

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
(課題番号：H30-新興行政-一般-001)

令和 2 年度 総括・研究分担報告書
及び
平成 30～令和 2 年度 総合研究報告書
(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)

研究代表者 泉谷 秀昌
国立感染症研究所 細菌第一部

令和 3 年 (2021) 年 4 月

目 次

1. 令和2年度総括研究報告書

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	1
------------------------------------	---

研究代表者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所
-------	-------	----------

2. 令和2年度分担研究報告書

(I) 国立感染症研究所

a) EHEC 分離株の分子疫学解析について	20
------------------------	----

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
	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部
		地方衛生研究所	

b) 全ゲノム解析による O157 の分子疫学的解析	28
----------------------------	----

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
		地方衛生研究所等	

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

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	36
------------------------------------	----

研究分担者	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	森本 洋	北海道立衛生研究所
	小川 恵子	北海道立衛生研究所
	三津橋和也	北海道立衛生研究所
	石黒 真琴	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上 剛志	青森県環境保健センター
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	橋本 恭奈	青森県環境保健センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	山下 裕紀	岩手県環境保健研究センター
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	山谷 聡子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	賀澤 優	福島県衛生研究所

木村 有紀	新潟県保健環境科学研究所
須藤 拓大	新潟市衛生環境研究所

(Ⅲ) 関東・甲・信・静ブロック

関東ブロックで分離された食中毒起因菌の分子疫学解析法の検討と

精度管理に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 55

研究分担者	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター
研究協力者	石川加奈子	茨城県衛生研究所
	江原 栞	栃木県保健環境センター
	中野 剛志	群馬県衛生環境研究所
	佐藤 孝志	埼玉県衛生研究所
	間 京子	千葉県衛生研究所
	古川 一郎	神奈川県衛生研究所
	小泉 充正	横浜市衛生研究所
	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
	市川 奈緒	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
	齋木 大	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

(Ⅳ) 東海・北陸ブロック

研究分担 東海・北陸地方11施設（地方衛生研究所、保健所及び衛生試験所）による

MLVA精度管理及び分子疫学手法活用に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 67

研究分担者	山田 和弘	愛知県衛生研究所
研究協力者	高橋 佑太	愛知県衛生研究所
	木全 恵子	富山県衛生研究所
	塩本 高之	石川県保健環境センター
	東方 美保	福井県衛生環境研究センター
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	野田万希子	岐阜県保健環境研究所
	信田 充弘	岐阜市衛生試験所
	永井 佑樹	三重県保健環境研究所
	石黒亜基子	豊橋市保健所衛生試験所
	中根 邦彦	岡崎市総合検査センター
	多和田光紀	豊田市衛生試験所

(V) 近畿ブロック

高度解析法の構築と近畿ブロックにおける情報共有体制の構築の検討…………… 80

研究分担者	河合 高生	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	若林 友騎	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
	梅川 奈央	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
	高橋 佑介	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
	原田 哲也	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
	河原 隆二	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
	勢戸 和子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
	石川 和彦	滋賀県衛生科学センター
	浅井 紀夫	京都府保健環境研究所
	小仲 兼次	京都府保健環境研究所
	渡辺 正義	京都市衛生環境研究所
	荻田 堅一	兵庫県立健康生活科学研究所
	齋藤 悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	濱 夏樹	神戸市環境保健研究所
	野本 竜平	神戸市環境保健研究所
	横田隼一郎	姫路市環境衛生研究所
	黒田久美子	姫路市環境衛生研究所
	平垣内雅規	尼崎市衛生研究所
	平田 翔子	尼崎市衛生研究所
	福田 弘美	堺市衛生研究所
	岩崎 直昭	堺市衛生研究所
	吉田 孝子	奈良県保健研究センター
	池端 孝清	和歌山市衛生研究所
	庄 真理子	和歌山県環境衛生研究センター

(VI) 中国・四国ブロック

a) 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…………… 110

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
	林 宏樹	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
	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
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
氏家 絢子	愛媛県立衛生環境研究所
矢儀田優佳	愛媛県立衛生環境研究所
影山 温子	高知県衛生環境研究所
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
岡田 達郎	岡山県環境保健センター
中嶋 洋	岡山県環境保健センター

b) 島根県における腸管出血性大腸菌 0157 の分子疫学解析の有用性の検討…………… 129

研究協力者 林 宏樹 島根県保健環境科学研究所

(VII) 九州ブロック

a) 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) — …………… 133

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
	瀧下恵里子	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
	溝腰 朗人	大分県衛生環境研究センター
	前田 莉花	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
	大山み乃り	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
	片宗 千春	福岡県保健環境研究所

b) 毒素原性大腸菌 0159 による集団食中毒事例について …………… 147

研究協力者	右田 雄二	長崎県環境保健研究センター
	増輪 文治	長崎県環境保健研究センター
	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター
	浦川 美穂	長崎県環境保健研究センター
	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター
	石原 雅行	長崎県五島保健所
	山下 綾香	長崎県五島保健所

c) 長崎市で発生したウエルシュ菌食中毒事例	150
研究協力者 江原 裕子 長崎市保健環境試験所	
島崎 裕子 長崎市保健環境試験所	
仁位和加奈 長崎市保健環境試験所	
片上 隼人 長崎市保健環境試験所	
3. 研究成果の刊行に関する一覧表（令和2年度）	153

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2年度総括研究報告書

「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」

研究代表者 泉谷秀昌 国立感染症研究所細菌第一部第二室長

研究要旨：

食品由来感染症における病因物質である病原体に対し、分子疫学解析から得られる遺伝子情報（病原体情報）は、流行株を把握し、感染源を究明し、感染拡大を阻止する上で重要である。実際の感染症対策および施策にあたっては当該病原体情報を、疫学調査で得られた情報とともに、効率よく効果的に共有することが肝要である。腸管出血性大腸菌（EHEC）に対する主たる分子疫学解析手法としては、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）、IS-printing system（ISPS）およびmultilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）がある。2018年6月29日付で厚生労働省から発出された事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」によりMLVAに統一する方向性が示された。当該事務連絡に対応し、各ブロックにおいて、MLVA法に関する研修会、各病原体解析手法に関する精度管理試験を実施した。また、MLVA実施にあたってのデータ解析手法の検討、データベースの構築などを実施した。PFGE、ISPSについても同様に精度管理及びデータベースの構築を行った。アンケート調査の結果から、MLVA実施率は7割近くに上昇した。EHEC分離株の解析から、各地域もしくは全国における流行菌型の解析、広域株の探知が行われた。得られた情報を関係機関と共有、さらに必要に応じて研究班を通じて全国的に共有した。個々の集団事例及び広域集団事例への対応などに活用された。全ゲノム解析を使ったMLVA法の評価、事例対応にあたっての有用性等の評価を行った。収集した菌株のMLVAデータ及び、地衛研から直接送付されたMLVAデータに関し、食中毒調査システムNESFD掲示板への提供を行った。

研究分担者

岩渕香織（岩手県環境保健研究センター）
鈴木 淳（東京都健康安全研究センター）
山田和弘（愛知県衛生研究所）
河合高生（大阪健康安全基盤研究所）
狩屋英明（岡山県環境保健センター）

濱崎光宏（福岡県保健環境研究所）

伊豫田淳（国立感染症研究所）

研究協力者：大西 真、李謙一（国立感染症研究所）および各地方衛生研究所等関係者
（各研究分担報告書を参照）

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。代表的な病原体で毎年流行を繰り返すものとして、腸管出血性大腸菌

(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) がある。EHEC 感染症は 3 類感染症の一つであり、年間 3-4 千名もの感染者を出す。溶血性尿毒症症候群などの合併症をおこし、10 名程度の死者が出る年もある。当該病原体には多様なバリエーションが存在し、その流行型は毎年変化している。そのなかには複数の自治体をまたいで流行する広域株も存在し、その感染源を突き止めることは容易なことではない。本研究では分子疫学解析に関し、その開発・評価・精度管理、当該解析法に基づく病原体情報の収集およびデータベース化、ならびに当該病原体情報の効率的、効果的な共有化を行うためのシステムの構築を柱としている。本研究によって流行菌型の把握、ならびに広域事例における感染源の究明及び感染拡大の防止に貢献することを目指している。

B. 研究方法

1. 日本全国の地方衛生研究所（地衛研）を 6 ブロックに分け、各ブロック内の地衛研で分離菌株（腸管出血性大腸菌 0157 等）に対するパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）解析、IS-printing system（ISPS）、multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）の精度管理、研修会等を実施した。
2. 平成 21 年度に立ち上げた BioNumerics サーバの運用を見直した。一部機能を VPS サーバ上に移築し、MLVA シ

ステムの構築を行った。

3. 分担研究者及び研究代表者により、PFGE、ISPS 及び／もしくは MLVA によるデータベース構築を検討した。さらに、データベースを活用して集団発生事例等に対応した。

4. EHEC 0157、026、0111（主要 3 血清群）、0103、0121、0145、0165、091（追加 5 血清群）に関して MLVA を用いた病原体サーベイランスを検討した。

5. 2018 年 6 月 29 日付の厚生労働省からの事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」に関連した MLVA データ授受に関する整備を行い、定期的に MLVA データを厚生労働省に提供、食中毒調査システム

（NESFD）上の掲示板に MLVA リストとして掲示された。

6. EHEC 0157 株を用いて全ゲノム配列（whole-genome sequence, WGS）を用いた解析を実施した。一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）を抽出し MLVA 法の結果と比較した。集団事例関連株について WGS 解析を行い、他の国内株と比較した。

7. EHEC 分子疫学解析の手法について、地衛研における実施状況を把握するためのアンケートを実施した。

C. 研究結果

1. 感染研における研究-1

2020 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 231 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 1,295 株、026 459 株、0111 85 株、0103 162 株、0121 58 株、0145 16 株、0165 4 株、091 31 株、計 2,110 株を解析し、それぞれ、555、179、54、52、25、12、4、27 の型が同定された。0121 を除き、シンプソンの多様性指数 (SDI) は 0.944-1 と比較的高かった。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 445 株であった。当該コンプレックスは 0157 13 種類、0103 2 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 7 種類、026 1 種類、0111 1 種類、0103 1 種類、0121 1 種類であった。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、データの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、さらにシステムの検討・改良の必要があると考えられた。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

平成 30 年 6 月 29 日付け事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により遺伝子検査手法は MLVA に統一化するよう通知が発出されてから、2 年が経過した。本通知もあり MLVA を導入する地衛研は増えており、令和 2 年 12 月現在、北海道・東北・新潟ブロック内の地衛研では、導入予定の 3 施設を含めると 9 施設で MLVA 実施可能となっている。MLVA の結果の信頼性を確

保するため、ブロック内において精度管理を実施した。また、ブロック内の EHEC 担当者の連携を深め、感染症・食中毒事例や検査法等について情報を共有するため地方衛生研究所全国協議会 Webex 会議室を利用し研修会を 2 回開催した。

各施設により、機器や試薬の安定した条件をみつけることが信頼性の確保された結果を得るために重要とされている。増幅効率のよい PCR 試薬キットにより、判定に苦慮する「低いピーク」が改善されたと研修会で報告があり、PCR 試薬により安定した MLVA データが確保されるのであれば、ひとつ条件として検討されと考えられた。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

食中毒の散在的集団発生 (Diffuse outbreak) を早期に探知し拡大防止を行うためには、共通原因食品を迅速に特定することが重要である。その手段として患者等から分離された菌株情報は非常に有用である。関東ブロックでは共通菌株 5 株 (0157: 4 株、026: 1 株) を用いて PFGE、ISPS、MLVA の精度管理を行った結果、いずれも良好な成績であった。MLVA による精度管理においては、これまでで最も施設間の一致率が高い結果となり、年々各施設での手技が定着していることが確認できた。しかし近年、地方衛生研究所では担当者の異動が頻繁に行われていることから、今後も PFGE や MLVA の検査精度を一定に保つための精度管理が重要である。

東京都で検査を実施した 0157 (203 株)、026 (17 株)、0111 (8 株) の MLVA および PFGE を実施した結果、026 および 0111 は両方で全ての株が一致したが、0157 では PFGE

が 91 種類の型に、MLVA は 112 種類の型に分類され、一部に両方で不一致であった菌株が存在した。両解析法どちらにおいても疫学調査と一致しない解析結果が得られる場合があったことから、菌株を対象とした分子疫学解析結果に加え、保健所等における聞き取り調査も必要不可欠であるといえることが確認できた。

【病原体情報の疫学調査への活用例の報告（以下、追加事例報告等）：東京都】

4. 東海・北陸ブロック

EHEC 主要 3 血清群 (0157、026、0111) に対する分子疫学解析法である MLVA について、東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、保健所及び衛生試験所）のうち既に MLVA が実施可能な 8 施設を対象に、4 件の EHEC 抽出 DNA を用いて精度管理を実施した。また、愛知県内の中核市 3 市を対象に、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施した。東海・北陸ブロックで今年度分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を行った。

1) MLVA 精度管理

各施設から提出された MLVA 実施結果の各領域のリピート数を比較したところ、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックの MLVA 法の検査精度は良好であった。しかし、各施設における MLVA で得られるピークの高さには大きな差がみられ、判定に苦慮すると考えられる程度にピークが低い検体もあった。ピークの高さの施設ごとの差は使用するシーケンサーの違いや PCR 酵素及びプライマー濃度等の反応時点での違い等が考えられ、各施設で安定した結果を得ることを可能にすることは今後の課題であると考えられた。また、出力したファイルの貼り付けと結果の確認のみで、入

力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすことが可能な記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

2) MLVA 導入研修の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。今後も MLVA に関して、担当者間での情報共有が重要であり、研修会等の開催も継続的に必要であると考えられた。

3) 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った。その結果、分離株全てが 95%程度の相同性があった。

【追加事例報告等：愛知県】

5. 近畿ブロック

EHEC の遺伝子型別法である MLVA の地衛研への導入促進を目的として、平成 30 年度から検討を継続している MLVA 新規解析法に改良を加え、その有効性を評価した。近畿ブロック内の研究協力地衛研 10 施設を対象に結果の信頼性確保のための精度管理を実施した。また、MLVA に関する Q&A を作成し、地衛研における MLVA の導入・実施を支援した。研究協力地衛研 5 施設とともに改良した MLVA 新規解析法を評価した結果、1 施設を除いて、供試した 83%以上の菌株について 17 遺伝子座すべてのリピート数を正確に決定することができた。MLVA 新規解析法は、他施設で作成された bin 設定ファイルをインポートする既存の方法と比較して、同等以上の精度でリピート数を決定できると考えられた。MLVA の精度管理については、10 施設中 4 施設が配布した 12 株すべてを正しく解答した一方で、3 施設は 2 株以上を誤答し、施設間で MLVA の技術レベルに差

があることが明らかになった。継続的な精度管理の実施による技術レベルの底上げが必要であると考えられた。

6. 中国四国ブロック

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・解析を行うことが感染源特定や拡大防止のために有用である。そのためには、地衛研における病原体分離株の分子疫学解析手法の解析精度・解析能力の向上による精度管理体制の維持・強化が不可欠である。そこで、中四国ブロック内の地衛研を対象に、EHEC 0157 菌株を用いた ISPS、PFGE 及び MLVA による精度管理を実施した。その結果、一部の地衛研を除いて、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改善や工夫、検査結果の適正な点検が必要と思われた。また、MLVA については、近年、MLVA を導入する地衛研が増加しており、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は、MLVA で解析を行う地衛研に対して、本研究結果に基づく継続的な技術的支援が、必要であると考えられた。

令和2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。その結果、同一の MLVA 型の EHEC 菌株による感染事例が中四国ブロックを含む全国の複数の自治体で確認されたが、中四国ブロック内では同一汚染源による腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかった。

本研究によって EHEC 分子疫学解析手法

である ISPS、PFGE、MLVA による中四国ブロックの地衛研のサーベイランス技術水準の向上に貢献したものとする。

【追加事例報告等：島根県】

7. 九州ブロック

九州ブロックでは、①ISPS による IS 型データベースの運用、②EHEC 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 EHEC 0157 の IS 型の登録数は、令和3年2月10日現在で2,157件であり、令和2年度は101件の登録であった。令和2年度に九州ブロックで収集された EHEC は385株であった。その0群血清型の内訳は0157が154株と最も多く、026が81株、0111が14株の順であった。令和2年度の EHEC による集団発生事例は17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6事例、0103によるものが2事例、0121によるものが1事例、血清型別不能によるものが1事例であった。精度管理は、PFGE を必須項目とし ISPS 及び MLVA については、それぞれの地衛研の実情に合わせて選択項目とした。PFGE、ISPS 及び MLVA の精度管理において、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。

【追加事例報告等：長崎県、長崎市】

8. 感染研における研究—2

EHEC のサーベイランスにおける全ゲノム配列 (WGS) 解析の有効性を検証するために、EHEC 0157 の WGS 解析を行った。2020年に分

離された 202 株の 0157 菌株の WGS 配列を新たに解読し、計 1146 株の WGS から単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を抽出した。MLVA と SNP の比較を行ったところ、一部の例外を除き、MLVA で同一型または 1 座位のみ異なる型では少数の SNP のみ認められることが確認された。上記の解析結果をもとに、2020 年に報告された 3 事例の MLVA コンプレックスについて WGS 解析を行い、1178 株分の SNP データベースから近縁株を抽出した。この結果、2 事例ではコンプレックスとなった株のみが 10 か所以内の SNP を有していた。一方、コンプレックス 20c022 では、100 株以上の近縁株が抽出され、国内で近縁性の高い集団が流行型となっていることが判明した。

9. その他

1) ブロックアンケート結果

EHEC の分子疫学解析手法 PFGE、ISPS および MLVA について各地衛研での実施状況をアンケート形式で情報収集した。回答総数は 71 であった。PFGE 実施率は 83%、ISPS 実施率は 56%、MLVA 実施率は 66% であった。2018 年と比較し PFGE はほぼ変わらず、ISPS で低下が、MLVA では増加が見られた（それぞれ 85→83%、84→56%、33→66%）。

2) MLVA 解析設定ファイルの配布

MLVA データ解析にあたり使用するソフト Genemapper の設定ファイルを 20 機関に配布した。

3) MLVA 解説書の作成

MLVA に関して理解を広げるため、比較的平易な「MLVA 法解説」を作成し、ホームページ上に公開した。（別紙参照）

D. 考察

食品由来感染症において、病因物質である細菌の分離株に対し分子疫学解析手法を駆使し、菌株間のつながりを明らかにすること、そしてその情報を関係機関と共有し、患者の疫学情報と関連させ、事例対応に活用していくことは、感染原因の究明や感染拡大の阻止などの感染症対策を講じるために重要な要素である。

本年度も EHEC 分離株の分子疫学解析の結果から、全国及び各ブロックにおいて流行菌型の調査がなされ、食中毒などの行政対応に結び付いた事例が報告された。全体的に大きな流行株は検出されなかったが、多くの広域株が検出された。

EHEC においてはこれまで PFGE、ISPS、MLVA が分子疫学解析手法として開発、検討、使用されてきた。2018 年 6 月 29 日付に厚生労働省より発出された事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により、EHEC 病原体解析手法として MLVA に統一し、MLVA データの感染研への送付と型名付与を行う（または分離株を送付し MLVA 型を取得）という方向性が示された（0157、026、0111 が対象）。

本研究のアンケート結果から、地衛研では ISPS の実施率の減少、MLVA の実施率の上昇が観察された。これは上記事務連絡による影響、本研究班及びさまざまな支援により、MLVA の普及に向けて地衛研が動いていることを示している。MLVA が各地衛研で導入され、病原体解析手法としてルーチ的に機能するには、一層の支援が必要と考えられる。また、データの解析システムの整備、情報共有に向けたシステム整備等も必要と考えられる。各試験法の実施状況は

ブロックごとに様々であり、また地衛研では毎年担当者の交代が少なからず発生する。本研究班による精度管理の実施、解析手法の検討、研修会等は、各ブロック及び地衛研における病原体解析の体制維持、MLVA 普及に向けた能力向上、問題点の共有などの観点から重要な位置を占めており、今後も継続して実施していく必要がある。

本研究班においては closed network 上に病原体情報のデータベースを利用するシステム、すなわちパルスネット、ISPS データベースの構築および運用を進めてきた。しかしながら、病原体解析手法の MLVA への移行が進みつつあり、MLVA のためのシステム構築が必要と考えられる。VPS サーバ上に MLVA システムを構築し、現在分担研究者を中心に運用を検討中である。今後ユーザーを増やしていくにあたり、運用面等での検討を重ねていく必要がある。

わが国では上記のように MLVA が EHEC 分離株の第一の解析手法として、PFGE、ISPS が第二の選択肢として活用される方向になりつつある。分離菌株の全ゲノム解析を用い、MLVA の結果と比較することで、MLVA の評価を行った。ゲノム解析は最も信頼性の高い病原体解析手法であるが、かかる費用と時間の関係からルーチン化することは難しい。しかしながら、蓋然性の高い解析が可能となり、今後もゲノム解析を使った検討を続けていくことは現行の病原体サーベイランスの性能を理解する点、流行中の病原体の系統を知る点において重要である。

E. 結論

病原体の分子疫学解析手法における技術開発、データの蓄積ならびに情報の共有は

感染症対策において必須である。

EHEC 感染症においては、分子疫学解析手法として MLVA を導入したことでよりリアルタイムに近いサーベイランスが可能になりつつある。2018 年 6 月に厚生労働省から発出された事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により病原体解析手法として MLVA にシフトする方向性が示された。いくつかの事例では MLVA データを直接地衛研と感染研とでやりとりすることで迅速な対応に結び付いた。本研究班並びに各地衛研における努力によって MLVA を実施する地衛研が増えつつある。しかしながら、病原体サーベイランス並びに情報共有システム構築には、病原体解析手法の普及、整備、精度管理、データ解析及び共有のためのシステム構築、技術的及びシステム的問題点の情報収集など多くの課題があり、今後も各工程において検討および改善を図っていくことが重要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

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：2019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41巻、71-72、2020年5月
2. 李謙一、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：2019年に報告された腸管出血性大腸菌集団感染事例の全ゲノム配列解析。IASR、第41巻、70-71、2020年5月
3. Izumiya H, Lee K, Ishijima N,

Iyoda S, Ohnishi M. Multiple-Locus
Variable-Number Tandem Repeat
Analysis Scheme for Non-0157 Shiga
Toxin-Producing *Escherichia coli*:
Focus on Serogroups 0103, 0121,
0145, 0165, and 091. Jpn J Infect
Dis. 2020 Nov 24;73(6):481-490.

