 株の EHEC 菌株が収集され（表 4）、その主な 0 群血清型の内訳は 0157 が 246 株（51.6%）、026 が 114 株（23.9%）、0111 が 42 株（8.8%）、0103 が 20 株（4.2%）、0121 が 11 株（2.3%）、091 が 10 株（2.1%）であった。九州ブロックで収集される EHEC の 0 群血清型の内訳に大きな変化は無く、例年どおり 0157、026、0111、0103、0121 及び 091 で全体の 9 割を占めていた。

C-3. EHEC による集団発生事例

令和元年度の EHEC による集団発生事例は 13 事例であった（表 5）。その 0 群血清型の内訳は、0157 によるものが 7 事例、026 によるものは 5 事例、0111 によるものが 1 事例であった。発生場所別に見ると、飲食店、保育所及び家庭内であった。集団発生事例は、例年通り保育所での事例が多い傾向は変わらなかった。

C-4. EHEC の分子疫学解析手法の実施状況

九州ブロックの地衛研における EHEC の分子疫学解析手法の実施状況から、一部の地衛研において、PFGE、ISPS、MLVA いずれも実施していないことがわかった（表 6）。人事異動等で職員の入替わりに伴うものと考えられる。

C-5. 精度管理（PFGE、ISPS 及び MLVA）

PFGE の精度管理には 12 地衛研が参加した。PFGE の写真から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、概ね電気泳動像は明瞭で手技自体は良好に行われていると考えられた（図 3.1 から図 3.12）。問題に対する回答のうち、同じ菌株である検体 1 と検体 2 の関連性については、参加した 12 地衛研で一致した（表 7）。

ISPS の精度管理には、10 地衛研が参加した。

今回、検体として使用した菌株はエキストラバンドがない株を使用した（図 4）。ISPS の精度管理の結果、参加した全ての地衛研において、回答が一致した（表 8.1 から表 8.4）。昨年度まではエキストラバンドが出現する株を選定していたため、一部の地衛研でバンドの誤判定が見られた。判定の精度を上げるためには、エキストラバンドの位置を腸管出血性大腸菌 0157 IS-printing system エキストラバンド集¹⁾で確認することが重要である。

MLVA の精度管理には 5 地衛研が参加した。一部の地衛研において、全ての検体で 0157-17 のローカスでピークが認められなかった（表 9.1 から表 9.4）。当該ローカスの判定ミスと考えられる。MLVA は PFGE と比較して手技が簡便であるが、各ローカスでの出現ピークの判定に一定の知識が必要であることから、今後、研修を実施する必要があると考えられる。

D. 結論

九州ブロックにおける 0157 の IS 型の登録数、収集された EHEC 株数及び集団発生数は、平成 30 年度よりいずれも上昇した。

九州ブロックでは PFGE、ISPS 及び MLVA について、精度管理を行った。いずれの方法でもほとんどの地衛研において、手技は良好であると考えられた。しかし、一部の地衛研において、人事異動等で職員の入れ替わりによる技術の継承が難しくなっていることから、継続的な精度管理及び研修等が必要と考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 濱崎光宏；病原体検査における精度管理について．第 45 回九州衛生環境技術協議会特別講演（2019 年 10 月，長崎県）
- 2) 杉岡由美子、濱崎光宏、吉田弘；九州ブロック内における遺伝子解析装置に関する技術管理研修について．第 78 回日本公衆衛生学会総会（2019 年 10 月，高知県）
- 3) 濱崎光宏、杉岡由美子、近藤芳樹、吉田弘、調恒明；「検査プロセスの改善 (KAIZEN) に向けたワークショップ」の開催について．第 33 回公衆衛生情報研究協議会総会・研究会（2020 年 1 月，埼玉県）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) 腸管出血性大腸菌 0157 IS-printing system エキストラバンド集．厚生労働省科学研究費補助金 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）「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」班作成