2) 学会発表等

なし

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

3. その他

なし

【別紙】

MLVA 法解説

国立感染症研究所

細菌第一部

はじめに

ここでは腸管出血性大腸菌 O157 など、多くの細菌に対して使われている MLVA 法（エムエルブイエー法、ムルヴァ法などと呼ばれます）の原理と活用について比較的わかりやすくまとめました。みなさまのご理解の一助になれば幸いです。

MLVA 法とは

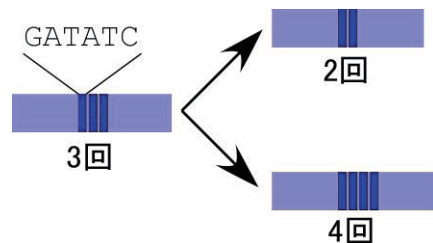
- Multilocus variable-number tandem-repeat analysis の略です。
- 日本語では「反復配列多型解析」と呼びます。
- 細菌のゲノムにある短い縦列の繰り返し構造（リピート）に着目した方法です。

例：GATATC GATATC GATATC

この場合、GATATC という 6 塩基のリピート単位が 3 回繰り返し

- ゲノムにはこのようなリピートが複数箇所あります。
- 複製（菌が増える）時、リピートの伸び縮みが生じます。

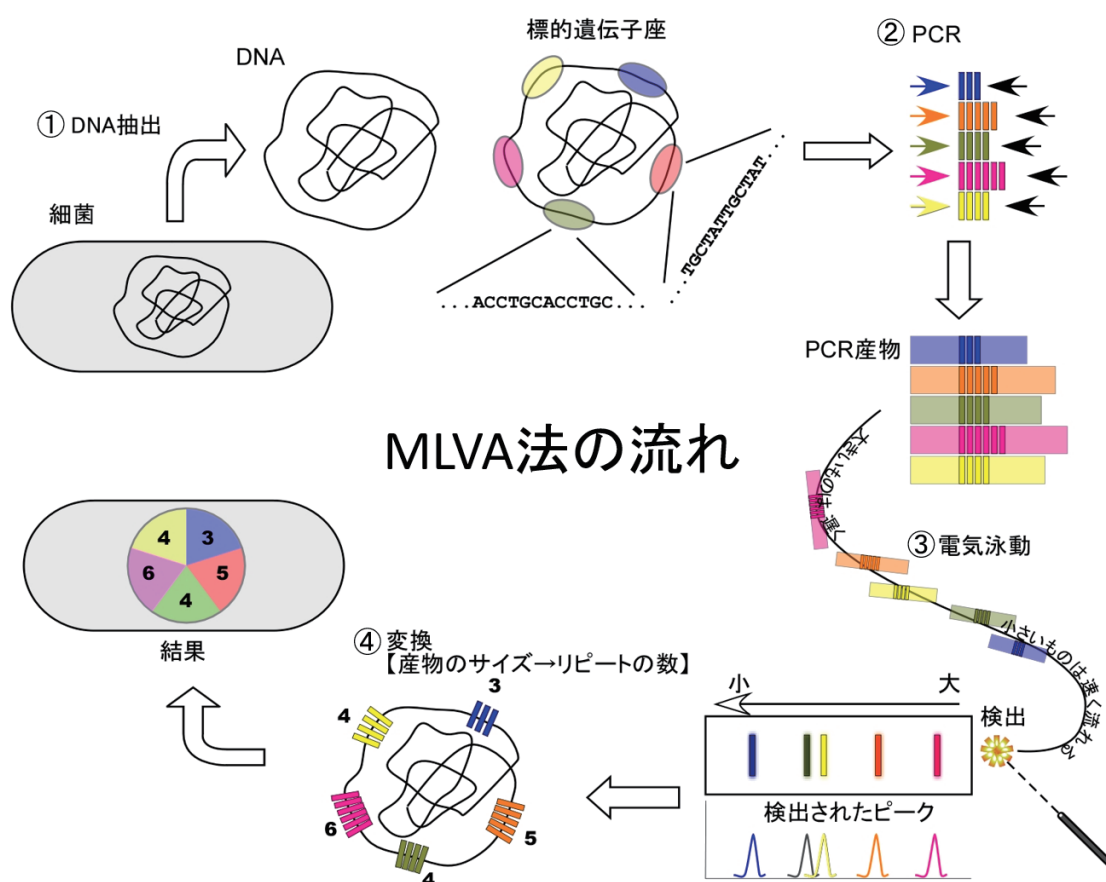
3 回から → [複製] → 2 回になったり、4 回になったりします。



- リピート数の違いから菌株が同じか違うかを調べます。
- MLVA 法は菌株が同じか違うかを遺伝子レベルで調べる分子疫学解析手法の一つです。

MLVA 法の流れ

1. 菌から DNA を取り出します (DNA 抽出)。
2. 抽出した DNA にある MLVA の標的遺伝子領域 (標的遺伝子座) に対応するプライマーを使って PCR を行い、標的部分を増幅します。
3. 増幅された PCR 産物を電気泳動によって分離します。大きいサイズの産物は遅く、小さいサイズの産物は速く流れ、検出器で順番に検出されます。
4. 検出された産物の大きさから、それぞれの遺伝子座に何個のリピートがあるかを割り出します。結果としてリピートの数字の組み合わせが得られます。

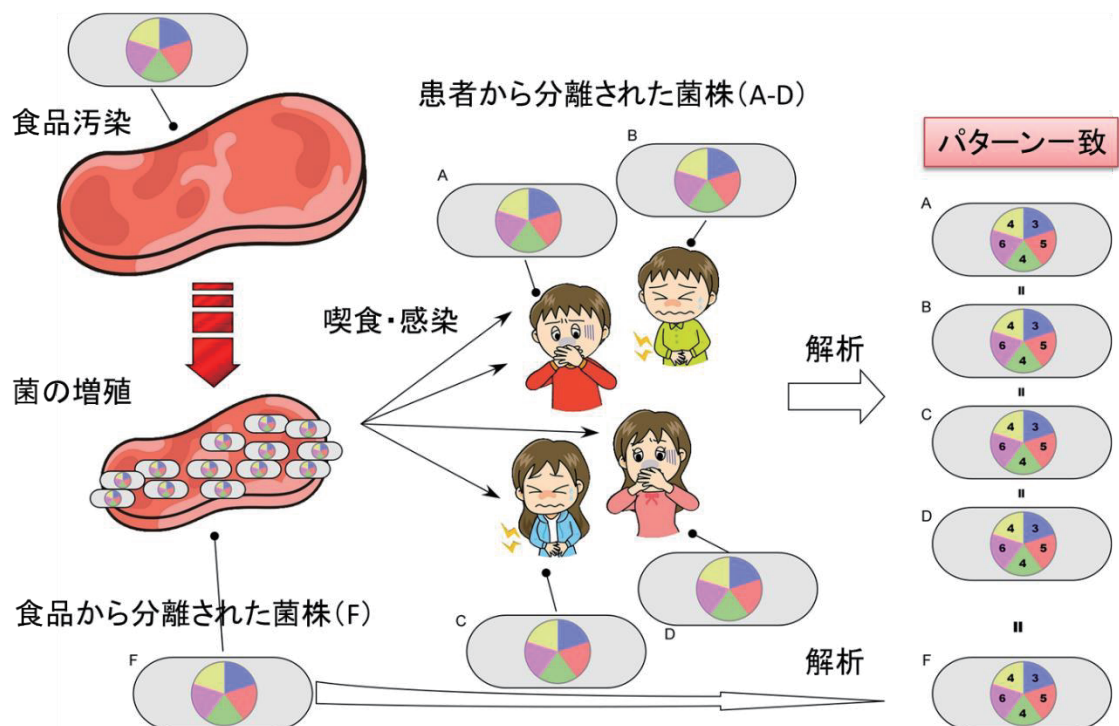


MLVA 法の活用

得られた数字の組み合わせ（パターン）は同じ大腸菌の中でも異なります。

パターンが近いほど菌同士の由来が近いことを表します。食中毒などの事件が発生しますと、同じお店、あるいは同じメニューの品を食べた患者さんから同じパターンを持つ菌（菌株）が採れます。また、原因施設となったお店で使われていた食品からも同じパターンを持つ菌株が取れることがあります。こうして関係した人や物から同じパターンの菌株が採れるということは、感染源を強く示唆することにつながります。

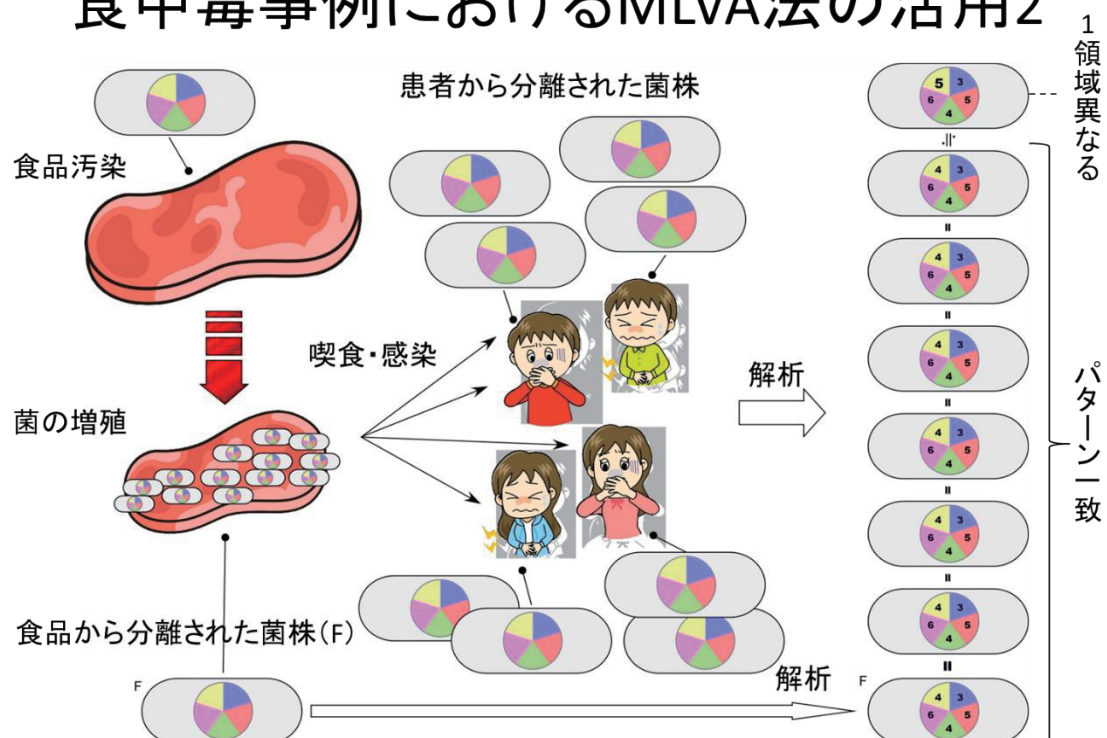
食中毒事例におけるMLVA法の活用



MLVA 法の活用その 2

ここではもう少し複雑な例を紹介しましょう。MLVA 法で使われている遺伝子座にはリピート構造があり、これは菌が増える際に変化します。菌は食品の中でも増えますし、感染した患者さんの中でも増えます。多くの場合、同じ食中毒の事例の中では患者さん、原因食品から同じパターンの菌株が採れるのですが、中には菌が増えている間にリピート数が変化したものが採れる場合があります。変化のほとんどは対象遺伝子座のうちの 1 つが変わっているだけなので、こうした菌株も由来は同じものと判断します。

食中毒事例における MLVA 法の活用 2

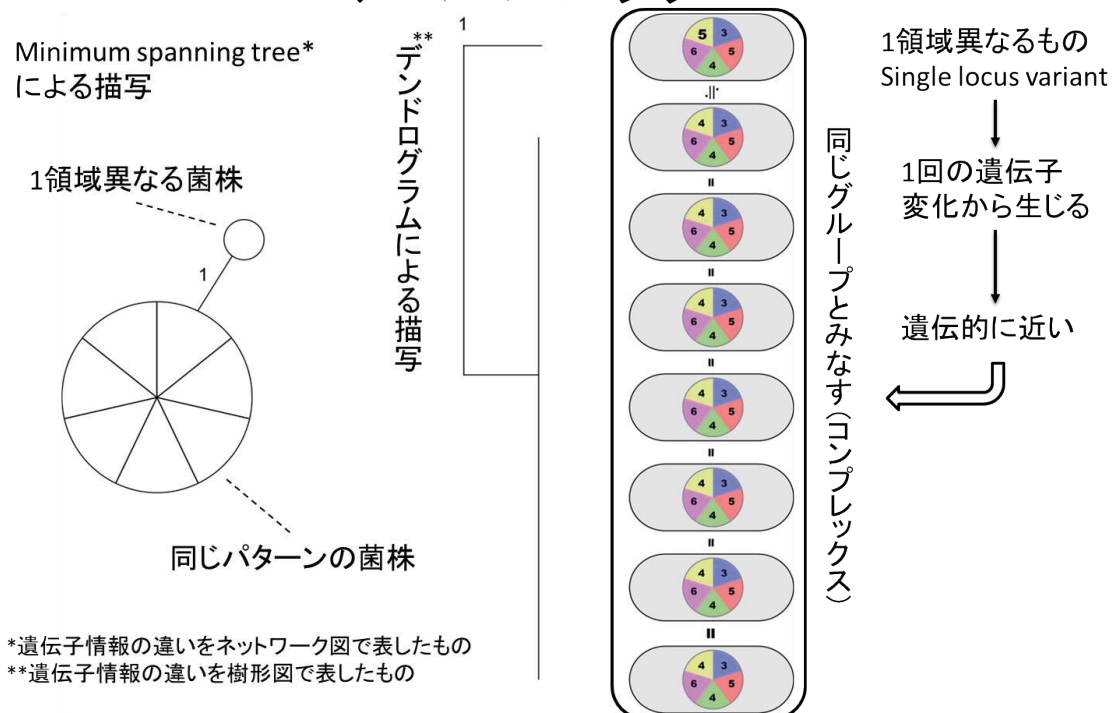


MLVA 法の活用その 2（続き）

こうした 1 領域だけが違うものを single locus variant と呼びます。先ほどお話ししましたように、これは菌が増えている間に遺伝子が 1 回変化しただけにすぎないので遺伝的に近いと考えます。こうした類似したパターンの株をまとめて「コンプレックス」と呼び、これは多くの食中毒事例で観察されます。

MLVA のパターンに基づいて菌株同士の関係性を表すようにした Minimum spanning tree やデンドログラムと呼ばれる図では、コンプレックスに含まれる菌株は近くに集積してクラスターを形成します。

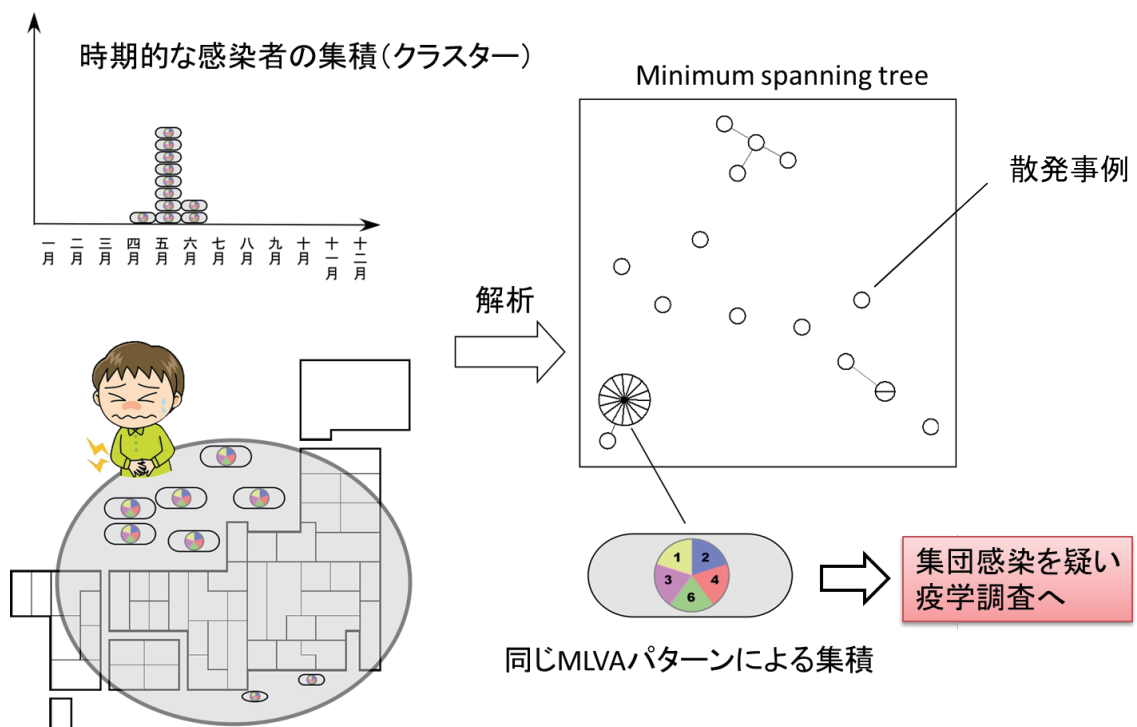
類似したパターンの株 →コンプレックス



MLVA 法の活用その 3

毎年 3000 人以上の人が腸管出血性大腸菌に感染しますが、MLVA 法で解析すると多くのパターンが見られ、その数は 1000 ぐらいになります。その 3~4 割が Minimum spanning tree 上でクラスターを形成します。この中には食中毒の株も含まれますが、一見無関係の人の株が含まれることもあります。こうした人たちが事件と関係ないかどうかを調べるきっかけに MLVA 法が活用されることもあります。

MLVA法の活用(クラスター探知)



MLVA 法活用のまとめ

- ・ 「患者さんからの菌株と、食品からの菌株が同じ、あるいは同じと考えてもよいぐらい似ている」とわかることで、その食品を原因とした食中毒であることが明確になります。
- ・ 食品の原材料、生産環境などを調べて、さらに同じ菌株がとれれば、原因となった菌がどこから来たのかわかります。（さかのぼり調査と言います）
- ・ 同じ MLVA パターンの菌に感染した複数の患者さん（クラスター）から何を食べたか聞き取り調査をします。そこから浮かび上がった共通食品について、さらにさかのぼり調査をします。こうした調査によってクラスターを発生させた原因食品がわかることもあります。（疫学調査と言います）

疫学調査について

- ・ 食中毒において疫学調査は大変重要です
- ・ おひとりの情報では原因がわからなくても、何人かの情報をあわせることで原因がわかることがあります
- ・ どこで何を食べたか思い出せましたら調査員にお話してください
- ・ ご協力をお願いいたします



謝辞

本解説は厚生労働科学研究費補助金の支援を受けて作成しました。

イラスト素材：素材工場、イラスト屋

文責：国立感染症研究所 細菌第一部 泉谷秀昌

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2年度研究分担報告書
「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 2020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231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 1,295株、026 459株、0111 85株、0103 162株、0121 58株、0145 16株、0165 4株、091 31株、計2,110株を解析し、それぞれ、555、179、54、52、25、12、4、27の型が同定された。0121を除き、シンプソンの多様性指数(SDI)は0.944-1と比較的高かった。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445株であった。当該コンプレックスは0157 13種類、0103 2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 7種類、026 1種類、0111 1種類、0103 1種類、0121 1種類であった。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、データの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、さらにシステムの検討・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发出された事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」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2020年分離株に対してMLVA法及びPFGE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、2020）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。

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

2020年分離株について、2021年2月24日現在の結果を示す。

1. PFGE

231株を解析した。菌株数が多かった0群（PCR法による0gを含む。）は0115が17株、05が15株、0186が15株、08が13株、0128が10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 1,295株、026 459株、0111 85株、0103 162株、0121 58株、0145 16株、0165 4株、091 31株、計2,110株をMLVA法で解析した。それぞれ、555、179、54、52、25、12、4、27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、1-2機関のみで検出された型が5種類（20m2053、18m0040、20m2094、20m0306、15m2189）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。2020 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 445 株であった。このうちコンプレックスは 15 種類（0157 が 13 種類、0103 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 11 種類（0157 が 7 種類、026 が 1 種類、0111 が 1 種類、0103 が 1 種類、0121 が 1 種類）であった。

主要な広域株について、週別の検出状況を図 1 に、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 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 2020 年は 24 機関から MLVA データの送付があり、590 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 590 株のうち、307 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。研究分担者に当該システムの ID を配布し、システムの試行及び検討を行った。

D. 考察

新型コロナウイルス感染症の影響からか、全体的な菌株数は 2 割ほど減少した。MLVA 法による EHEC 分離菌株の解析から、主要 3 血清群 0121 を除き、いずれの血清群においても SDI が比較的高かった。検出数上位の MLVA 型では 0157 が 10 種類と高かった。昨年同様、大規模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。広域株ではないが、集団事例に関連した型が検出数上位の株で散見された。

広域株は 2-3 週間に集中的に検出されたもの、4 週以上にわたって検出されたものと様々であった（図 1）。これらの地理的分布も様々であった。

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。今後データを受け付けるユーザーを増やし、その運用を試験し、当該システムを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：2019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41巻、71-72、2020年5月
2. Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, Ohnishi M. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Scheme for Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Focus on Serogroups O103, O121, O145, O165, and O91. Jpn J Infect Dis. 2020 Nov 24;73(6):481-490.

2) 学会発表等

なし

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. 2020 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	1295	555	0.993
026	459	179	0.978
0111	85	54	0.975
0103	162	52	0.944
0121	58	25	0.877
0145	16	12	0.958
0165	4	4	1.000
091	31	27	0.989

表 2. 2020 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
19m0513	0157	VT1+VT2	64	24	20c030
20m2053	026	VT1	47	1	20c210
18m0040	0157	VT1+VT2	28	2	
20m0368	0157	VT2	27	13	20c041
20m2094	026	VT1	25	1	20c209
20m0245	0157	VT1+VT2	24	4	20c038
20m0105	0157	VT2	24	10	20c010
20m0243	0157	VT1+VT2	21	9	20c028
20m0306	0157	VT2	20	1	20c032
16m4013	0103	VT1	20	7	20c403
20m0148	0157	VT2	19	10	20c019
20m0186	0157	VT1+VT2	19	13	20c023
18m0450	0157	VT1+VT2	19	4	
17m5022	0121	VT2	19	3	
15m2189	026	VT1	19	1	
18m4005	0103	VT1	19	9	

図 1. 広域株の検出状況（週別）。点線は送付株全体（縦軸右）。

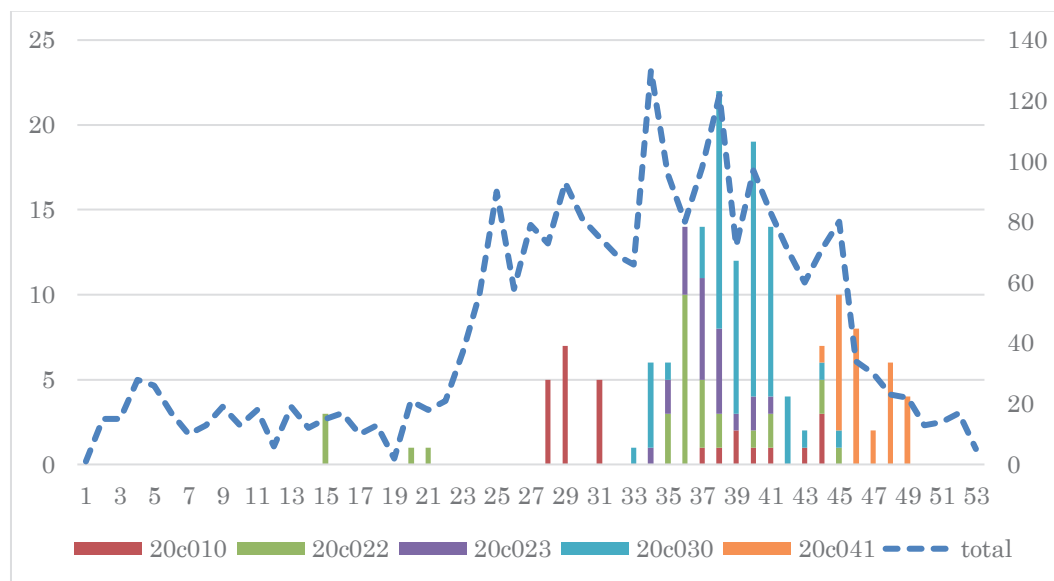
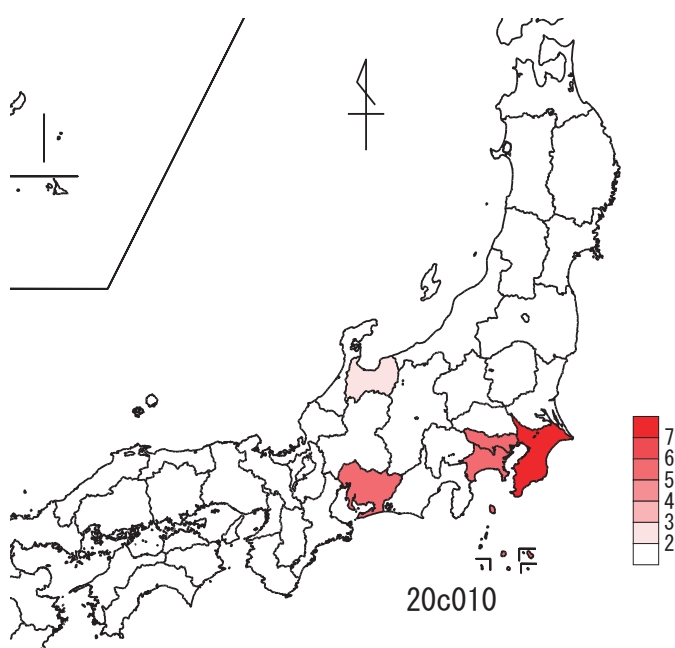
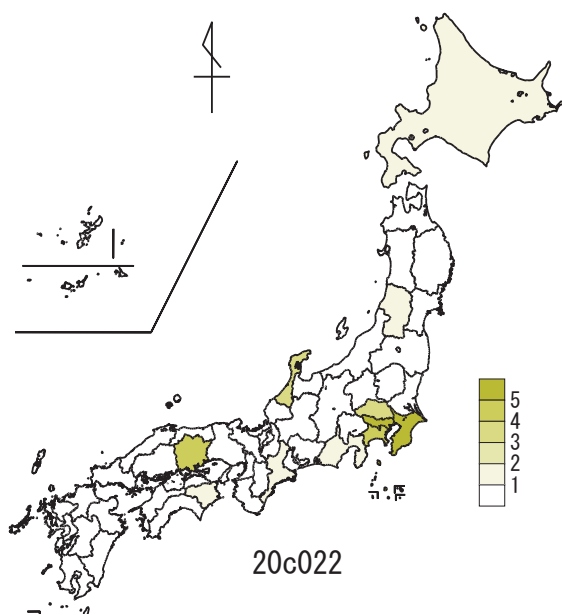


図 2. 広域株の地理的分布

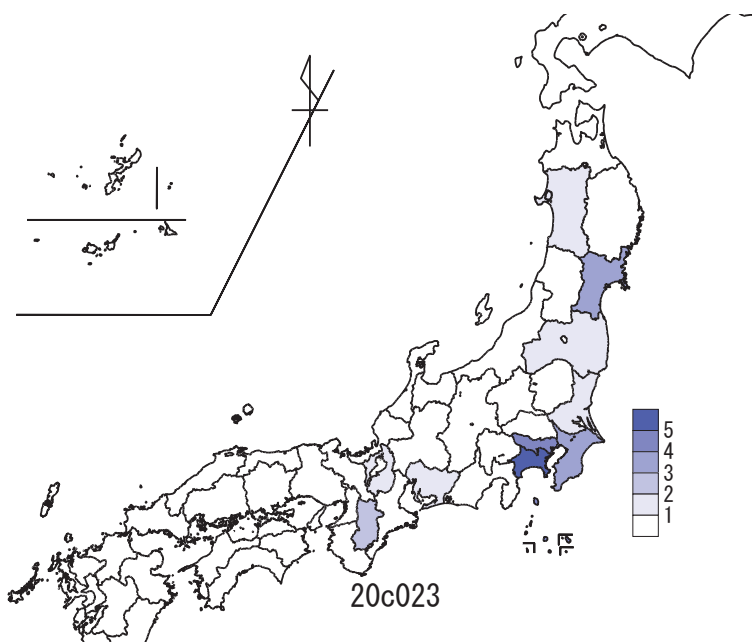
a) 0157 VT2 20c010 （27 株、10 機関）



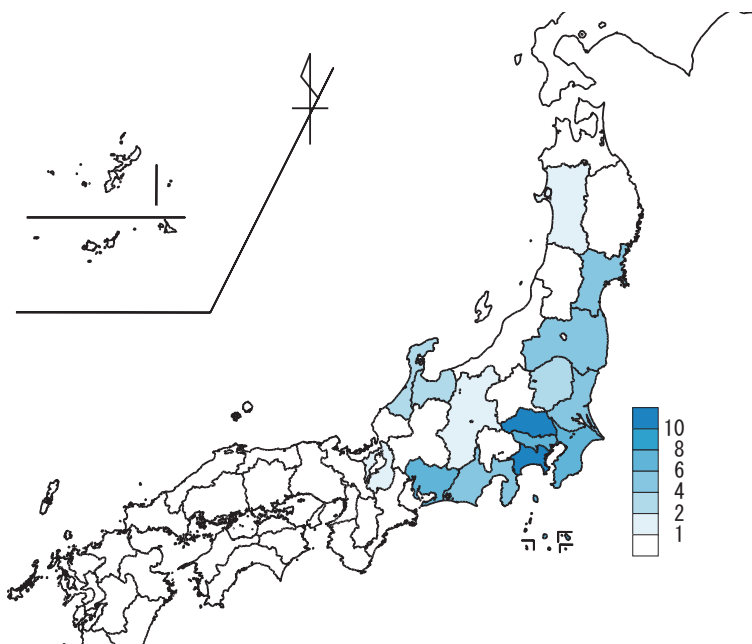
b) 0157 VT1+VT2 20c022 (31 株、13 機関)



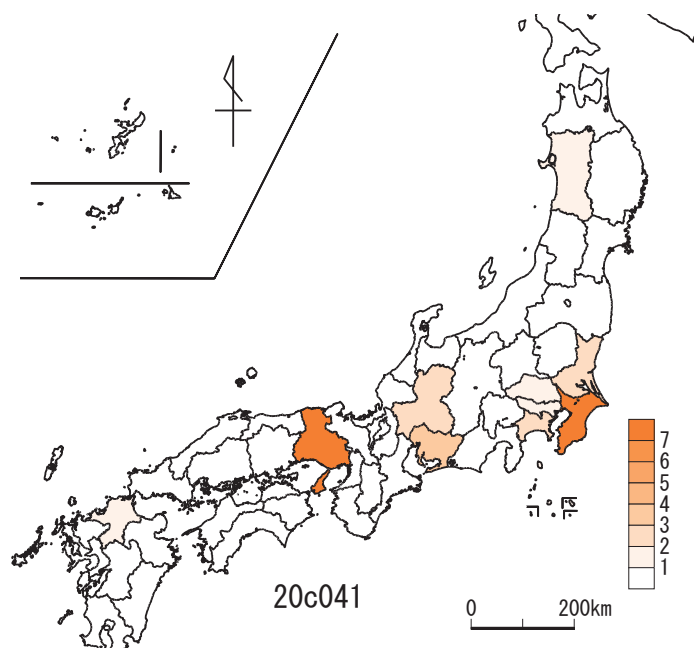
c) 0157 VT1+VT2 20c023 (22 株、13 機関)



d) 0157 VT1+VT2 20c030 (66 株、24 機関)



e) 0157 VT2 20c041 (29 株、13 機関)



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
「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」

(R2-新興行政-一般-001)

研究分担報告書

分担研究課題 「全ゲノム解析による O157 の分子疫学的解析」

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）、
地方衛生研究所等

研究要旨

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC）のサーベイランスにおける全ゲノム配列（whole-genome sequence: WGS）解析の有効性を検証するために、EHEC O157 の WGS 解析を行った。2020 年に分離された 202 株の O157 菌株の WGS 配列を新たに解読し、計 1146 株の WGS から単一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）を抽出した。multi locus variable tandem repeat analysis（MLVA）と SNP の比較を行ったところ、一部の例外を除き、MLVA で同一型または 1 座位のみ異なる型では少数の SNP のみ認められることが確認された。上記の解析結果をもとに、2020 年に報告された 3 事例の MLVA コンプレックスについて WGS 解析を行い、1178 株分の SNP データベースから近縁株を抽出した。この結果、2 事例ではコンプレックスとなった株のみが 10 か所以内の SNP を有していた。一方、コンプレックス 20c022 では、100 株以上の近縁株が抽出され、国内で近縁性の高い集団が流行型となっていることが判明した。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は食品を媒介として人へ感染し、感染に必要な菌量も少ないことから、しばしば広域食中毒の原因となる。現在、同菌感染症の早期検知や原因の究明を目的としたサーベイランスでは、multi locus variable tandem repeat analysis（MLVA）やパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法といった分子型別手法を用いた菌株間の比較が行われている。近年、高速シーケンサーの実用化によ

り、集団感染等の調査に全ゲノム配列（whole-genome sequence: WGS）を用いた解析が取り入れられつつある。これまでの研究によって、EHEC O157 においては MLVA と single nucleotide polymorphism（SNP）解析は高い相関性を有することが示されている。本年度はそれを検証するためにより網羅的に国内株の解析を行った。また、これまでに確立した SNP データベースを用いて、2020 年に多数報告された MLVA 型の SNP 解析を行い、近縁株の抽出や関連性の解析を行った。

B. 研究方法

2020 年 1 月から 8 月に分離された EHEC O157 202 株（150 種の MLVA 型）について、ゲノム DNA 抽出を行い、Nextera XT DNA Library Prep Kit（illumina）または QIAseq FX DNA Library Kit（QIAGEN）を用いてライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを使用して、HiSeqX（illumina）によってペアエンドシーケンシング（150-mer×2）を行った。得られたショートリードは、これまでに感染研・細菌第一部で既に解読した計 944 株の WGS と合わせ、BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインにて SNP を抽出し、MLVA 型別との比較を行った。

また、2020 年に分離株数の多かった 3 種の MLVA コンプレックス（20c006, 20c020, および 20c022）について、これまでに感染研で SNP 情報をデータベース化した O157 計 1178 株から近縁な株を抽出した。先行研究では、集団感染由来株は 0-7 か所の SNP が存在することが知られているため、20c006 および 20c020 では SNP が 10 か所以内の株を抽出した。一方、20c020 では中心となる MLVA（16m0039）において、同一型でも 14 か所の SNP が存在したことから、2020 年に分離された 16m0039 の株から 14 か所以内の SNP が存在する株を抽出した。

C. 研究結果

1. 国内 EHEC O157 1,146 株における MLVA と SNP 解析の比較

国内で 2020 年に分離された EHEC O157 計 202 株と 2019 年までに分離され

た 1,146 株における MLVA と SNP 解析との比較結果を図 1 に示す。これまでは、集団感染関連株や分離数の多い MLVA 型を中心に解析を行ってきたが、本年度は散発事例（150 種の MLVA 型のうち、70 種は同一型が分離されていない散発事例）を含めた解析を行い、より網羅的に比較を行った。MLVA の差異別に見た SNP の平均値は、同一型、single locus variant, double-locus variant, triple-locus variant (SLV, DLV, TLV) でそれぞれ 2, 6, 12, 20 であり、MLVA で異なる座位が増えるにつれて SNP が蓄積する傾向が見られた。一方で、SLV でも 100 か所以上の SNP が存在する例や、11 か所の MLVA 座位が異なる場合にも SNP が存在しない例も認められた。今後、これらの株の関連性や特徴的な MLVA 座位等について、詳細に検討する必要がある。

2. 2020 年集団感染事例の解析

EHEC O157 を対象に 2020 年に同一 MLVA 型が多数発生した 3 種の MLVA コンプレックスについて、これまでに構築した EHEC の SNP データベースから近縁株を抽出して解析を行った。

コンプレックス 20c006 は、岡山県および栃木県で計 12 株が報告され、20m0067 および SLV、DLV からなるコンプレックスを形成していた。そこで、20m0067 の株（J2020-1）を基準として、SNP が 10 か所以内の株を抽出した。その結果、抽出された株はいずれも 20c006 に含まれる SLV または DLV であり、株間の SNP は最大で 2 か所であった（図 2）。

コンプレックス 20c020 は、主な MLVA

型を 20m0041 とし、SLV である 20m0198 から構成され、全国的に 17 株が報告されている。20m0041 の菌株を基準に SNP が 10 か所以内の株を抽出したところ、20m0041 の 2 株を含む計 6 株が抽出された。20m0041 の菌株間の SNP は 0 または 1 か所と、非常に近縁であった。その他の近縁株は、2019 年以前に分離された MLVA で 1 から 3 座位が異なる株であったが、18 か所以上の SNP が存在した（図 3）（近縁株で再解析を行ったために 10 か所以上の SNP が抽出された）。

コンプレックス 20c022 は、16m0039 を主な MLVA 型とし、全国的に 26 株が報告されている。同 MLVA 型では、同一型でも 14 か所の SNP が存在する場合があったことから、データベースから 14 か所以内の SNP が存在する菌株を抽出した。その結果、計 106 株が近縁株として抽出された（図 4）。これらの菌株には、2013 年分離株から 2020 年分離株までが含まれており、最大で MLVA 型が 5 座位異なる株が含まれていた。

D. 考察

これまでの EHEC O157 における MLVA と SNP 解析の比較では、集団感染株等の分離数の多い型を主な対象としてきたが、本年は散発事例株を含めた解析を行い、より網羅的に MLVA と SNP 解析の比較を行った。その結果、大部分の菌株間においては、これまでの解析と類似の傾向が見られた。すなわち、数か月以内に分離された同一型および SLV は、最大でも 10 か所程度の SNP のみ有する、という傾向であった。しかしながら、SLV でも数十か所の

SNP が存在する事例や、10 座位以上の MLVA 座位が異なっているにもかかわらず SNP が存在しない事例等の例外的な事例が多く見られた。これらの事例については、特定の座位が関与している可能性や、異なる座位のリピート数の差などをより詳細に検討する必要がある。

2020 年に流行した MLVA コンプレックスの解析では、20c006 および 20c020 の事例では、コンプレックスとなった株のみが SNP でも近縁株となった。これらの結果は、MLVA で差異の大きい株間や、分離日が離れている類似型の株間では、SNP が多数存在する場合がある、というこれまでの知見と一致するものであった。

一方 20c022 の事例では、ごく少数の SNP (<14 か所) のみ存在する近縁な集団が、少なくとも 2013 年から国内で継続的に分離されていることが明らかとなった。本集団は、今回の解析株の約 9%を占めることから、国内 EHEC 制御の上で重要であることが示唆された。また、本集団の菌株については MLVA が類似していても SNP が多数存在する場合があります、MLVA の変異速度が遅い可能性がある。

E. 結論

本研究では、国内 EHEC O157 の網羅的ゲノム解析によって、MLVA と SNP 解析の関係性がより詳細に明らかとなった。また、一部で遺伝的近縁性の高い集団が継続的に国内で流行していることが明らかとなった。今後、このような流行型が他に存在するか探索するとともに、流行型の由来や分布について明らかにすることが、より効果的な EHEC 制御につながる

と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

なし

2) 学会発表

なし

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

図 1. MLVA と SNP の関連性

MLVA の異なる座位数別に見た SNP の分布を箱ひげ図で示す。

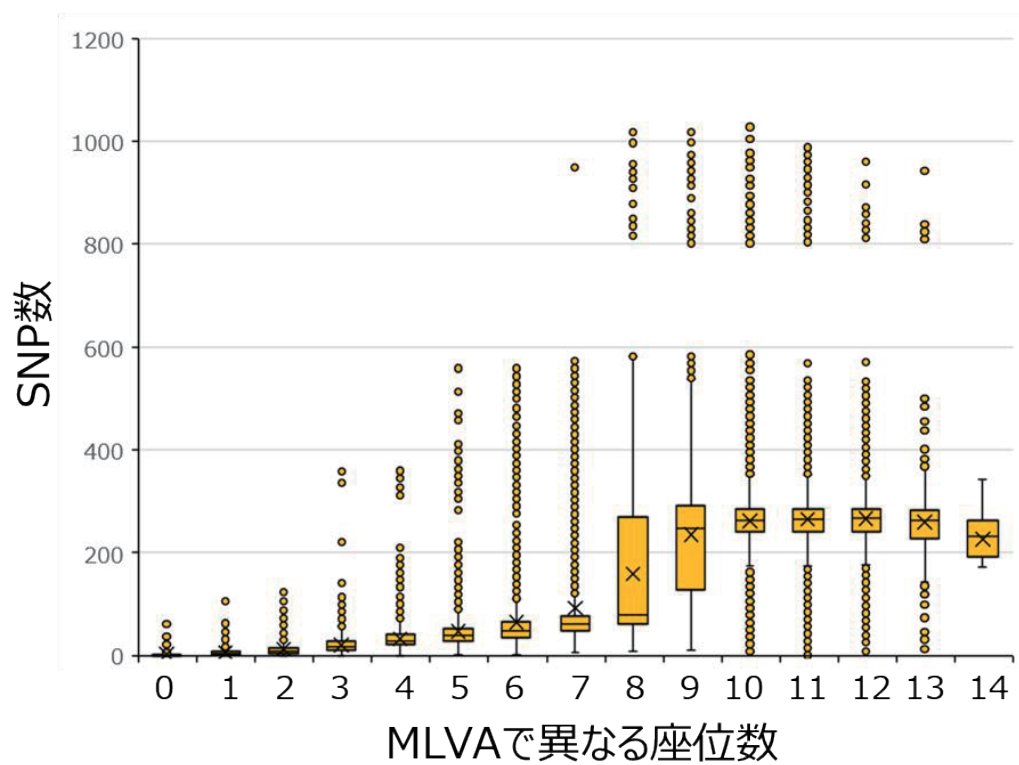


図 2. 20c006 における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 20m0067 と異なる MLVA 座位数を示す。