表3 九州ブロックで登録数が多いIS型（登録年度別、登録地衛研別）

順位	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	30	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	
1	66324257743	22	32	4	11	33	50	9	5	12	35	37	36	67	7	15	1	26	6	2	7	8	1	213	
2	57733536074	3	15	23	8	16	10	27	14	10	6	23	31	6	19	20	13	9	2	1	5	3	0	132	
3	30671622280	33	11	1	7	11	2	2	3	2	2	31	7	4	1	12	3	2	0	2	6	6	0	74	
4	66457435083	6	2	9	10	1	5	9	11	0	17	11	9	4	3	18	1	10	0	2	4	8	0	70	
5	56643812046	31	14	3	13	3				0	0	0	19	17	7	3	6	2	8	0	0	1	1	0	64
6	30653010185	9	4	4	14	6	3	2	4	1	4	7	8	4	4	8	0	4	8	0	5	2	1	51	
7	57868549067	4	0	3	2	0	0	0	15	25	0	20	13	3	6	2	0	1	0	0	0	1	3	49	
7	57733470538		2	12	1	16	5	4	1	5	3	13	7	1	18	5	0	1	0	1	2	1	0	49	
9	22081687688	12			2	16				10	0	0	15	9	9	0	3	0	0	0	2	1	1	0	40
10	27384601163	26	3		7					0	0	0	8	1	4	0	8	6	0	2	3	2	2	0	36

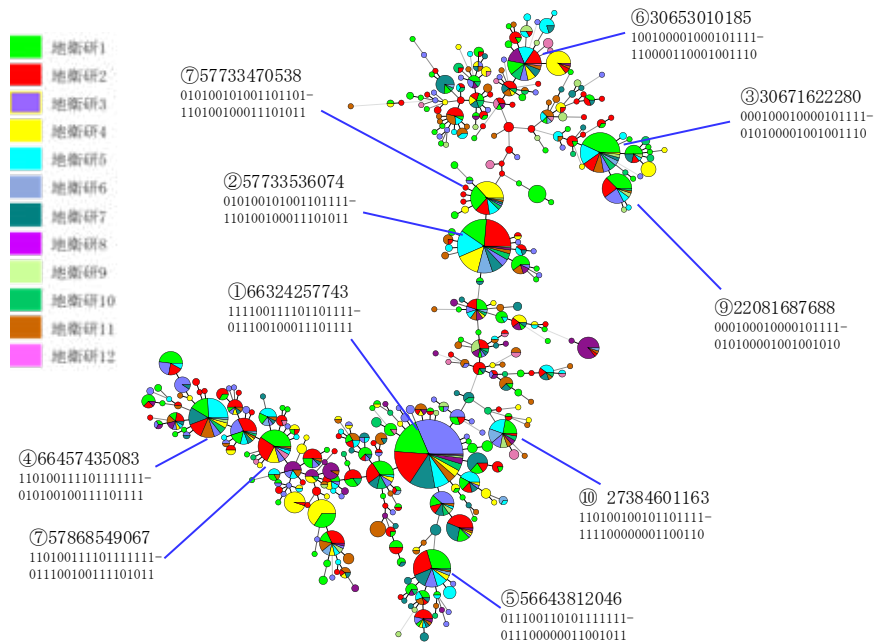


図2.1 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree（地衛研別）

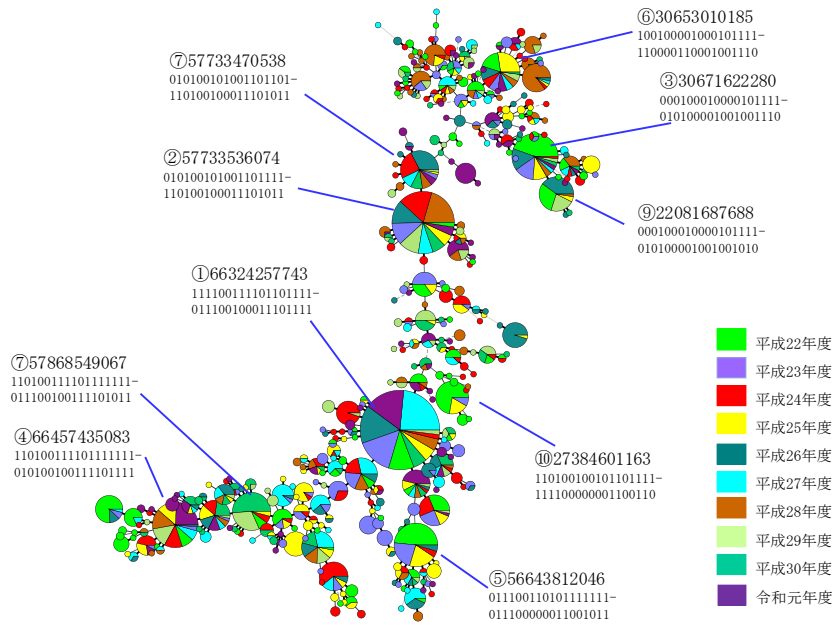


図2.2 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4 令和元年度に九州ブロックの地衛研で収集されたEHEC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	015	024	038	0119	0146		0153	その他
1	53	4	5	7	1	2	0	1					1	1		4	79
2	43	3	2	1	2	1				1	1	1		1	1	4	61
3	29	1	0	4	1	1	1									2	39
4	52	53	6	1		4			2							1	119
5	27	5	1		1		2										36
6	2	3															5
7	15	1			3	1											20
8	2	21	2	1	0	1										1	28
9	8	3		2													13
10	3	4	25				1									1	34
11	11	16	1	3	3											5	39
12	1			1				1								1	4
合計	246	114	42	20	11	10	4	2	2	1	1	1	1	2	1	19	477

表5 令和元年度に九州ブロックの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	被験者数	陽性者数
1	1	0157: H7	stx_1+stx_2	飲食店	9	3
	2	0157: H7	stx_1+stx_2	飲食店	18	4
	3	0157: H7	stx_1+stx_2	保育所	192	15
4	1	0157: H7	stx_1+stx_2	保育所	281	21
	2	026: H11	stx_1	保育所	343	41
	3	0157: H7	stx_2	保育所	98	12
5	1	0157: H7	stx_1+stx_2	保育所	131	17
6	1	026: H11	stx_1	家庭内	327	3
7	1	0157: H7	stx_1+stx_2	飲食店	10	10
8	1	026: H11	stx_1	保育所	10	2
	2	26	stx_1	保育所	61	14
	3	26	stx_1	家庭内	57	2
10	1	111	stx_1+stx_2	保育所	129	23