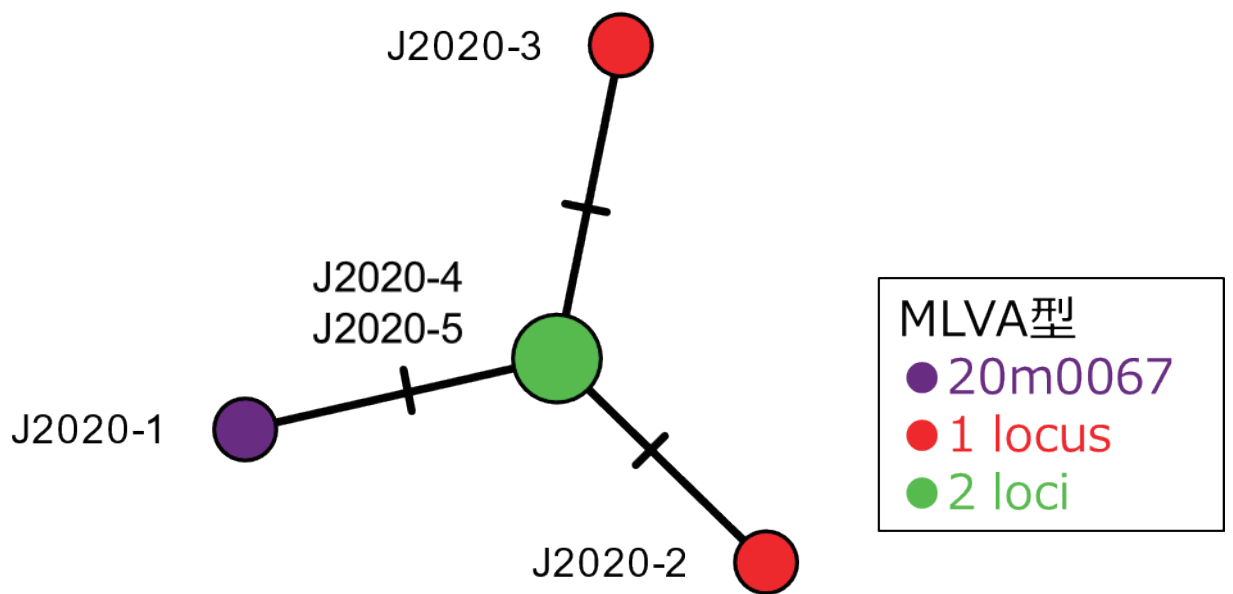


図 3. 事例 B における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 20m0041 と異なる MLVA 座位数を示す。

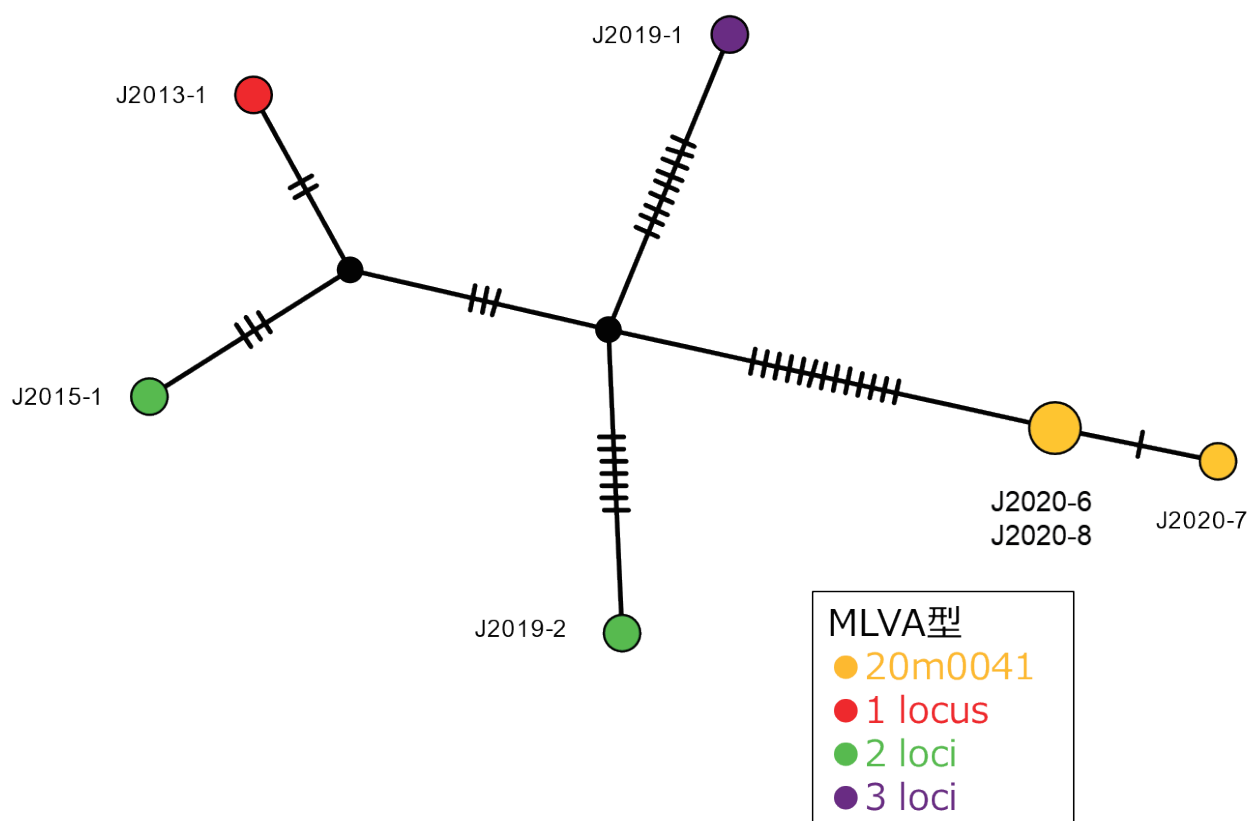
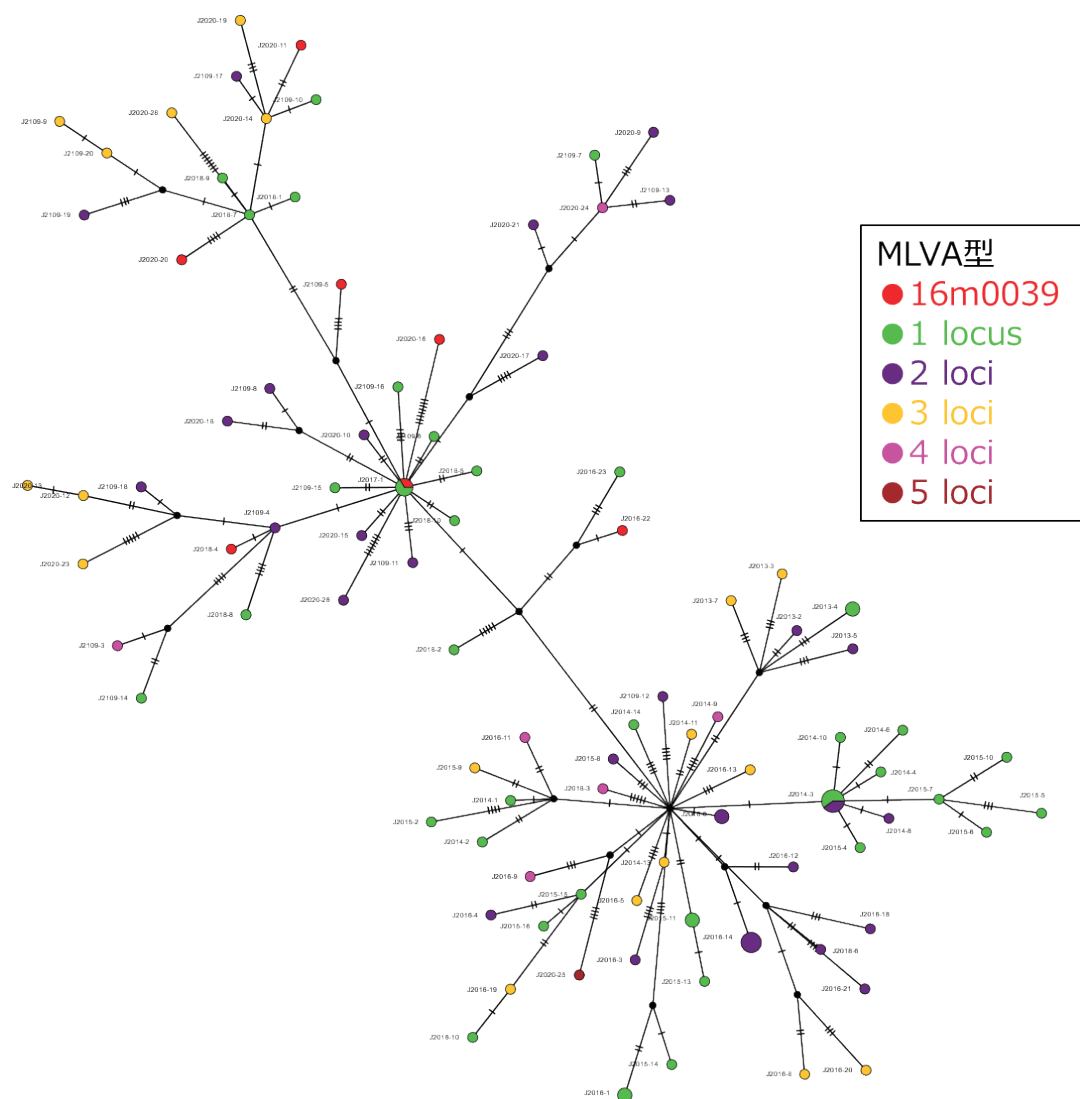


図 4. 事例 B における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 16m0039 と異なる MLVA 座位数を示す。



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 2 年度 分担研究報告書

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

研究分担者	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	森本 洋	北海道立衛生研究所
	小川 恵子	北海道立衛生研究所
	三津橋 和也	北海道立衛生研究所
	石黒 真琴	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上 剛志	青森県環境保健センター
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	橋本 恭奈	青森県環境保健センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	山下 裕紀	岩手県環境保健研究センター
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	山谷 聡子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	賀澤 優	福島県衛生研究所
	木村 有紀	新潟県保健環境科学研究所
	須藤 拓大	新潟市衛生環境研究所

研究要旨

平成 30 年 6 月 29 日付け事務連絡「腸管出血性大腸菌（以降、EHEC）による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により遺伝子検査手法は MLVA 法に統一化するよう通知が発出されてから、2 年が経過した。本通知もあり MLVA を導入する地方衛生研究所（以下地衛研）は増えており、令和 2 年 12 月現在、北海道・東北・新潟ブロック内の地衛研では、導入予定の 3 施設を含めると 9 施設で MLVA 実施可能となっている。MLVA の結果の信頼性を確保するため、ブロック内において精度管理を実施した。また、ブロック内の EHEC 担当者の連携を深め、感染症・食中毒事例や検査法等について情報を共有するため地全協（地方衛生研究所全国協議会）Webex 会議室を利用し研修会を 2 回開催した。

各施設により、機器や試薬の安定した条件をみつけることが信頼性の確保された結果をだすために重要と言われている。増幅効率のよい PCR 試薬（Platinum

MultiplexMaster Mix : ThermoFisher) により、判定に苦慮する「低いピーク」が改善されたと研修会で報告があり、PCR 試薬により安定した MLVA データが確保されるのであれば、ひとつの条件として検討されと考えられた。

A. 研究目的

ブロック内の 12 地衛研で、EHEC の MLVA を実施しているのは 6 施設である。加えて、3 施設が令和 3 年度以降導入を予定しており計 9 施設が MLVA 実施可能となっている。MLVA の精度確保の取組を促し信頼性を確保することを目的に、精度管理を実施した。

また、ブロック内の EHEC 担当者の連携を深め、事例報告及び検査法について情報を共有するため、研修会を開催した。なお、研修会の会場は新型コロナウイルス感染症に配慮し、地全協（地方衛生研究所全国協議会）Webex 会議室を利用し 2 回開催した。

B 研究方法

1. 「平成 2 年度北海道・東北・新潟ブロックの腸管出血性大腸菌 MLVA の精度管理」の実施

1) 参加は任意とし、12 施設中 7 施設が参加した。MLVA を実施している 6 施設と導入予定の 1 施設であった。

2) 試料は、岩手県内で 2020 年に分離された EHEC4 菌株（①～④に示す）の DNA 抽出液（抽出キット使用、濃度は 6～11ng/ μ L）を、参加希望の施設に送付した。なお、導入予定の地衛研 2 施設にも確認用の試料として送付した。

① O157VT1VT2

② O157VT2

③ O26VT1

④ O111VT1

3) 検査方法は、各施設で実施している方法で行い、各 17 遺伝子座の繰り返し配列数を報告することとした。

4) MLVA に使用する試薬や機器、昨年度と変更した点、検査で苦慮していることについてアンケートを実施した。

5) 各施設の結果を国立感染症研究所（以降、感染研）の結果と比較することで解析した。

2. 「令和 2 年度第 1 回北海道・東北・新潟ブロック EHEC 担当者研修会」の開催

1) 日時：

令和 2 年 12 月 2 日 11:00～12:00

2) 場所：全地協 Webex 会議室

3) 参加者：9 地衛研 14 名

4) 内容

① 「EHEC 分子疫学解析実施状況アンケート」のブロック内の回答まとめ

② 「各種 kit による STEC MLVA
～各 kit で結果に差が出るか？～」

北海道立衛生研究所

三津橋 和也

---資料 1---

3. 「令和 2 年度第 2 回北海道・東北・新潟ブロック EHEC 担当者研修会」の開催

2) 場所：全地協 Webex 会議室

3) 参加 11 地衛研 18 名

4) 内容

①「腸管出血性大腸菌の MLVA 法について」

講師 国立感染症研究所

細菌第一部室長 泉谷 秀昌

---資料 2---

② 事例発表

EHEC に関する検査法、事例などについて演題を募集し、下記の 2 題の申込があった。

---資料 3、4---

i 「岩手県において散発発生した

O103VT1 による EHEC 感染症」

岩手県環境保健研究センター 岩渕 香織

ii 「β-グルクロニダーゼ (GUD) + EHEC O157 検査における注意点について」

北海道立衛生研究所 三津橋和也

③ アンケート結果報告

仙台市において、EHEC 増菌培養液の VT 遺伝子スクリーニング PCR の結果は VT1(+)/VT2(-)、分離された菌株は VT1(+)/VT2(+) という事例があり、増菌培養液からも VT2 遺伝子を PCR で検出すべく DNA 抽出法やプライマーについて検討したが、簡単で安価にできる解決策がなく検査法を模索しているとの報告があった。そこで、ブロック内地衛研で行っている DNA 抽出法等に解決策があればということ増菌培養液の VT スクリーニング法のアンケートを実施した。回答は別紙 1 のとおり。

※「糞便増菌培養検体からの VT 遺伝子検出スクリーニング検査について」

仙台市衛生研究所 山田香織

---資料 5---

C. 研究結果

1. MLVA の精度管理

試料①O157VT1/VT2、②O157VT2 については、7 施設が一致し、感染研の結果とも一致した。試料③O26VT1 と④O111VT1 については、遺伝子座 O157-36 が 1 施設だけリピート数 6 と回答し、6 施設は「-2 (ピーク無)」と報告が異なっていた。感染研の回答は、「-2」であり、O157-36 領域に非特異ピークが発生しピーク検出と判定したと考えられた。低いピークでも Bin の範囲にピークが入った場合の判定は難しいと考えられた。(表 1)

MLVA 精度管理に係るアンケートでは、令和元年度と同じく全ての施設でポリマーやバッファーなどの消耗品は、施設内で共有していた。苦慮していることとして、「非特異ピークの判定」、「遺伝子の順番が GeneMapper で表示される順番と感染研に報告する様式と異なる」、「フラグメント解析の消耗品を新しい状態に保ちたいが、使用頻度や予算の兼ね合いもあり難しい。」、「MLVA 実施の予算、中核市分の菌株の扱い、分析実施後の結果報告や MST の説明など、MLVA に関する事項全般をどのように説明したら行政の感染症担当者に理解してもらえるか悩んでい

る。」と検査担当者だけでは解決できない問題もあると考えられた。

2. 「令和2年度第1回北海道・東北・新潟ブロック EHEC 担当者研修会」

1) 「EHEC 分子疫学解析実施状況アンケート」回答によると、MLVAを導入する地衛研が増えているが、PFGE、IS-PSは引き続き実施されている。また、現在分担研究者が使用している Web 上で MLVA 型を付与される登録システムについては、MLVA 導入の9地衛研で使用する希望があり、システムの利用が期待される。

2) 「各種 kit による STEC MLVA

～各 kit で結果に差が出るか?～」

下記の3つのPCR試薬を比較した結果、Thermo Platinum Multiplex PCRはピークが安定して高く検出された。

① QIAGEN Multiplex PCR Plus

② QIAGEN Multiplex PCR

③ Thermo Platinum Multiplex PCR

※仙台市衛生研究所からも、3つの試薬を比較したところ、ピーク低めの EH111-8、O157-9、O157-34についても安定したピークが立ち上がるとの報告があった。

3. 「令和2年度第2回北海道・東北・新潟ブロック EHEC 担当者研修会」

1) 講演「腸管出血性大腸菌の MLVA 法について」

基本的な MLVA の原理方法から解析結果の見方、EHEC の発生状況や、広域散発事例など最新情報について講演があった。また、Complex 等の広域事例については時期や地域などの疫学情報が合致することが重要であるという

ことであった。

2) 事例発表

① 「岩手県において散発発生した

O103VT1 による EHEC 感染症」

岩手県では2020年にO103VT1によるEHEC感染症が74例中18例報告された。3、6、7月の6事例について MLVA は一致 (20c401) したが、PFGE パターンは一致しなかった。ただ全体的には似ているので、大本は同じではないかと推定された (原因は不明)。

※仙台市衛生研究所から追加報告

仙台市と福島県でも O103VT1 による集団感染事例 (20c403) があった。

② 「β-グルクロニダーゼ (GUD) + EHEC O157 検査における注意点について」

北海道では、稀にβ-グルクロニダーゼ (GUD) + の EHEC O157 が検出されており (1996 年から 2020 年まで 17 例)、IS-PS ではバンドが少ない、ラムノース非分解等という特徴があり、すべての株について分子疫学解析等を行う予定である。他にも生化学的性状が例外的な EHEC も検出されたこともあり、それらに対応すべく 1 菌株に糖の配分も考慮した 8 種類の分離培地を使っている。

③ 「糞便増菌培養検体からの VT 遺伝子検出スクリーニング検査について」

アンケートの結果、回答のあった地衛研の増菌培養液からの DNA 抽出法はアルカリ熱抽出法であった。「スクリーニングであることから VT 遺伝子が検出できる程度で実施している」「感度の高いリアルタイム PCR で実施するの

かどうか」等の意見が出された。

D. 考察

MLVA 精度管理は、ほとんどの施設が一致する結果となったが、ピークが出ないローカスに発生した非特異ピークをピーク検出と判定した施設があり、bin の範囲に入った低いピークの判定は難しいと考えられた。

昨年度の MLVA 技術研修会において、MLVA の判定で共通して苦慮していたのが「低いピーク」の判定であった。増幅効率の高い PCR 試薬 (Thermo Platinum Multiplex PCR kit) を使用することで改善するとの感染研から情報提供があり、ブロック内地衛研に配布したところ、北海道立衛生研究所で、他の PCR 試薬と比較検討し、安定したピークが得られたと第 1 回研修会で報告があった。ブロック内の地衛研では、PCR 試薬の選択について検討されていくと考えられた。

今回、研修会では、培養法の話題として「 β -グルクロニダーゼ (GUD) + EHEC O157 の検査法」、PCR 法の話題として「糞便増菌培養検体からの VT 遺伝子検出スクリーニング検査」について事例発表があった。他地衛研の状況を知ることができ興味深く有意義であった。また、EHEC O103VT1 について仙台市と福島県で発生した事例や岩手県内の散发事例発生の話題では、今後ブロック内で同時期に発生した場合、由来が同一なのかなど比較の検査してみてもいいのではないかという意見が出された。

今年度の 2 回の研修会は、新型コロ

ナウイルス感染症に配慮し全地協の

Webex 会議による研修会となった。

Webex 会議室の空室状況と出席者の予定など日程調整は大変であったが、職場や自宅で参加できる、複数人で参加できる、移動の時間が不要など利点も多かった。

E. 結論

今回、MLVA についてのみ精度管理を実施した。EHEC 分子疫学解析実施状況アンケートでは、PFGE 及び IS-Printing System も利用されている。特に PFGE は O157、O26、O111 以外の血清型の EHEC やサルモネラ属菌などの食中毒菌において利用されており、今後、PFGE 及び IS-PS についても精度管理が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アンケート回答

	stx遺伝子					NGSの導入状況
	検出法	プライマー	PCR試薬	DNA抽出法	偽陰性の経験	
1 北海道立衛生研究所	リアルタイムPCR stx2が疑われる場合はPCR実施※3	TaKaRa QuickPrimer Shiga I遺伝子 QuickPrimer Shiga II遺伝子 TaKaRa QuickPrimer Shiga I遺伝子 QuickPrimer Shiga II遺伝子	リアルタイムPCR…QuickPrimerの場合はTB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) PCR (stx2f) TaKaRa ExTaq	アルカリ熱抽出 (増菌培養は保健所で実施)	有: stx2保有株はQuickPrimer, Cycleaveともに検出できず、PCRでしか検出できない。	新型コロナウイルスの関係で導入済み
2 札幌市衛生研究所	PCR	TaKaRa EHEC (VT gene) PCR Screening Set		アルカリ熱抽出	無	ウイルス検査室に導入済み
3 青森県環境保健センター	リアルタイムPCR	TaKaRa CycleavePCR		アルカリ熱抽出	無	iSeq100 2019年度導入
4 秋田県健康環境センター	PCR※1	Yamasaki, et al., 1996 TaKaRaのプライマーなど	Taq (Jena Bioscience, 販売元グライナー) Z-taq (TaKaRa)	アルカリ熱抽出	有: プライマー、サイクル数や酵素を変えて再検したりしています。	
5 岩手県環境保健研究センター	LAMP法	栄研化学 腸管出血性大腸菌検出試薬キット		アルカリ熱抽出	無	導入予定なし
6 宮城県保健環境センター	PCR	Takara EVC-1/2, EVT-1/2(VT1), EVS-1/2(VT2)	Takara Ex taq HS	アルカリ熱抽出	無	導入予定なし
7 仙台市衛生研究所	PCR	Scheutらのプライマー (病原体マニキュアル記載)	Promega Go Taq Hot Start Green Master Mix (病原体マニキュアル記載)	アルカリ熱抽出	有: キットによる抽出を検討中	
8 福島県衛生研究所	PCR	EVT-1 & EVT-2 EVS-1 & EVC-2 TaKaRa O-157(ベロ毒素1型、2型遺伝子) PCR Typing Set Plus	Takara Ex taq HS	アルカリ熱抽出法	有: 増菌液のスクリーニングPCRで(ー)となったが、分離培養で疑わしい集落にPCR実施し (+)	2021年導入予定
9 新潟県保健環境科学研究所	PCR	TaKaRa EVT-1/2(VT1) TaKaRa EVS-1/2(VT2) TaKaRa EVC-1/2 その他、変異型検出プライマー	Promega Go Taq G2 Hot Start Green Master Mix Genetics KAPA 2G Fast Hot Start Ready Mix	アルカリ熱抽出法	無	導入予定なし
10 新潟市衛生環境研究所	PCR	※2	TaKaRa EX Taq(RR001A)	アルカリ熱抽出法	無	導入予定なし

※1 食品ではリアルタイムPCR (TaKaRaのキット)

※2 大村真理, 山崎伸二, 竹田美文: 腸管出血性大腸菌のPCRによる同定. 臨床と微生物 23(臨時増刊): 813-819, 1996.

※3 stx2f Schmidt H et al., Appl. Environ. Microbiol. 2000 Mar; 66(3): 1205-1209記載のプライマー

各種kitによるSTEC MLVA

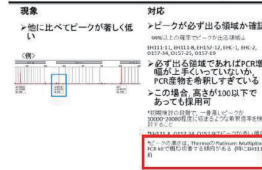
～各kitで結果に差が出るか?～

北海道立衛生研究所
三津橋 和也
mitsuhashi@iph.pref.hokkaido.jp

背景

今年1月にMLVA研修会@岩手 後に送付したppt

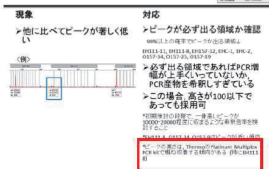
他に比べて極端に低いピークがある



背景

今年1月にMLVA研修会@岩手 後に送付したppt

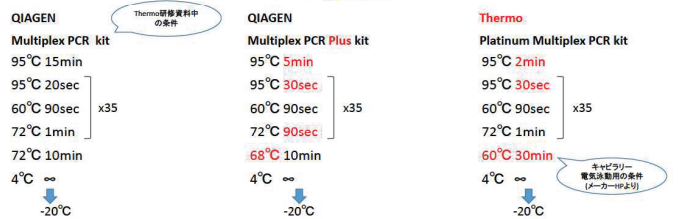
他に比べて極端に低いピークがある



今年2月に岩瀬先生からkitを送付いただいた

検証してみよう

☆protocol☆



Applied Biosystems

Platinum® Multiplex PCR Master Mix

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

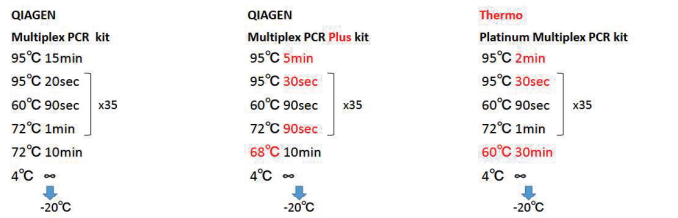
2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

2019年10月10日現在

☆protocol☆



TE 245 uL + sample 5 uL (50倍希釈) → 1 uLをフラグメント解析へ

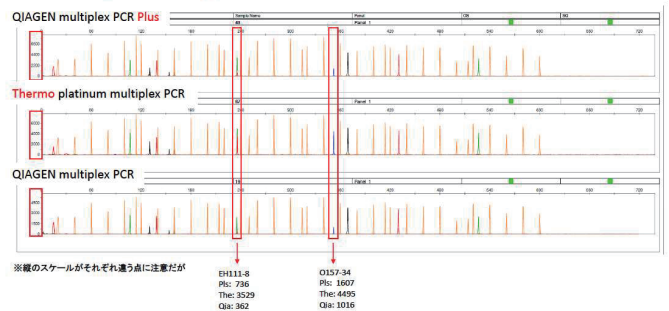
※サーマルサイクラーが1台しかないため、それぞれ別日にPCRしたものをまとめて解析

先に結論を

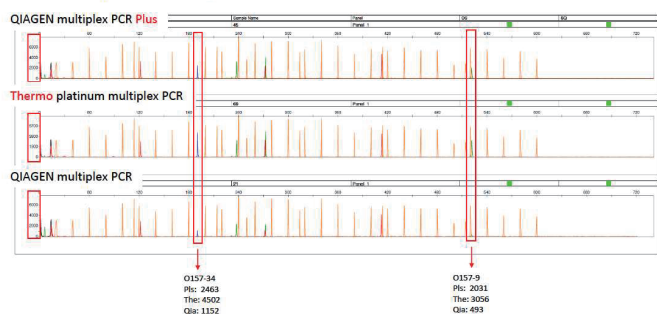
調べた限り、

Thermo品のピークの方が他のkitのものより高い傾向あり(一部)

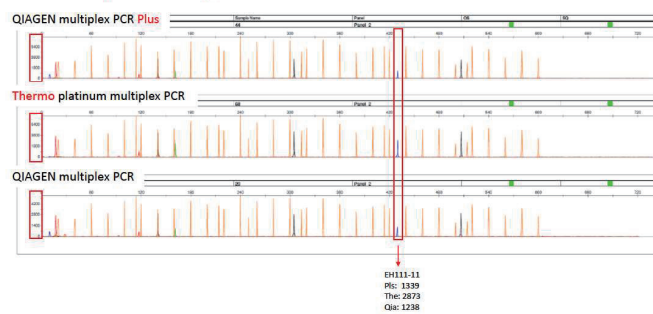
Sample1 × primer mix1



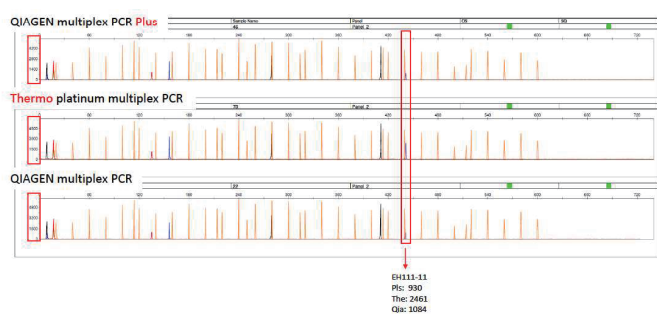
Sample2 × primer mix1



Sample1 × primer mix2



Sample2 × primer mix2



結論

- 一部のピークはThermo品の方が他のkitのものより大きかった
(3種kitを同時に検討、未使用品kitでPCRなど追加検証は必要だが)
⇒Thermo条件における最終extension時間 (60°C 30min) が影響?
⇒Qiagen PCR kitの反応条件の見直しが必要かもしれない
(Qiagen kitもマイクロサテライト用に最終extension として60°C 30minを推奨)

QIAGEN® Multiplex PCR プロトコールとトラブルシューティング

迅速で効率的なマルチプレックスPCR用

項目	ページ
プロトコール	2
マルチプレックスPCRのトラブルシューティング	3
マイクロサテライトPCRの増幅とマルチプレックスPCR	4
Qiagen製品を用いたマルチプレックスPCR	5
トラブルシューティング	11

☆protocol☆

QIAGEN Multiplex PCR kit
95°C 15min
95°C 20sec
60°C 90sec
72°C 1min
4°C
-20°C

プロトコール：マルチプレックスPCRを用いたマイクロサテライト遺伝子座の増幅

本プロトコールは、スタンダードのマルチプレックスPCRを用いたマイクロサテライト遺伝子座の増幅用に最適化されています。10種類以上の反応を行うマルチプレックスPCRあるいは複数のテンプレートをを用いる高度なアプリケーションに関しては、同製品Handbook 41ページ、Appendix Fをご覧ください。

表10. マイクロサテライトPCRサイクリング条件

初期活性化ステップ:	15分	95°C	コメント
3ステップのサイクリング:			HotStarTaq DNA Polymeraseはこのステップにより活性化。
変性	30秒	94°C	
アニーリング	90秒	57~63°C	gradient PCRを行わない場合には、アニーリングを60°Cで始める。一番低いプライマーのT _m が60°C以下の場合には、アニーリングを57°Cで始める。
エクステンション	60秒	72°C	約1.5 kbまでのターゲットに最適。
サイクル数	25~40		サイクル数はアンプレートDNA量と、検出に必要な感度に依存する (同製品Handbook 35ページのAppendix Gを参照)。
最終エクステンション:	30分	60°C	

* T_mの求め方: T_m = 2°C × number of (A+T) + 4°C × number of (G+C)

† ターゲットが1.5 kb以上の場合には、90秒間のエクステンションで結果が改善されることがある。

結論

- 一部のピークはThermo品の方が他のkitのものより大きかった
(3種kitを同時に検討、未使用品kitでPCRなど追加検証は必要だが)
⇒Thermo条件における最終extension時間 (60°C 30min) が影響?
⇒Qiagen PCR kitの反応条件の見直しが必要かもしれない
(Qiagen kitもマイクロサテライト用に最終extension として60°C 30minを推奨)

- 調べた限り(12株)では、kitによってリピート数に違いが出たケースはなかった
- Thermo品も問題なく活用可能
- 同品はコスト的にも申し分ない

Qiagen PCR: ¥420/sample
Qiagen Plus: ¥360/sample
Thermo kit: ¥380/sample (定価、50uLスケール)

- Qiagen品は100回分だが、Thermo品は50回分なので少ない分、試薬の回転率も上がる
⇒ MLVA用としての購入もいいかもしれない

結論

- 一部のピークはThermo品の方が他のkitのものより大きかった
(3種kitを同時に検討、未使用品kitでPCRなど追加検証は必要だが)
⇒Thermo条件における最終extension時間 (60°C 30min) が影響?
⇒Qiagen PCR kitの反応条件の見直しが必要かもしれない
(Qiagen kitもマイクロサテライト用に最終extension として60°C 30minを推奨)

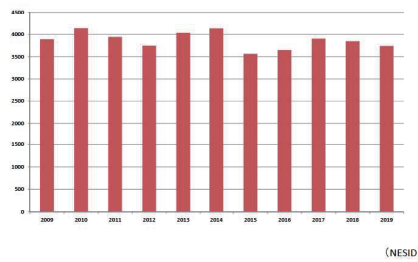
道衛研はThermo品で回していきます

- 調べた限り(12株)では、kitによってリピート数に違いが出たケースはなかった
- Thermo品も問題なく活用可能
- 同品はコスト的にも申し分ない
- Qiagen PCR: ¥420/sample
- Qiagen Plus: ¥360/sample
- Thermo kit: ¥380/sample (定価、50uLスケール)
- Qiagen品は100回分だが、Thermo品は50回分なので少ない分、試薬の回転率も上がる
⇒ MLVA用としての購入もいいかもしれない

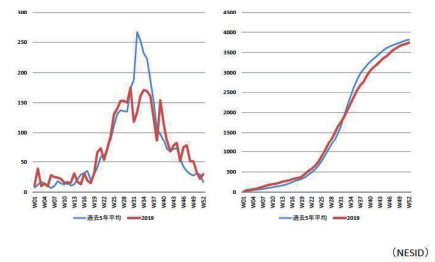
令和2年度 北海道・東北・新潟ブロック
腸管出血性大腸菌 技術研修会
「腸管出血性大腸菌のMLVA法について」

国立感染症研究所
細菌第一部
泉谷秀昌

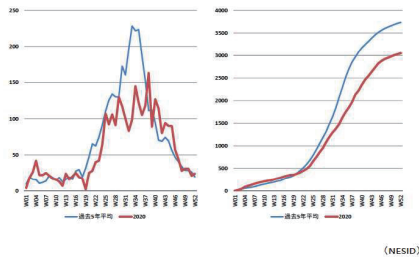
EHEC感染症発生状況(2009-2019年)



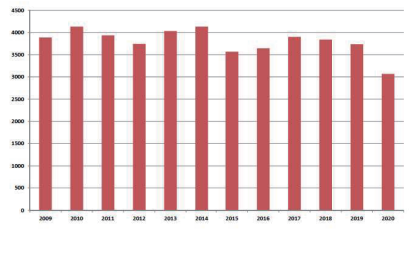
EHEC感染症発生状況(2019年)



EHEC感染症発生状況(2020年)



EHEC感染症発生状況(2009-2020年)

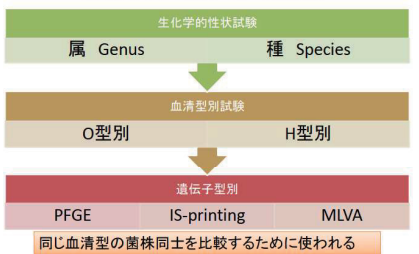


分子疫学解析

Molecular epidemiological analysis

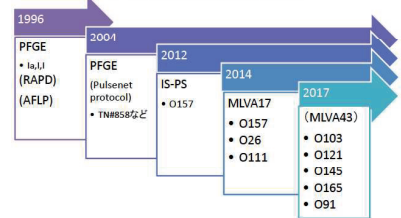
- 特定の遺伝子領域あるいはゲノム情報を比較解析することで、分離した菌株の異同、もしくは類縁性を調べる
 - 菌株の由来(感染源)が共通である可能性を探る
- 行政的な関連で使われるのは、食中毒などの集団事例の解析
- 同じ血清型の菌株を比較する際によく使われる
 - 遺伝子型別、DNA型別
 - 分子型別(Molecular typing)
 - (狭義の)分子疫学解析

分離菌株の試験
遺伝子型別による解析

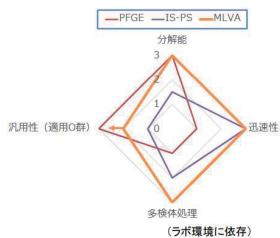


MLVAの基本的なこと

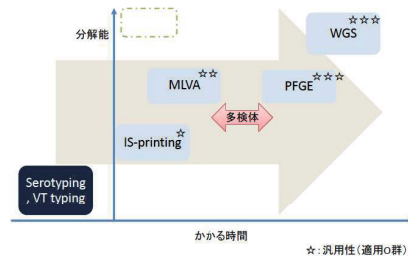
わが国でEHECに使われてきた
分子疫学的解析手法



EHEC分子疫学解析法



腸管出血性大腸菌の分子疫学解析手法



Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

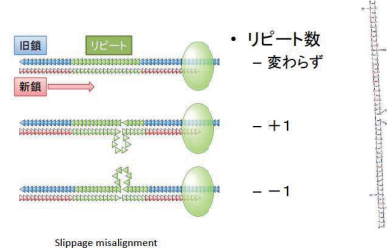
- ゲノム上に散在するタンデムなりリピート構造
- リピートユニットの伸び縮みが複製時に生じる
- リピート数の違いから菌株の異同を調べる

ゲノム上のリピート構造
ユニット長とリピート数

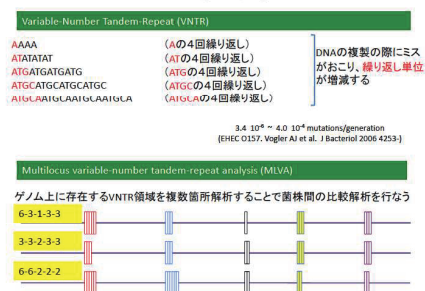
長さ (bp)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	25
3	nt	2,746	63	2								
4	16,387	56	1									
5	4,283	2										
6	2,498	8	2	1				2	2			1
7	255											
9	73	2	1									
12	9		4								1	
18	4						1					

(Sakai株染色体)

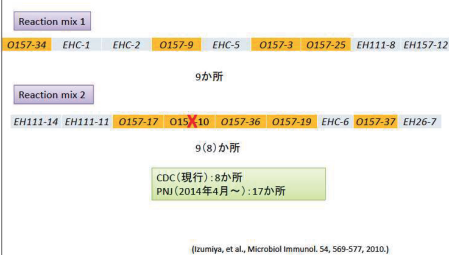
リピート数の変化



MLVAについて



MLVA遺伝子座について



MLVAにおける長所と短所

- 長所
 - PFGEで区別できない菌株間をわかることが可能
 - バリエーションの遺伝的背景が推測しやすい
 - 結果が数値で得られるので比較しやすい
 - 多数の検体を短時間で解析できる
- 短所・問題点
 - PFGEで異なるパターンの株が同じになることがある
 - 分解能は使用する遺伝子座にもよる
 - 初期投資
 - シーケンサーが必要
 - フラグメント解析の設定が必要
 - 蛍光ラベルしたプライマーが必要
 - PO上での作業の比率が高い

分解能の指標

- SimpsonのDiversity Index
 - N, サンプル数
 - n_i, あるタイプ(i)に該当するサンプル数
 - S, タイプ数

$$1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^S n_i(n_i-1)$$

Diversity Index 計算例

- a 3
 - N=3
 - S=1
 - $\Sigma=3 \times 2=6$
 - $N(N-1)=3 \times 2=6$
 - $DI=1-(6/6)=0$
- $$1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^S n_i(n_i-1)$$

Diversity Index 計算例

- a 1
 - b 1
 - c 1
 - d 1
 - e 1
 - N=5
 - S=5
 - $\Sigma=1 \times 0 + 1 \times 0 + 1 \times 0 + 1 \times 0 + 1 \times 0 = 0$
 - $N(N-1)=5 \times 4 = 20$
 - $DI=1-(0/20)=1$
- $$1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^S n_i(n_i-1)$$

Diversity Index 計算例

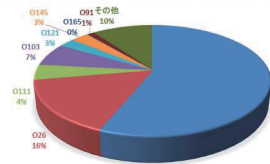
- a 3
 - b 5
 - c 2
 - d 1
 - e 6
 - N=17
 - S=5
 - $\Sigma=3 \times 2 + 5 \times 4 + 2 \times 1 + 1 \times 0 + 6 \times 5 = 6 + 20 + 3 + 0 + 30 = 58$
 - $N(N-1)=17 \times 16 = 272$
 - $DI=1-(58/272)=0.787$
- $$1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^S n_i(n_i-1)$$

SimpsonのDiversity Index 使用例

- 解析手法の性能評価
 - 方法A > 方法B
 - 値が高い方が分解能が高い
- 多様性の指標
 - 集団事例 → 同じ型の株が多数 → 多様性低下
 - 大きな集団事例、流行株が存在すると値が低くなる

2019年株MLVA解析状況

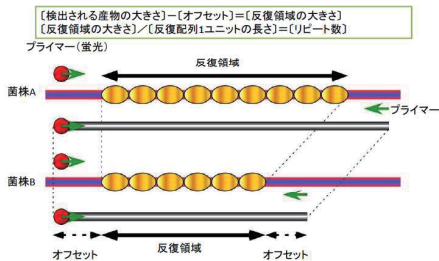
年	血清群	株	型	Simpson's ID	SID過去3年
2019	O157	1592	673	0.995	0.97-0.99
	O26	456	209	0.979	0.98-0.99
	O111	126	70	0.957	0.92-0.98



N=2827 (2019年12月現在)

MLVA実際の手順

MLVA原理



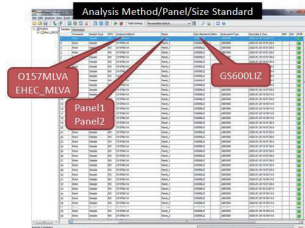
MLVAフローチャート 操作



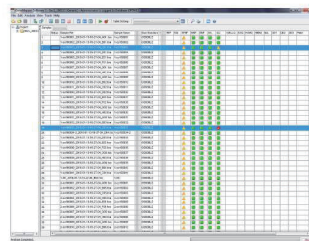
MLVAフローチャート 解析



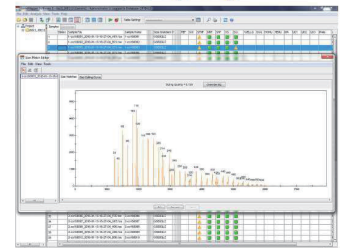
GeneMapperによるフラグメント解析 (例)