表6 EHECの分子疫学解析手法の実施状況（地衛研数）

	実施	全株について実施	一部の株について実施	導入予定
PFGE	11	0	11	1
ISPS	11	8	3	1
MLVA	4	3	1	5

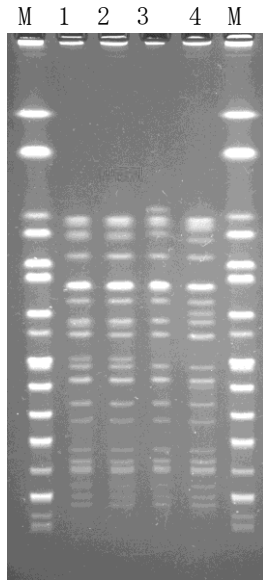


図3.1 地衛研1のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

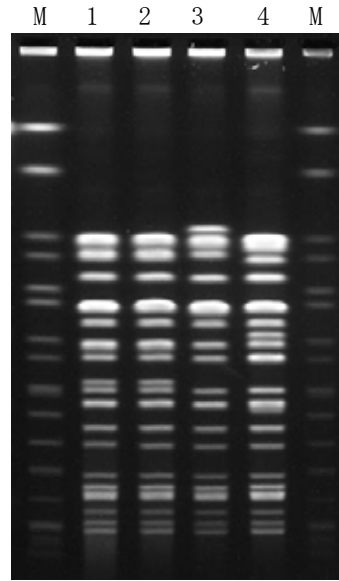


図3.2 地衛研2のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

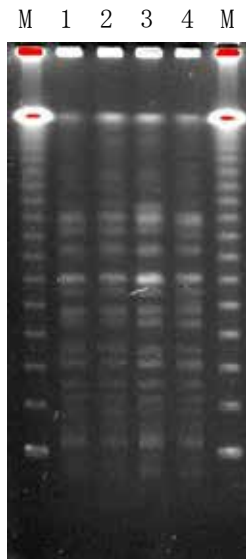


図3.3 地衛研3のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

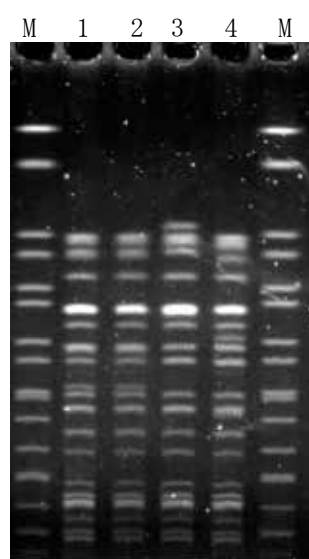


図3.4 地衛研4のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

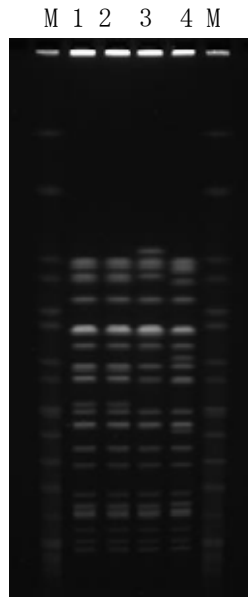


図3.5 地衛研5のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

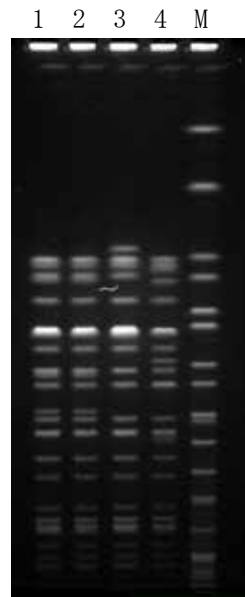


図3.6 地衛研6のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

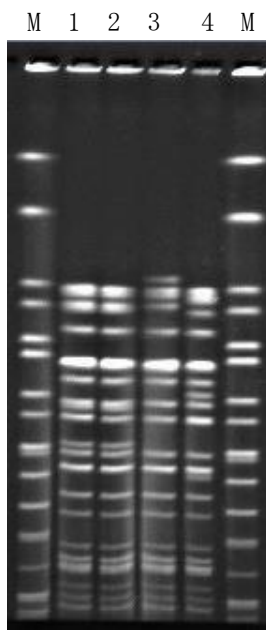


図3.7 地衛研7のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

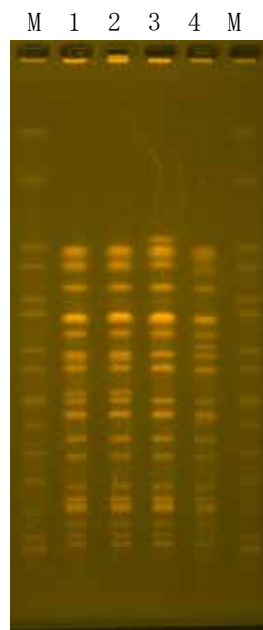


図3.8 地衛研8のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

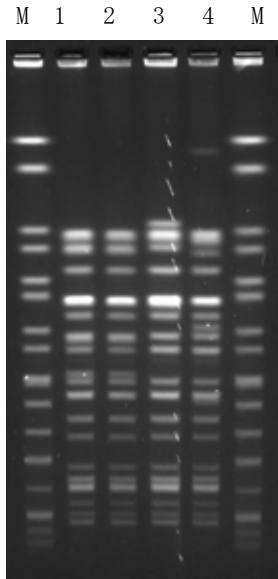


図3.9 地衛研9のPFGE電気泳動写真

M: サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2: 検体2、レー
ン3: 検体3、レーン4: 検体4

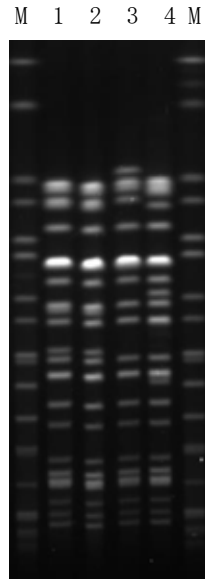


図3.10 地衛研10のPFGE電気泳動写真

M: サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2: 検体2、レー
ン3: 検体3、レーン4: 検体4

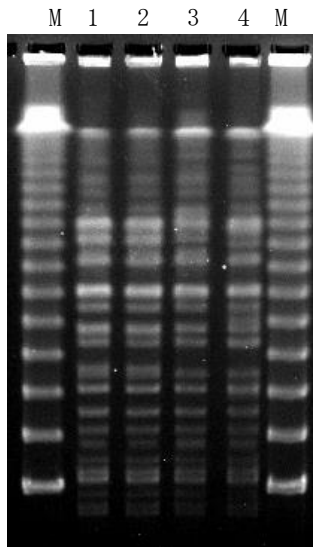


図3.11 地衛研11のPFGE電気泳動写真

M: サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2: 検体2、レー
ン3: 検体3、レーン4: 検体4

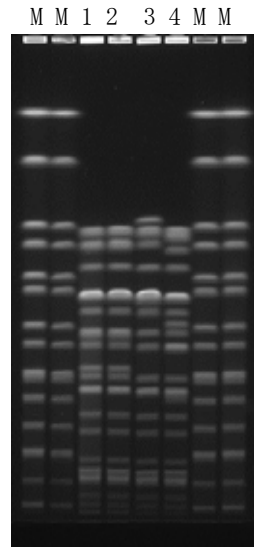


図3.12 地衛研12のPFGE電気泳動写真

M: サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2: 検体2、レー
ン3: 検体3、レーン4: 検体4

表7 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	関係する可能性がある	4本	関係する可能性がある	6本
2	一致	0本	密接に関係	2本	関係する可能性がある	6本
3	一致	0本	密接に関係	1本	関係する可能性がある	5本
4	一致	0本	関係する可能性がある	4本	関係する可能性がある	5本
5	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	5本
6	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	5本
7	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	6本
8	一致	0本	関係する可能性がある	4本	不一致	8本
9	一致	0本	密接に関係	2本	関係する可能性がある	6本
10	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	4本
11	一致	0本	密接に関係	2本	密接に関係	3本
12	一致	0本	関係する可能性がある	4本	不一致	7本

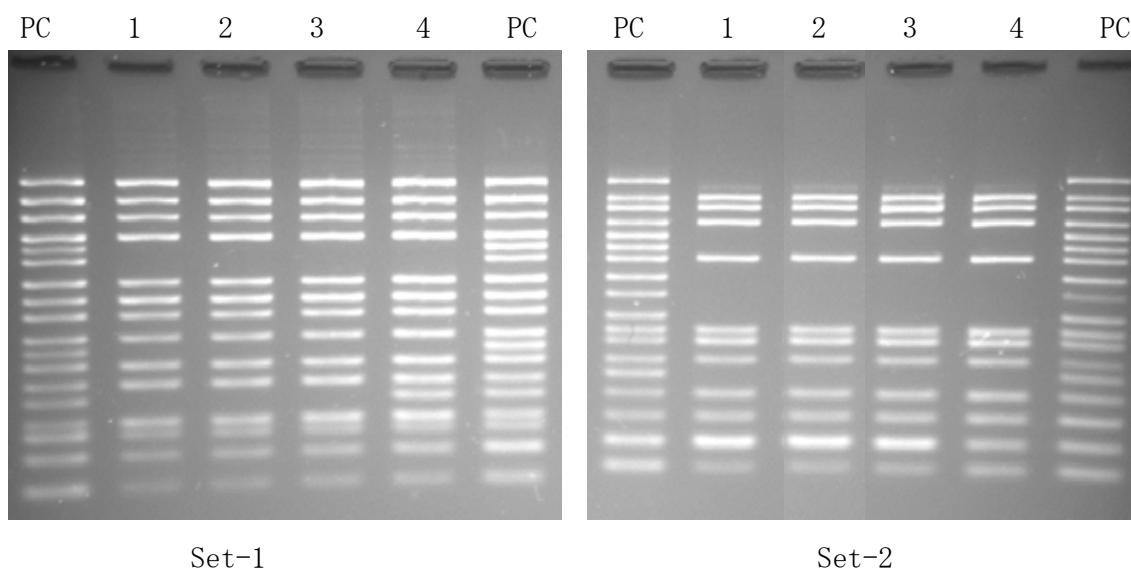


図4 ISPSの精度管理に使用した株の電気泳動写真

PC : 陽性コントロール、レーン1 : 検体1、レーン2 : 検体2、レーン3 : 検体3、
レーン4 : 検体4

表9.1 菌株1に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	0157 -3	0157 -34	0157 -9	0157 -25	0157 -17	0157 -19	0157 -36	0157 -37	備考
1	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
5	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	0157- 37: 8
6	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
9	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
10	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	-2	6	3	6	

表9.2 菌株2に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	0157 -3	0157 -34	0157 -9	0157 -25	0157 -17	0157 -19	0157 -36	0157 -37	備考
1	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
5	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	0157- 37: 8
6	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
9	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
10	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	-2	6	3	6	

表9.3 菌株3に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	0157 -3	0157 -34	0157 -9	0157 -25	0157 -17	0157 -19	0157 -36	0157 -37	備考
1	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
5	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	0157- 37: 8
6	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
9	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6	
10	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	-2	6	3	6	

表9.4 菌株4に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	0157 -3	0157 -34	0157 -9	0157 -25	0157 -17	0157 -19	0157 -36	0157 -37	備考
1	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	11	12	7	8	6	3	6	
5	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	11	12	7	8	6	3	6	
6	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	11	12	7	8	6	3	6	
9	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	11	12	7	8	6	3	6	
10	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	11	12	7	-2	6	3	6	