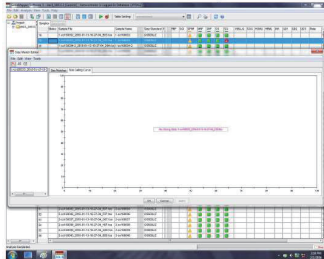
SQ Size Quality



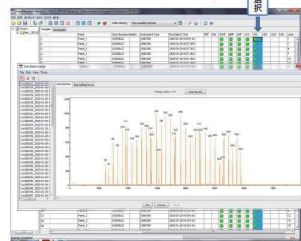
SQ Size Quality



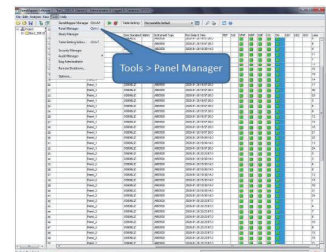
SQ Size Quality



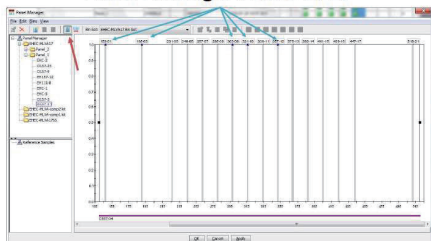
SQ Size Quality



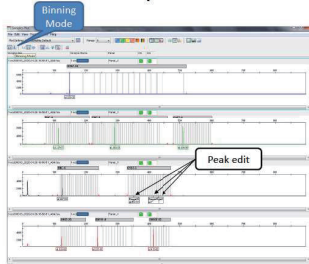
Binの調整



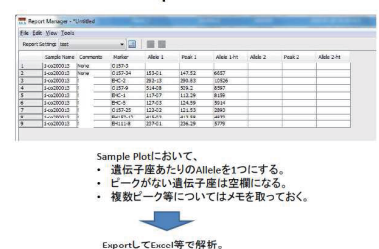
Binの調整 Panel Managerを使う場合



Sample Plot

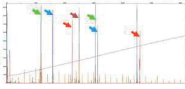


Report (例)



MLVAを実施するにあたっての注意点

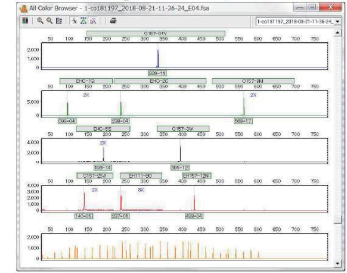
- 安定した条件を見つける
 - DNAの量、PCR産物の希釈
- ピークの判別
 - ノイズ、別の色からのピーク(スピルオーバー)
 - 黄色に多い
- 結果は整数値
 - 最終的には数字しか残らない(良くも悪くも)



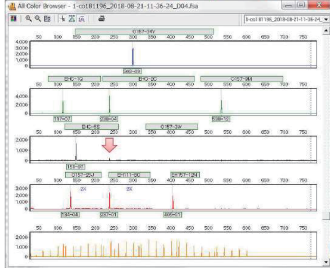
ピークの判定 補足

- スピルオーバーについて
 - 他の色からの影響
- 複数ピークについて
 - 原則として高い方を採用

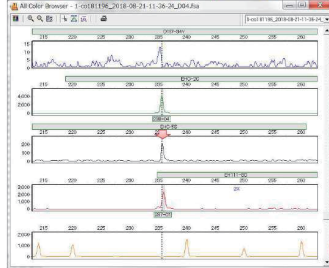
スピルオーバーについて



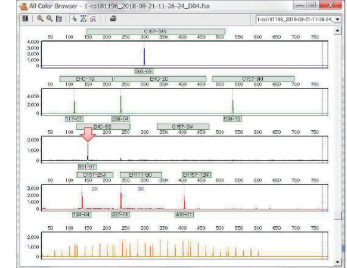
スピルオーバーについて



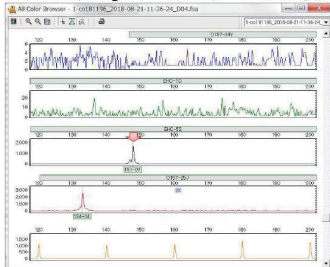
スピルオーバーについて



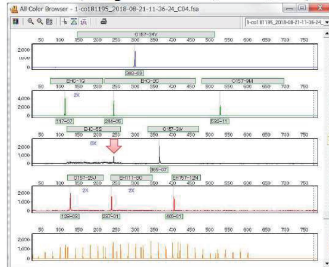
スピルオーバーについて



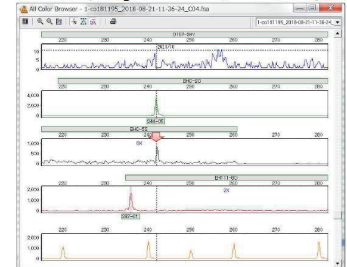
スピルオーバーについて



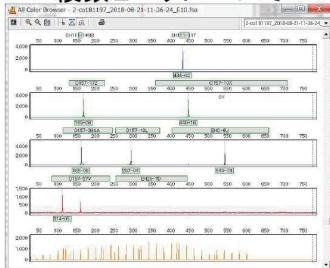
スピルオーバーについて



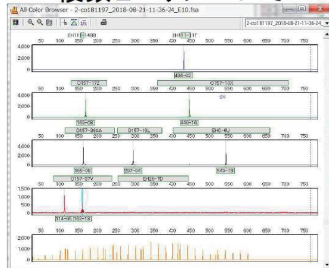
スピルオーバーについて



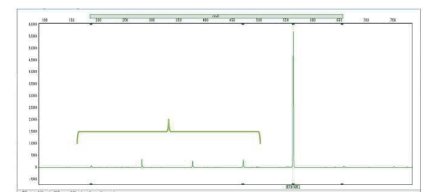
複数ピークについて



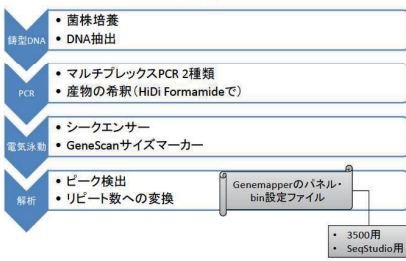
複数ピークについて



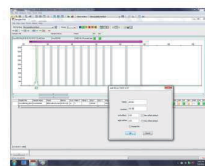
Stutter peaks



MLVAフローチャート 操作

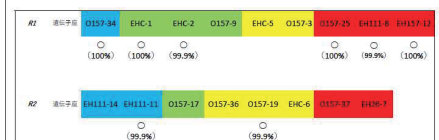


Binの修正

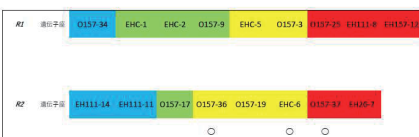


- 機器によってBinの位置を修正する必要があります。
- Samples Plot画面等で修正してください。
- 全てのピーク位置をカバーしているわけではありませんので、Binの追加が必要な場合があります。

O157、O26、O111においてピークの出現頻度が99%以上(2017-2020年株)の遺伝子座



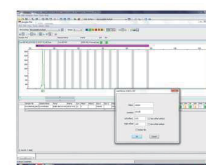
プラスミド(にあると考えられている) 遺伝子座



Binからずれやすい遺伝子座

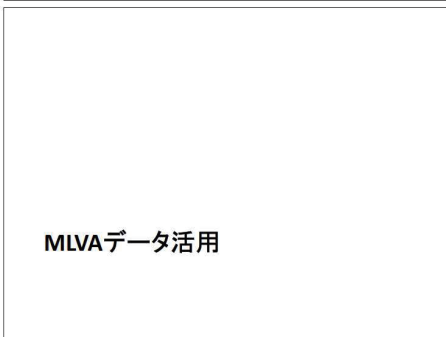


Binの修正



- 全体的にBinをずらした場合は
 - パネル(テキストファイル)
 - Excelで開く
 - Excel内で修正
 - テキストファイルで保存
 - Genemapperに取り込み

	EH111- 11T	EH111- 14BB	EH111- 80	EH157- 12N	EH26- 7D	EHIC-1Q	EHIC-2C	EHIC-5S	EHIC-6U	O157- 3W	O157- 34Y	O157- 9M	O157- 25J	O157- 17Z	O157- 19L	O157- 36AA	O157- 37V
(圖例)	2	2	1	6	2	11	5	2	2	11	9	12	4	4	7	9	6



The diagram illustrates the process of analyzing MLVA data for food poisoning investigation. It is divided into three main sections: Local Research (地研研), Infection Research (感染研), and the Ministry of Health, Labour and Welfare (厚生省).

Local Research (地研研):

- Step 1:** Local researchers submit "Strain Information" (菌株情報) and "Strain" (菌株) to the Infection Research section. The "Strain" information is specifically labeled as "Strain Information (Strain 1)" (菌株情報(菌株1)).
- Step 2:** Local researchers submit "Strain Information (MLVA Data)" (菌株情報(MLVAデータ)) to the Infection Research section. This data is specifically labeled as "Strain Information (MLVA Data 2)" (菌株情報(MLVAデータ2)).

Infection Research (感染研):

- Receives data from both local research sections.
- Performs "Analysis" (解析) on the received data.
- Outputs "MLVA Type" (MLVA型) and "Complex Information" (Complex情報) back to the local research sections.
- Outputs "MLVA Type" (MLVA型) and "Complex Information" (Complex情報) to the Ministry of Health, Labour and Welfare.

Ministry of Health, Labour and Welfare (厚生省):

- Receives "MLVA Type" (MLVA型) and "Complex Information" (Complex情報) from the Infection Research section.
- Feeds this information into the "Food Poisoning Investigation Support System (NESFD) Display" (食中毒調査支援システム (NESFD) 提示).
- The system then displays the "MLVA List" (「MLVA」リスト).

型名もしくはComplex名
都道府県もしくは市

Key	date	Chikusei	source
yellow	2020-m0-01-01	AAA	KKK
red	2020-m0-02-20001	YYY	YYY
red	2020-m0-03-02002	YYY	YYY
red	2020-m0-04-02003	YYY	YYY
red	2020-m0-05-02004	YYY	YYY
red	2020-m0-06-02005	YYY	YYY
red	2020-m0-07-02006	YYY	YYY
red	2020-m0-08-02007	YYY	YYY
red	2020-m0-09-02008	YYY	YYY
red	2020-m0-10-02009	YYY	YYY
red	2020-m0-11-02010	YYY	YYY
red	2020-m0-12-02011	YYY	YYY
red	2020-m0-01-02012	AAA	AAA

種の名前は
異なる遺伝子座の
数を表します

20m1962

ComplexのMST

20m1962

リポートの違
いは反映され
ていません

該当実地
苗株番号、分離日、地研苗株番号、機関、型名、Complex名
【機関で色分け】

現在(過去12か月以内)発生中の集果の一部と考えられます。
追加情報等ございましたらお知らせください。

コメント(参考)

The screenshot shows a Google Sheets spreadsheet with the following structure:

- 地衛研データ (Geospatial Research Data):** The top section, containing a table with columns for '緯度' (Latitude), '経度' (Longitude), '国名' (Country Name), and '人口' (Population). The data is organized into rows for different countries.
- 感染研データ (Infection Research Data):** The middle section, containing a table with columns for '国名' (Country Name), '感染数' (Infection Count), '死亡数' (Death Count), and '回復数' (Recovery Count). The data is organized into rows for different countries.
- 比較 (Comparison):** The bottom section, containing a table with columns for '国名' (Country Name), '感染数' (Infection Count), '死亡数' (Death Count), and '回復数' (Recovery Count). The data is organized into rows for different countries. The background of this section is green, and a red arrow points to a cell containing '不一致: 0' (Inconsistency: 0).

(7-10日)

保健所 → 地衛研 → 感染研 → 地衛研 → 県庁・保健所

- MLVA実施
- 株の比較

通常

- 個別還元
- 関係機関への回覧

厚労省

NESFD提示板

ブロック代表

- 回覧

別添1 <ul style="list-style-type: none"> 発症日 分属日 都道府県・市町村 地研番号 年齢・性別 疫学情報 症状 O:H 毒素型 入手先(衛研名) 自治体名 	別添2 <ul style="list-style-type: none"> 別添1の情報 MLVA17か所のリピート数
---	--

- Chicken#
- 地方衛生研究所からの菌株番号
- 日本語フォントは対応していないので「@@@」などに変換される
- dt番号
 - 平成30年度事務連絡に基づきMLVA型名付与
 - 地衛研から送付されるMLVAデータ(別添2ファイル)につけられる感染研番号

- 本来のMST
 - ー 構成要素すべてを網羅する
 - ー 各要素を結び辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - ー Single locus variantがわかるように、クロスリンクを付加している
 - ・「上」で区別

17c013

18c035

特徴

- 主要な型の周囲にマイナーな型がある
 - マイナーな型のほとんどは1遺伝子座違い (single locus variant; SLV)



18m0216

18m0192

18m0359

18m0212

	EH111-1117	EH111-1488	EH111-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276	EH157-1276
結果	2	2	1	6	2	11	5	2	2	11	9	12	4	4	7	9

1. MLVAデータ → 照合結果

複数回結果の比較確認を行う
感染研、地衛研ともに問題ない判断

MLVA型名付との開始

● 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒については、平成29年夏季の発生事例を除き、同年11月に「腸管出血性大腸菌感染症・食中毒事例の調査結果取りまとめ」を行い、事例の検証、今後の対応策を整理し公表しています。

● 今年、当該結果取りまとめを踏まえ、病原体物質が腸管出血性大腸菌O157、O26、O111と関連する場合は、下記の一環として関係機関に加え、別紙のとおり取組を行うこととします。実施方法よろしくお願います。

● 別紙 1. 概要

● 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒の調査について、事業の早期探知、関係部門間の連携及び情報共有等を目的として新たに、疫学情報に感染症サーベイランスシステムにて付与された番号（以下NESIDのいう））を用いて管理するとともに反応型リアルタイム解析手法（Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis以下MLVAという）による解析結果を用いて共有を行うこととするため、その取組について定める。

また併せて、国、都道府県等関係機関の協力、疫学情報を確保するため、腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査情報の共有手順書について定める。

- ・ 集団事例・広域事例について
- ・ 同タイプ、もしくは同Complexに該当する菌株の一覧
- ・ 3タイプ以上からなるComplexの場合にはMinimum Spanning Tree (MST)の添付
- ・ コメント

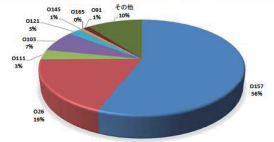
- 本来のMST
 - 構成要素すべてを網羅する
 - 各要素を結び辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - 線の角度の意味はない

17c013

- 2019年
 - 焼肉チーン店 (O157)
- 2018年
 - ホテル (O157)
 - 研修施設 (O157)
 - バーガー店 (O121)
- 2017年
 - ポトサラダ (O157)
- 2016年
 - サウキギビジネス (O157)
 - キムチゆかりあえ (O157)
 - 冷凍メンチカツ (O157)
- 2014年
 - 馬刺し (O157)
 - ステーキチーン店 (O26)
 - 花火大会 (O157)
- 2013年
 - 居酒屋チーン店 (O157)
- 2012年
 - 達達村 (O157)
- 2011年
 - ユッケ (O111)
 - だんご (O157)
- 2009年
 - ステーキチーン店 (O157)
 - ステーキチーン店 (O157)
 - 横断PRCホテル
 - 焼肉チーン店 (O157)
- 2007年
 - 仕出し弁当 (O157)

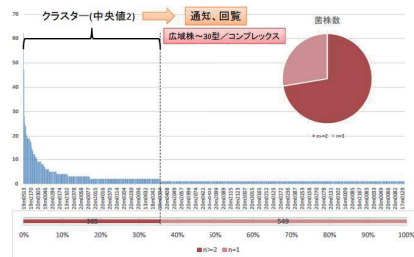
2020年株MLVA解析状況

年	血清群	株	型	Simpson's ID
2020	O157	1234	525	0.993
	O26	421	165	0.975
	O111	74	51	0.980



N=2211 (2020年12月現在)

2020年株MLVA解析状況



2020年検出数上位MLVA型

	血清群	VT型	総計	検出	都道府県	コンプレックス
19m0513	O157	VT1+VT2	62	23	15	20c030
20m2053	O26	VT1	47	1	1	20c210
18m0040	O157	VT1+VT2	28	2	2	
20m2094	O26	VT1	25	1	1	20c209
20m0105	O157	VT2	24	10	7	20c010
20m0245	O157	VT1+VT2	24	4	4	20c038
20m0368	O157	VT2	21	8	7	20c041
16m4013	O103	VT1	20	7	6	20c403
20m0306	O157	VT2	20	1	1	20c032
20m0186	O157	VT1+VT2	19	13	10	20c023
20m0148	O157	VT2	19	10	6	20c019
20m0243	O157	VT1+VT2	19	8	7	20c028
18m0450	O157	VT1+VT2	19	4	4	
17m5022	O121	VT2	19	3	2	
15m2189	O26	VT1	19	1	1	

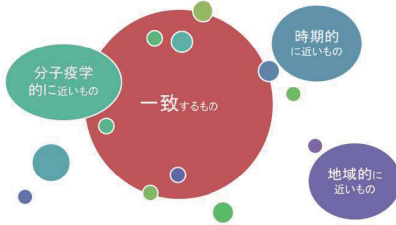
菌株解析の結果について



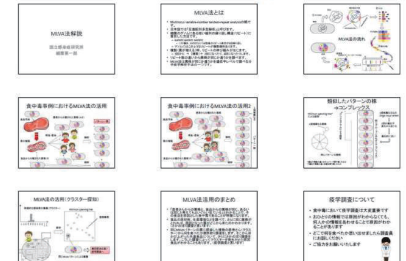
- 菌株同士が、、、
- ある程度以上異なる場合
 - 異なる由来(汚染源)の可能性が高い
 - 複数汚染の可能性を排除しない
- 一致もしくは類似している場合
 - 共通の汚染源による可能性が高い
 - ただし、共通の汚染源を保証しているわけではない

菌株情報(分子疫学解析の結果)と疫学情報とで相互にフィードバックし、情報が合致することが重要

広域事例解析



解説書「MLVA法解説」



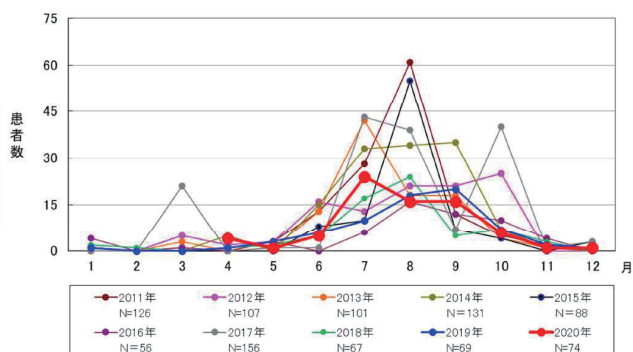
岩手県において散発発生した O103VT1について

保健科学部

1

腸管出血性大腸菌感染症

月別患者数 岩手県 2010～2020年



2

20c401

岩手県

Key	date	Chicken#	source	MLVA Type	MLVA Comp
co200877	2020-03-21	20001	Iwate	16m4003	20c401
co200878	2020-03-17	20002	Iwate	16m4003	20c401
co200879	2020-06-29	20011	Iwate	16m4003	20c401
co200880	2020-07-06	20012	Iwate	16m4003	20c401
co200881	2020-07-12	20015	Iwate	16m4003	20c401
co200882	2020-07-12	20016	Iwate	16m4003	20c401
co200889	2020-07-25	20024	Iwate	16m4003	20c401
co200890	2020-07-25	20025	Iwate	16m4003	20c401
co200891	2020-07-25	20026	Iwate	20m4011	20c401

事例の集積が見られます。
追加情報がありましたらお知らせください。

3

O121VT2およびO103VT1 年別報告数 岩手県 2015-2020年

年	報告数	O103VT1	O121VT2
2020	74	18 O103:H2 12株 O103:H11 6株	4
2019	69	3	0
2018	67	3	1
2017	156	1	8
2016	56	8	0
2015	88	1	0

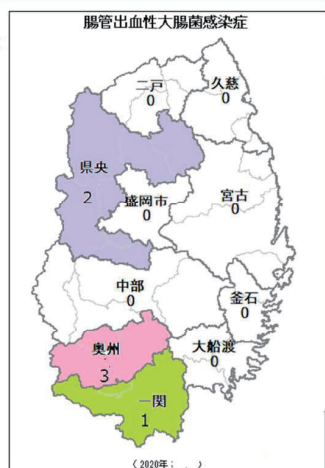
4

O103VT1疫学情報

レーン 番号	MLVA type	MLVA Complex	感染研番号 (地研番号)	住所地	年齢	性別	発症日	診断日	類型	発生状況
1	16m4003	20c401	877(20001)	滝沢市	18	女	3/21		無症状	家族(2名)
2	16m4003	20c401	878(20002)	滝沢市	45	女	3/17		無症状	
3	16m4003	20c401	879(20011)	一関市	69	男	—	6/25	患者	散発
4	16m4003	20c401	880(20012)	奥州市	2	男	7/5	7/9	患者	
5	16m4003	20c401	881(20015)	奥州市	32	男	7/12	7/12	無症状	
6	16m4003	20c401	882(20016)	奥州市	34	女	7/12	7/12	無症状	家族(3名)
7	20m4009	20c402	883(20018)	軽米町	3	女	7/7	7/15	患者	
8			参考事例	盛岡	23	女		R1.8.5	無症状	散発
9			参考事例	宮古	48	女		R1.9.18	無症状	散発

6

届出保健所



7

国立感染症研究所

- パターン
 - ・レーン1
 - ・レーン2
 - ・レーン3
 - ・レーン4,5,6
- 全体的には似ているのでMLVAとしては同じ型
- 異なるが、大本は同じかも
- その後もO103は検出された

8

糞便増菌培養検体からのVT遺伝子 検出スクリーニング検査について (ブロック内アンケート)

2021年1月28日
仙台市衛生研究所微生物課
山田 香織

検討1 増菌培養液からのDNA抽出法

- 1 アルカリ熱抽出
- 2 QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit
- 3 MagMax CORE kit (ThermoFisher), KingFisher Duo Prime

遺伝子検出法および使用試薬(仙台市)

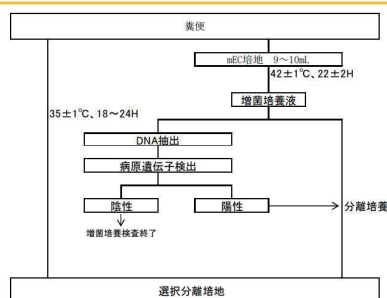
- VT遺伝子検出法：Conventional PCR
- Primer：
感染研病原体マニュアル記載のScheutzらのプライマー
- PCR試薬
感染研病原体マニュアル記載のPromega Go Taq Hot Start Green Master Mix(M5001)
- 増菌培養液からのDNA抽出法：アルカリ熱抽出

QIAGEN Kit 抽出結果

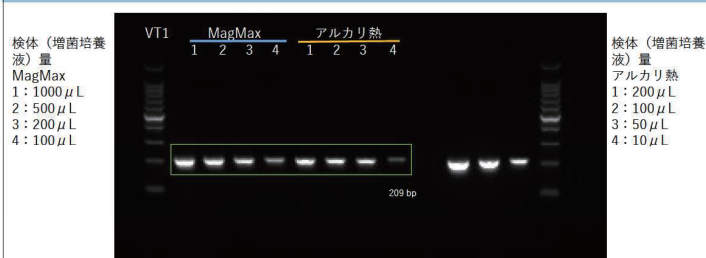


検体（増菌培養液）量
1：100 μ L 2：10 μ L 3：2 μ L

仙台市衛研のEHEC接触者検査フロー (一部抜粋)



MagMax CORE およびアルカリ熱抽出 結果 1



検体（増菌培養液）量
MagMax
1：1000 μ L
2：500 μ L
3：200 μ L
4：100 μ L

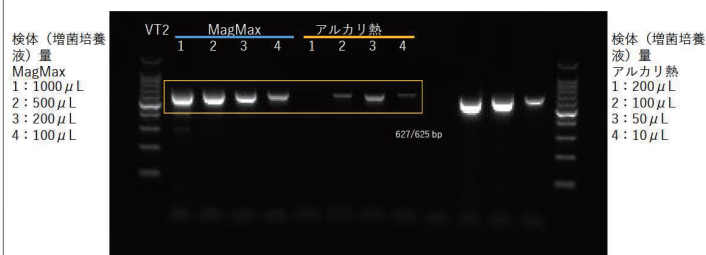
検体（増菌培養液）量
アルカリ熱
1：200 μ L
2：100 μ L
3：50 μ L
4：10 μ L

事例

EHEC (O157 VT1,VT2) 接触者調査の検便検査において、以下の現象を確認した。

- 1 糞便スワブの直接塗抹分離培養
選択分離培地に発育したコロニーのPCR結果：VT1+,VT2+
- 2 増菌培養
増菌培養液100 μ L→アルカリ熱抽出
抽出産物のPCR結果：VT1+,VT2-

MagMax CORE およびアルカリ熱抽出 結果 2



* アルカリ熱抽出法では、検体量200~100 μ Lからの抽出産物において、遺伝子増幅の減弱化が見られた。

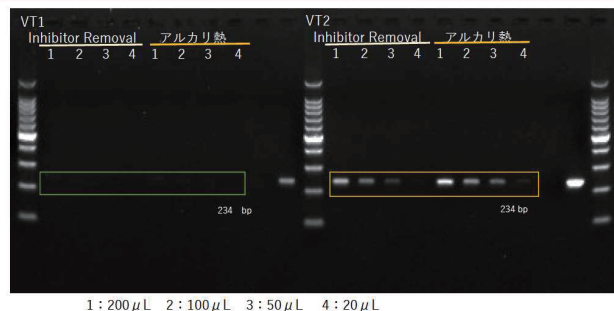
One Step PCR Inhibitor Removal Kits 結果 1



* Inhibitor Removal Kitsは、アルカリ熱抽出法で抽出した産物について、キットで精製したDNAのPCR結果を示す。

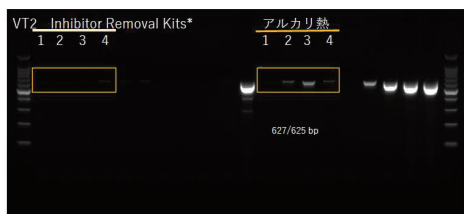
検体（増菌培養液）量
1: 200 μ L 2: 100 μ L 3: 50 μ L 4: 10 μ L

mMK Primer PCR結果



1: 200 μ L 2: 100 μ L 3: 50 μ L 4: 20 μ L

One Step PCR Inhibitor Removal Kits 結果 2



検体（増菌培養液）量
1: 200 μ L
2: 100 μ L
3: 50 μ L
4: 10 μ L

* Inhibitor Removal Kitsは、アルカリ熱抽出法で抽出した産物について、キットで精製したDNAのPCR結果を示す。

仙台市の検査現状報告1

増菌培養液について、アルカリ熱法および
QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit の抽出法を
併用で実施（2020.11～）

対象：感染症接触者検便（EHEC）
食品衛生有症苦情事例の病原大腸菌検
査（糞便、食品）

アルカリ熱抽出およびPCR阻害物質除去 キット*使用時のRealtime PCR Copies

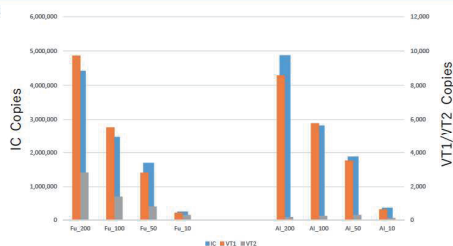
* One Step PCR Inhibitor Removal Kits
(フナコシ)

Fu: アルカリ熱抽出→ One Step PCR
Inhibitor Removal Kits
Al: アルカリ熱抽出のみ

	IC	VT1	VT2
Fu_200	4,425,000	5,730	2,831
Fu_100	2,456,000	5,542	1,434
Fu_50	1,703,052	2,831	787
Fu_10	248,852	425	287
Al_200	4,875,823	8,580	175
Al_100	2,830,256	5,791	254
Al_50	1,881,740	3,537	306
Al_10	363,660	612	824

	IC	VT1	VT2
Qiagen_1000	25,143,436	53,450	35,805
Qiagen_100	2,700,594	6,137	4,025

リアルタイムPCRでは、アルカリ熱抽出の産物でも検出可能だが、VT2はコピー数の減弱化が見られる。
→ One Step PCR Inhibitor Removal Kits(フナコシ)の使用によりコピー数はやや回復傾向。



仙台市の検査現状報告2

- 1 遺伝子検出の結果は一致(実施件数30例程度)
- 2 有症苦情事例では、病原大腸菌検査に検査員増員
- 3 QIAGEN Kitで多数のエキストラバンド検出も(糞便検体に多い)

検討2 プライマーの変更

検討プライマー

- mMK 1/2

(平成24年度 新興再興感染症技術研修「遺伝子検査法」)

QIAGEN Kit電気泳動像 —VT2 PCRにおけるエキストラバンド—

Case 1



Case 2

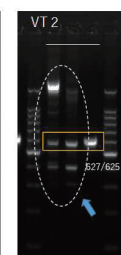


表1 精度管理結果

	報告 施設 数	EH111 -11	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	備考
※1必ずピーク		○		○	○		○	○				○		○		○			
※2プラスミド										プラスミド							プラスミド	プラスミド	
複数ピーク									複数ピーク	複数ピーク			複数ピーク					複数ピーク	
ピーク低め				ピーク低め								ピーク低め	ピーク低め						
binからずれやすい		binずれ			binずれ														
① O157VT&VT2	7	2	-2	1	4	-2	7	4	9	-2	9	12	8	5	7	5	6	7	
② O157VT2	7	2	-2	1	2	-2	4	7	-2	-2	8	9	12	3	4	5	10	7	
③ O26VT1	6	2	1	1	2	3	8	15	2	10	-2	1	10	2	-2	1	-2	5	
	1	2	1	1	2	3	8	15	2	10	-2	1	10	2	-2	1	6	5	
④ O111VT1	6	4	1	5	2	-2	11	9	2	3	-2	3	12	2	-2	1	-2	6	EHC-6:3と10にピーク
	1	4	1	5	2	-2	11	9	2	3	-2	3	12	2	-2	1	6	6	EHC-6:3と10にピーク

※1 O157、O26、O111においてピークの出現頻度が99%以上（2017～2020年）の遺伝子座

※2 プラスミドがあると考えられている遺伝子座

表2 アンケート結果

PCR反応		施設数	昨年度と変更したこと	
試薬	QIAGEN Multiplex PCR kit	3(6)	マスターミックスの変更 QIAGEN Multiplex PCR kit ↓ Platinum Multiplex PCR Master Mix	3
	Platinum Multiplex PCR Master Mix	4(1)	希釈倍率の変更 10倍希釈の追加(低いピーク)	1
反応液量	25μL	5	変更なし・昨年度不参加	4
	20μL	1		
	15μL	1		
希釈倍率	100倍	3	苦慮していること	
	80倍	1	非特異ピーク判定	
	50倍	2	遺伝子の順番がGeneMapperで表示される 順番と感染研に報告する様式とことなる。	
	10倍と100倍	1	フラグメント解析の消耗品を新しい状態に保ちたいが、使用頻度や予算の兼ね合いもあり難しい。	
シーケンサー		施設数		
機種	3500	6	MLVA実施の予算、中核市分の菌株の扱い、 分析実施後の結果報告やMSTの説明など、 MLVAに関する事項全般をどのように説明し たら行政の感染症担当者に理解してもらえる か悩んでいる。	
	SeqStudio	1		
ポリマー等	ウイルスと共有	7		
	EHEC専用	0		

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 2 年度分担研究報告書

関東ブロックで分離された食中毒起因菌の分子疫学解析法の検討と
精度管理に関する研究

研究分担者	東京都健康安全研究センター	鈴木 淳
研究協力者	茨城県衛生研究所	石川 加奈子
	栃木県保健環境センター	江原 栞
	群馬県衛生環境研究所	中野 剛志
	埼玉県衛生研究所	佐藤 孝志
	千葉県衛生研究所	間 京子
	神奈川県衛生研究所	古川 一郎
	横浜市衛生研究所	小泉 充正
	山梨県衛生環境研究所	山上 隆也
	長野県環境保全研究所	市川 奈緒
	静岡県環境衛生科学研究所	森主 博貴
	東京都健康安全研究センター	小西 典子， 齋木 大， 尾畑 浩魅

研究要旨

食中毒の散在的集団発生（Diffuse outbreak）を早期に探知し拡大防止を行うためには、共通原因食品を迅速に特定することが重要である。その手段として患者等から分離された菌株情報は非常に有用である。関東ブロックでは共通菌株 5 株（O157: 4 株、O26: 1 株）を用いて PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理を行った結果、いずれも良好な成績であった。MLVA 法による精度管理においては、これまでで最も施設間の一致率が高い結果となり、年々各施設での手技が定着していることが確認できた。しかし近年、地方衛生研究所では担当者の異動が頻繁に行われていることから、今後も PFGE 法や MLVA 法の検査精度を一定に保つための精度管理が重要である。

東京都で検査を実施した O157（203 株）、O26（17 株）、O111（8 株）の MLVA および PFGE を実施した結果、O26 および O111 は両者で全ての株が一致したが、O157 では PFGE が 91 種類の型に、MLVA は 112 種類の型に分類され、一部に両者で不一致であった菌株が存在した。両解析法どちらにおいても疫学調査と一致しない解析結果が得られる場合があったことから、菌株を対象とした分子疫学解析結果に加え、保健所等における聞き取り調査も必要不可欠であるといえることが確認できた。

A. 研究目的

感染症や食品媒介感染症発生時に最も重要なことは、感染源・感染経路の早期特定と感染拡大防止である。食品の広域流通が行われる現在は、同一食品を原因として散発的に異なる地域で食中毒が発生する散在的集団発生 (Diffuse Outbreak) が起こる可能性が高く、これらを早期に探知することが健康被害の拡大防止に重要となる。原因食品、感染経路を特定するためには、患者や調理従事者、食品等から分離された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) による食中毒では症状も重篤に陥ることがあり、病原体の解析は特に重要となる。

一方、散発事例など広域に発生する事例では、異なる検査施設で実施した分子疫学解析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求められる。このことから、EHEC 共通菌株を使用して PFGE 法、IS 法、MLVA 法について各地研の精度管理を実施した。また、病原体解析に関するアンケートを実施し、解析の現状と今後の課題について調査した。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株および O26 株を関東ブロックの 9 施設に送付し、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の精度管理を行った。

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として O157 を 4 株および 2020 年に分離された O26 を 1 株の計 5 株を供試した。

2) PFGE 法

国立感染症研究所のプロトコルに従って実施した。

アガロースゲルの作製：0.7mm プラグキヤスターを使用し、1% SeaKem Gold Agarose (LONZA Japan) で作製した。

DNA 抽出法：Proteinase K (1mg/mL)、1% N-lauroylsarcosine-0.5M EDTA (pH8.0) で 50℃、18~20 時間行った。

制限酵素処理：制限酵素 *Xba* I で 37℃、4 時間処理した。

電気泳動用アガロース：電気泳動用アガロースは SeaKem Gold Agarose (1%) を使用した。

電気泳動条件：6 V/cm、2.2~54.2 秒、20~22 時間、buffer 温度 12℃で行った。電気泳動時間は泳動後のバンドの先端がアガロースゲルの下から 1.0cm~1.5cm になるように調整した。

サイズマーカー：*S. Braenderup* H9812 株を *Xba* I で消化したものをうい、泳動用アガロースに入れた。

3) IS-printing System 法

各施設で IS 法を実施し、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た。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

共通菌株から DNA を抽出し、各施設の方法で MLVA 法を実施した。17 領域の繰り返し配列数を算出し、データを送付し比較することで解析を行った。また、MLVA 法に関わる供試菌株の培養方法と遺伝子解析を行

う上での遺伝子抽出方法、PCR 産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。

2. MLVA の解析結果の活用方法に関するアンケート

分離菌株の疫学解析に用いられる MLVA 法について、地方衛生研究所での実施状況を把握する目的で、アンケート調査を実施した。

3. 腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症の発生状況と分子疫学解析が有用であった事例

東京都で発生した EHEC による食中毒・感染症の発生状況をまとめた。また、分子疫学解析が行政に活用された事例についてまとめた。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた精度管理結果

1) PFGE 法

関東ブロック 10 施設において、共通菌株を用いた PFGE 解析を実施した。参加施設数は昨年度より 1 施設増加した。

PFGE 画像ファイルを用いて各施設の比較を行った結果、O157 の 4 株に関しては昨年同様にいずれの施設ともバンドの分離はおおむね良好であった。しかし、本年初めて実施した O26 の 1 株に関しては、173.4Kb～398.4Kb の細かい分離 (12 本) の判定が困難な施設が認められた (写真 1a、1b)。

2) IS 法

関東ブロック 10 施設において、O157 の 4 株に対して IS 解析を実施した。

1st primer set では、菌株 No.1、3、4 の結果は 10 施設すべてで一致した。その一方、菌株 No.2 では、10 施設中 9 施設で 1-03

(742bp) をバンド「無」と判定したが、1 施設は「有」と判定していた。

菌株 No.1 および 3 は、1.5kbp より大きいサイズにエキストラバンドが認められる株であるが、エキストラバンドの報告があった施設は 5 施設であった。菌株 No.2 の 1-2 と 1-3 の間に存在するエキストラバンドを報告した施設は 8 施設、また 1-14 と 1-15 の間に存在するエキストラバンドの報告のあった施設は 7 施設であった (写真 2、表 2)。

2nd primer set では、菌株 No.1～4 のいずれも、すべての施設で一致していた。一方、エキストラバンドの報告は施設によって異なっており、菌株 No.1、2、3 の 1.5kbp 付近にエキストラバンドが認められると報告した施設は 4 施設であった (写真 3、表 3)。

3) MLVA 法

関東ブロック 10 施設で、共通菌株 5 株について MLVA を実施し、各領域のリピート数を比較した。その結果、リピート数が大きく外れていた施設は認められず、概ね一致した成績が得られた。

O157 菌株 No.1, 2, 3 および O26 菌株 No.5 に関しては、10 施設で同一の結果となった。その一方で、菌株 No.4 では、17 領域中 1 領域に複数のピークが認められることが 5 施設から報告された (表 4)。

各領域のピークの高さと PCR 産物の希釈倍数を各施設に報告してもらい比較した。菌株 1 と菌株 2 の主なピークの高さを表 5 に示した。いずれの菌株でも高いピーク値では 30,000 以上を示す施設がある一方、低いピーク値では 100 程度であった。この様に判定する際のピーク値の高さには施設間で違いが認められた。一般的に PCR 産物の希釈が高いほどピーク値は低い傾向が認められたが、いずれの菌株でもリピート数は

正しく判定されていた。

4) MLVA 法に関するアンケート

関東ブロック 11 施設を対象に、MLVA 法に供試するテンプレートの作製時の使用培地、遺伝子解析を行う上での DNA 抽出方法、PCR 産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。

供試菌株のテンプレートの作製時の使用培地は、普通寒天培地が 4 施設、トリプトソイ寒天培地が 1 施設、ミュラーヒントンⅡ寒天培地が 1 施設、LB ブイヨンが 1 施設、HI 寒天平板が 1 施設、TSB 培地が 1 施設、そして CT-SMAC または非選択培地 (Mueller Hinton Agar など) が 1 施設であった。

DNA 抽出方法に関しては、アルカリ熱抽出を行っている施設が 6 施設、熱抽出による施設が 2 施設、市販のキットである InstaGene を用いている施設が 1 施設、コーニダイレクトが 1 施設であった。

PCR 産物の希釈倍率は、10 倍が 1 施設、10 倍もしくは 20 倍が 1 施設、20 倍および 40 倍が 1 施設、50 倍～100 倍が 4 施設、約 100 倍が 1 施設、約 300 倍が 1 施設、約 500 倍が 1 施設となり、施設によりさまざまであった (表 6)。

2. 疫学解析状況に関するアンケート結果

関東ブロック 11 施設を対象に、MLVA 法による解析結果の活用に関してのアンケート調査を実施した。

保健所等へ MLVA 型を知らせる方法に関するアンケートでは、成績書を作成し報告との回答が 7 施設から得られ、このうち 2 施設は電話連絡も行っていた。また、それ以外に一覧表にまとめ随時還元している、MLVA 型の集積が見られた時にヒトの疫学

情報と合わせて報告、保健所との共通サーバに共有ファイルを入れているとの回答もあった。

MLVA 型を保健所等へ報告している場合の対象菌株についてのアンケートでは、収集した菌株は全て MLVA 型を報告しているとの回答が 7 施設と最多で、次に必要に応じて報告している施設が 3 施設、保健所等から依頼 (問い合わせ) があった場合に報告との回答が 1 施設から得られた。

国立感染研から定期的に提供されるコンプレックス情報についての活用方法に関するアンケートでは、必要に応じて (一部の情報について) 情報共有を図るとの回答が 5 施設から得られた一方で、特に情報提供はしていないという回答が 3 施設から得られた。また、一覧表にまとめて随時還元している、保健所との共有フォルダを利用しているとの回答もあった (表 7)。

今後、取り組むべき課題について聞いたところ、3 血清群以外は PFGE を実施することや技術継承や結果判定における精度管理が必要、年に数回は集団事例等で PFGE を行う機会があること、担当者の手技によるところが大きく、平準化の必要性があるという理由から、MLVA 以外に PFGE の精度管理も引き続き必要と考える施設が 11 施設全てから得られた (表 8)。

3. 腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症の発生状況と分子疫学解析が有用であった事例

1) 東京都で発生した腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症の発生状況

2020 年に東京都内で分離されたヒト由来の腸管出血性大腸菌は 305 株 (2021 年 2 月現在) であった。血清群ごとの分離数は

O157が203株(66.6%)と最も多く、次いでO26が18株(5.9%)、O103が16株(5.2%)等、合計12種類のO血清群に分類されたが、血清型別不能となった菌株が28株(9.2%)で認められた(表9)。

食中毒と断定されたのはO157が1事例であった。O157による食中毒事例はつけ物製造施設が原因であり、原因食品はキムチであった。O157はVT1およびVT2産生株で血清型がO157:H7と典型的なものであった。

2) 分子疫学解析が行政に活用された事例

2020年7月に東京都および名古屋市等で発生したつけ物製造施設で発生した腸管出血性大腸菌O157による食中毒事例において、東京都では患者、漬物(キムチ)、調理従事者からO157が検出され、キムチおよび東京都と名古屋市の患者から分離したO157のMLVAパターンは一致したが、調理従事者から検出されたMLVAパターンとは別なパターンを示した。このことから、本事例は調理従事者を介した感染事例ではなく、キムチに用いられていた食材が汚染されていた可能性が示唆され、MLVA法が有効であった事例となった(表10)。

D. 考察

腸管出血性大腸菌やサルモネラによる食中毒では、複数の自治体に患者が発生する広域事例や、散在的集団発生が起きる可能性が非常に高い。このような事例では、分離株の分子疫学解析が必須であり、各地方衛生研究所で実施した検査結果をもとに食中毒の断定を行うことも多い。

分子疫学解析手法としては、様々な方法が報告されているが、これまで最も一般的な方法はPFGE法であった。分解能や再現

性が高く、多くの菌種に用いることができるという利点がある。一方、手技が煩雑で結果が出るまで時間を要することや、異なる機関で実施した成績を比較することが困難であるという欠点がある。

2018年6月、厚生労働省から事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」が発出され、腸管出血性大腸菌O157、O26、O111を対象とした分子疫学解析手法はMLVA法に統一することが明記された。全国で実施する分子疫学解析手法を統一し、国立感染研で付与される共通型番号で比較することになったことから、広域的に発生するDiffuse outbreakの探知をより迅速に行うことが可能となった。

令和2年度関東ブロックでは、共通菌株5株(O157:4株、O26:1株)を用いてPFGE法、IS法、MLVA法の精度管理を行った。参加施設は関東ブロック11施設中10施設で、昨年度と比較すると1施設の増加であった。

PFGE法はいずれの施設ともおおむねバンドの分離が良好で、比較しやすい写真が得られていた。しかしO26に出現する細かいバンドの分離が不鮮明な施設や、染色ムラが認められた施設もあった。PFGE法は腸管出血性大腸菌の分子疫学解析のみならず、サルモネラや毒素原性大腸菌、赤痢菌等広く用いることができる手法である。今後も精度管理等を通じて一定水準以上の技術の維持および技術の継承を続けていかなくてはならない。

IS法は全体に良好な成績が得られたが、菌株に特徴的なエキストラバンドの判定が困難な施設も認められた。電気泳動の時間が短いとバンドとバンドの間隔が狭くなっ

てしまい、判定が困難になってしまう。できるだけ長く泳動しバンドとバンドの間を長くとることが重要である。

近年、IS 法による解析を実際の検体に用いることは非常に少なくなっている。今後も活用する機会は減少していくと考えられるが、分子疫学解析の 1 手法としてしばらくは維持していく必要はあると考えられた。

今回実施した MLVA 法の精度管理では、いずれの成績もほぼ一致したが、O157-37 領域では判定が異なる施設が認められた。すなわち、菌株 No.4 の O157-37 領域は複数のピークが出る株であったが、施設によって報告の仕方が異なっていた。しかし全ての施設がリピート数 3、7、15 に集約されており、大きく外れる結果は認められなかった。

各領域のピーク値の高さは施設ごとに異なっており、高いピーク値 (30,000 以上) が得られている施設と小さいピーク値 (100 程度) との差は非常に大きかった。今回の精度管理では、小さいピーク値でもリピート数は正確に判定されていた。しかしノイズとの区別が難しい場合もあることから、適切なピーク値 (1000~10,000) になるように調整することも必要である。

MLVA 法は近年導入された新しい解析方法であるが、各施設、手技、入力等にも慣れ、安定した成績が得られるようになっていることが明らかとなった。

各自治体では、発生した散発事例や集団事例を対象に分子疫学解析を実施しており、行政対応へ活用された事例も数多く経験している。

近年、地方衛生研究所では担当者の異動が頻繁に行われている。今後も PFGE 法や MLVA 法の検査精度を一定に保つための精

度管理が必要である。

E. 結論

今回実施した MLVA 法の精度管理では、いずれの成績もほぼ一致したが 1 菌株で判定が異なる施設が認められた。また、複数のピークが認められる株の判定は施設によって異なっていたが、いずれも大きく異なる判定ではなかった。しかし近年、地方衛生研究所では担当者の異動が頻繁に行われていることから、今後も PFGE 法や MLVA 法の検査精度を一定に保つための精度管理が重要である。

東京都で実施した O157 の 203 株を対象とした MLVA および PFGE の比較結果から、両解析法どちらにおいても疫学調査と一致しない解析結果が得られる場合があった。菌株を対象とした分子疫学解析結果に加え、保健所等における聞き取り調査も必要不可欠である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 2020年度パルスネット研究班共通菌株

No.	菌株No.	血清型	毒素型
1	EH5664	O157 : H7	VT2
2	EH5668	O157 : NM	VT1+VT2
3	EH5758	O157 : H7	VT2
4	EH5890	O157 : H7	VT1+VT2
5	EP2513	O26 : H11	VT1+VT2

No.1～4は2019年度と同じ菌株を配布

写真1a. 共通菌株のPFGE解析結果

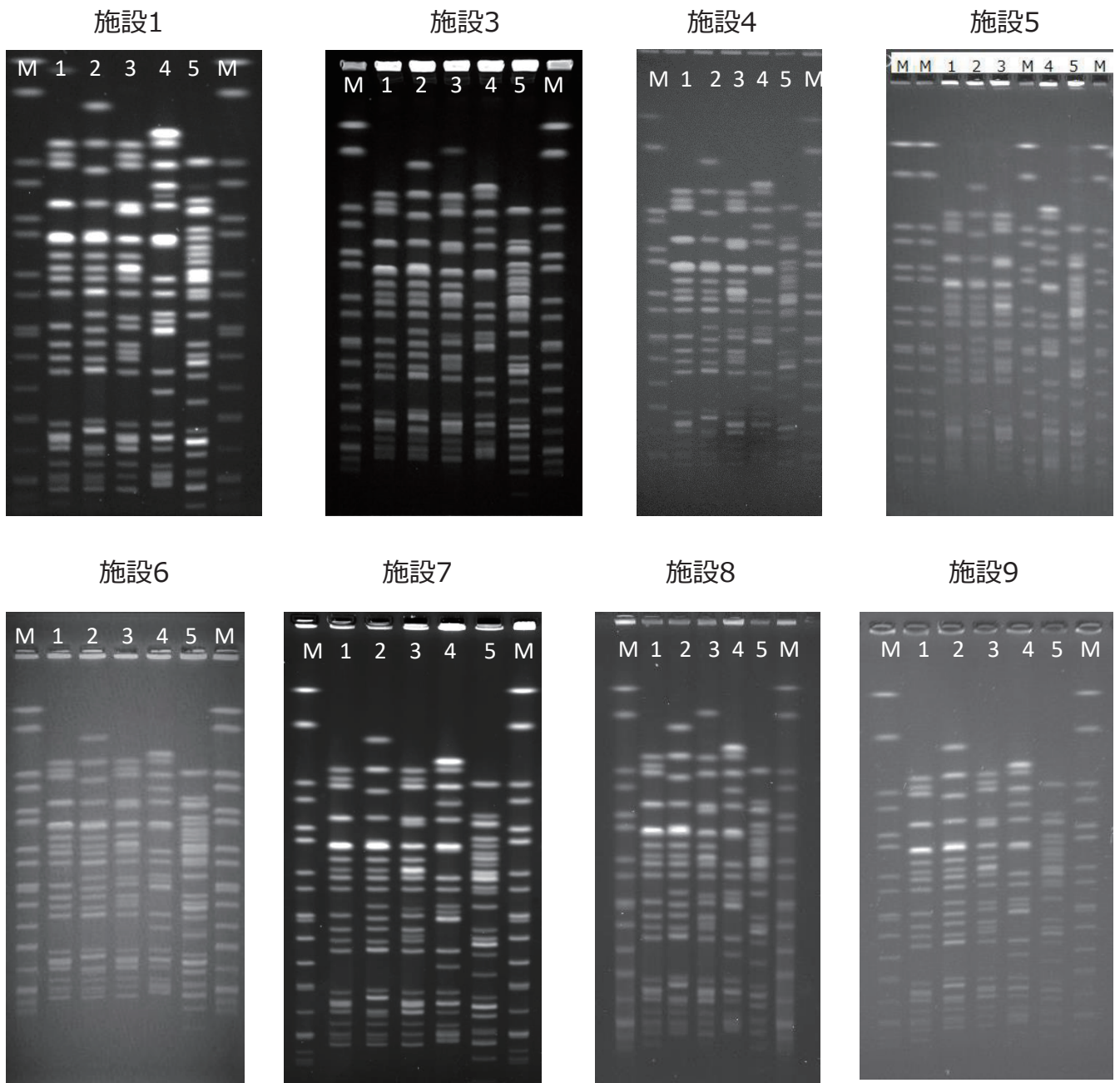


写真1b. 共通株のPFGE解析結果

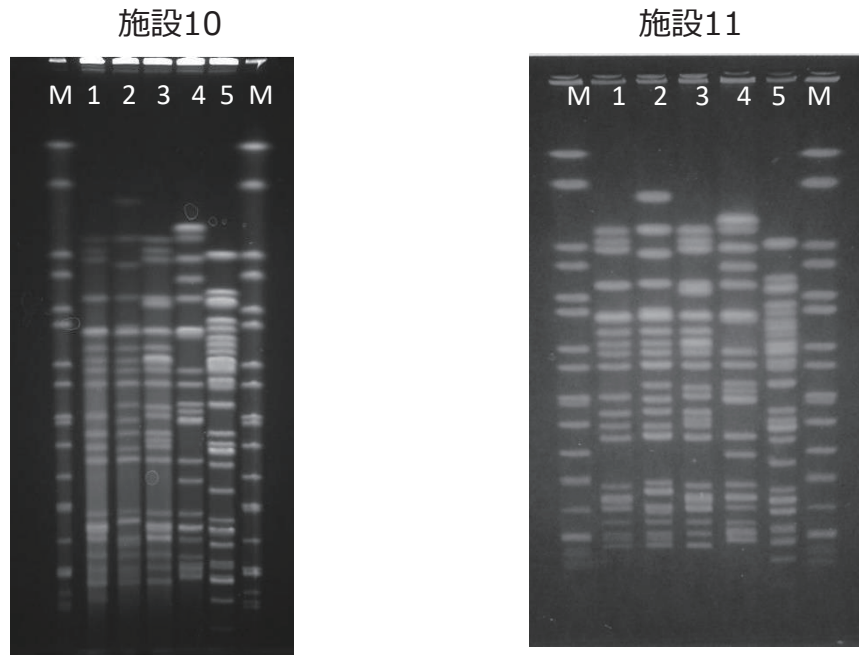
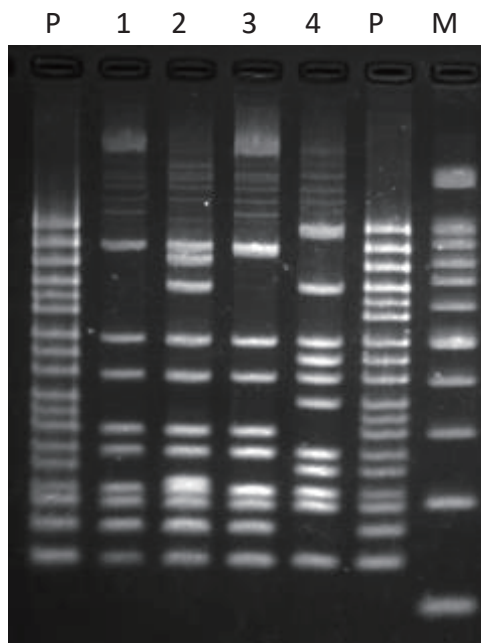


写真2. IS-printing System解析結果 (1st primer set)



← 菌株1および3：1番目の上 **5施設**

← 菌株2：2番目と3番目の間 **8施設**

← 菌株2：14番目と15番目の間 **7施設**

表2. 各施設で実施したIS-printing System 成績 (1st primer set)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Primer No.	施設数	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
Size(bp)		974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137
菌株1	10	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
菌株2	9	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
菌株2	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
菌株3	10	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
菌株4	10	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1

写真3. IS-printing System解析結果 (2nd primer set)

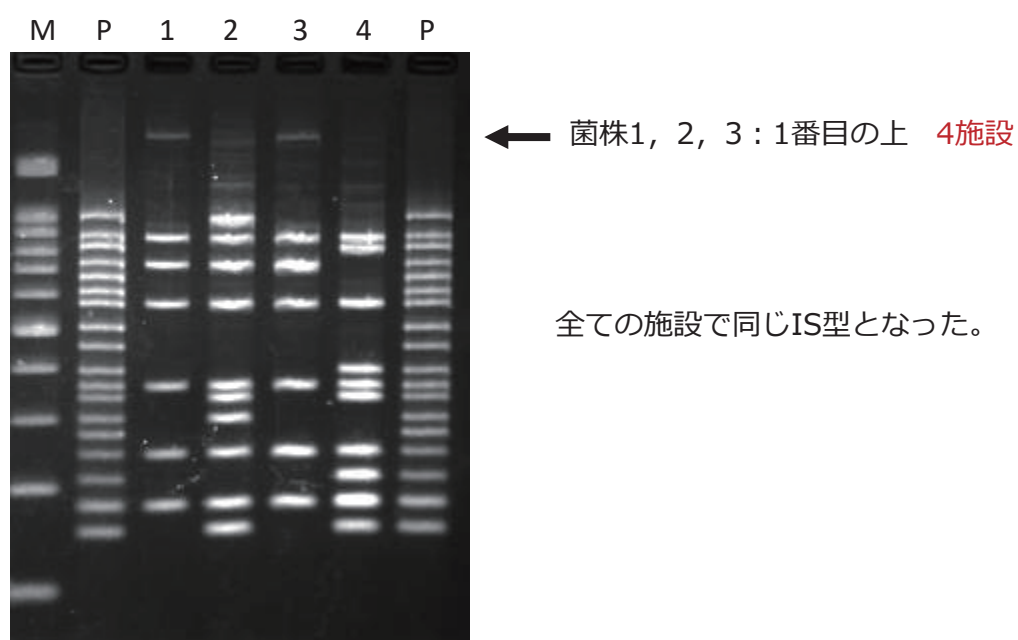


表3. 各施設で実施したIS-printing System 成績 (2nd primer set)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Primer No.	施設数	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
Size(bp)		987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
菌株1	10	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
菌株2	10	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
菌株3	10	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
菌株4	10	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1

表4. 共通菌株5株を用いたMLVAの標準化：主なりピート数

No.	血清型	EH111 -11	EH157 -12	EHC -1	EHC -2	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	施設数
1	O157	2	6	11	5	11	9	13	4	4	7	9	6	10
2	O157	2	4	5	5	18	10	9	2	12	7	4	7	10
3	O157	2	6	11	5	11	9	12	4	4	7	9	6	10
4	O157	2	4	5	4	9	12	17	5	8	6	7	3	5
4	O157	2	4	5	4	9	12	17	5	8	6	7	15*	1
4	O157	2	4	5	4	9	12	17	5	8	6	7	3,15	3
4	O157	2	4	5	4	9	12	17	5	8	6	7	3,7,15	1
5	O26	2	2	8	15	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	10

*3,7にもピーク有り

表5. 各領域のピークの高さ

菌株No.1

施設	希釈倍数	EH111 -11	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	O157-3	O157 -34	O157-9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
1	10～20倍	14202	5453	11057	14867	23846	19455	6545	15862	8643	14402	16483	15080	8122
3	50～100倍	2548	4062	2853	5678	6546	5693	2925	3771	2596	2937	4019	4213	2228
4	20倍	7163	15193	12794	6391	21450	7999	11279	18740	3231	13552	8449	18529	5474
4	40倍	1468	2272	4132	1768	6402	3045	3194	5906	943	2540	1156	2591	1094
5	約10倍	12555	25955	25955	6237	32514	7921	17143	7312	32282	21559	5613	32507	32297
6	300倍	1062	118	2889	3189	5647	3888	583	154	1613	1470	2793	3776	1612
7	50～100倍	11932	9301	13952	13865	26356	21027	7838	9084	11316	14884	15004	19003	11915
8	50～100倍	23464	6883	6903	9987	14426	11642	7165	11505	5608	32649	32800	32830	23000
9	約100倍	4322	2627	6263	3841	6290	5573	5057	6358	4319	2072	1843	3265	4140
10	約500倍	2324	573	1558	1815	2187	2087	567	2416	903	3924	4893	5989	3192
11	100倍	1328	1895	2651	2728	4540	3823	2116	4398	1424	1826	2228	2329	1188

菌株No.2

	EH111 -11	EH111 -8	EH157 -12	EHC -1	EHC -2	O157 -3	O157- 34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
最大	14181	25750	18634	16610	31672	18580	14684	18775	32412	20560	17653	19878	32523
最小	653	156	2175	2208	3848	2480	455	144	1170	949	1660	1606	983

表6. MLVA法に関するアンケート

対象：10施設

1. テンプレート作製時の使用培地について教えてください。

培地	施設数
普通寒天培地	4
トリプトソイ寒天培地	1
ミューラーヒントンⅡ寒天培地	1
LBブイヨン	1
HI寒天平板	1
TSB培地	1
CT-SMACまたは非選択培地	1

3. PCR産物の希釈倍率を教えてください。

希釈倍率	施設数
10倍	1
10または10倍	1
20および40倍	1
50～100倍	4
約100倍	1
約300倍	1
約500倍	1

2. DNA抽出方法を教えてください。

DNA抽出方法	施設数
アルカリ熱抽出	6
熱抽出	2
InstaGene	1
コロニーダイレクト	1

表7. 疫学解析結果の活用方法に関するアンケート

1. 保健所等へMLVA型を知らせる方法について教えてください。

- ・成績書を作成し報告 7施設（うち2施設は電話連絡も実施）
- ・一覧表にまとめ随時還元
- ・MLVA型の集積が見られた時にヒトの疫学情報と併せて報告
- ・保健所との共通サーバに共有ファイルを入れている。
- ・本庁が各保健所へ連絡している。

2. MLVA型報告対象の菌株は？

報告方法	施設数
収集した菌株は全て報告	7
必要に応じて報告	3
問い合わせがあった場合に報告	1

3. コンプレックス情報の還元方法は？

報告方法	施設数
必要に応じてメールをそのまま転送 あるいは一部の内容について情報提供	5
一覧表にまとめて随時還元	1
保健所との共有フォルダを利用	1
本庁が各保健所へ情報を還元	1
特に情報提供はしていない	3

表8. 分子疫学解析を実施する上での課題について

1. 今後、分子疫学解析を実施する上での課題はありますか？

- ・広域散発を早期に探知するためのネットワークの構築
- ・PFGE法の精度管理
 - ・O157、O26、O111以外EHECあるいは他の菌種ではPFGEを用いるため。
 - ・結果が担当者の手技によるところが大きく、平準化の必要性があるため。
 - ・技術伝承には精度管理が必要。
- ・MLVAの実践と情報共有の場
- ・次世代シーケンサーに関する細菌分野での解析への利用方法の検討。

表9. 東京都で分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌（2020年）

血清群	菌株数	(%)	血清群	菌株数	(%)
O157	203	(66.6)	O146	4	(1.3)
O26	18	(5.9)	O145	3	(1.0)
O103	16	(5.2)	O55	1	(0.3)
O121	11	(3.6)	O115	1	(0.3)
O111	8	(2.6)	O124	1	(0.3)
O91	6	(2.0)	OUT	28	(9.2)
O128	5	(1.6)	合計	305	

表10. 分子疫学解析が行政に活用された事例

つけ物製造施設で発生した腸管出血性大腸菌O157による食中毒事例（東京都）

利用日 : 2020年7月2～4日（インターネット購入を含む）

菌検出者数 : 3名（患者）, 1名（調理従事者）

原因食品 : 白菜キムチ

原因菌 : O157:H7（VT1+VT2産生）

1. 事例の探知

7月10日M区保健所に1名の腸管出血性大腸菌感染症発生届が提出された。

患者は別の区にある施設で製造、販売されたキムチを7月2日から4日にかけて喫食していた。
（第1グループ）

2. 発生状況

グループ	1	2	3	4
キムチ購入日	7月1日友人が購入 患者へ譲渡	7月3日	インターネット購入 (7月2日, 3日)	
喫食日	7月2日～4日	7月3日昼食および夕食	7月4日	7月3日～4日
喫食者数	1名	4名（同居の家族3名 および別居の母）	3名	3名
発症日	7月6日	7月4日～7日	7月6日～7日	7月7日～9日
発症者数	1名	3名	3名	3名
O157検出者	1名	1名（別居の母）	1名	無
居住地	東京都	東京都	名古屋市	埼玉県

3. 疫学解析結果

患者由来株2株（東京都分離株および名古屋市分離株）
グループ2に残っていた白菜キムチ分離株



MLVA型が一致
食中毒と断定された

調理従事者由来株とはMLVA型は異なっていた。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、保健所及び衛生試験所）による MLVA 精度管理
及び分子疫学手法活用に関する研究

研究分担者 山田和弘 愛知県衛生研究所
研究協力者 高橋佑太 愛知県衛生研究所
木全恵子 富山県衛生研究所
塩本高之 石川県保健環境センター
東方美保 福井県衛生環境研究センター
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所
野田万希子 岐阜県保健環境研究所
信田充弘 岐阜市衛生試験所
永井佑樹 三重県保健環境研究所
石黒亜基子 豊橋市保健所衛生試験所
中根邦彦 岡崎市総合検査センター
多和田光紀 豊田市衛生試験所

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）3 血清型（O157、O26、O111）に対する分子疫学解析法である Multiple-Locus Variable numbers tandem repeats analysis (MLVA) 法について、東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、保健所及び衛生試験所）のうち既に MLVA 法が実施可能な 8 施設を対象に、4 件の EHEC 抽出 DNA を用いて精度管理を実施した。また、愛知県内の中核市 3 市を対象に、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施した。東海・北陸ブロックで今年度分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を行った。

1. MLVA 法精度管理

各施設から提出された MLVA 法実施結果の各領域のリピート数を比較したところ、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックの MLVA 法の検査精度は良好であった。しかし、各施設における MLVA 法で得られるピークの高さには大きな差がみられ、判定に苦慮すると考えられる程度にピークが低い検体もあった。ピークの高さの施設ごとの差は使用するシーケンサーの違いや PCR 酵素及びプライマー濃度等の反応時点での違い等が考えられ、各施設で安定した結果を得ることを可能にすることは今後の課題であると考えられた。また、出力したファイルの貼り付けと結果の確認のみで、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすることが可能な記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

2. MLVA 法導入研修の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。今後も MLVA 法に関して、担当者間での情報共有が重要であり、研修会等の開催も継続的に必要であると考えられた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った。その結果、分離株全てが 95%程度の相同性があった。

A. 研究目的

東海・北陸ブロックはこれまでの研究班活動として、分子疫学手法である pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 及び IS-printing system (IS-PS) の精度管理を行ってきた。2018年6月、厚生労働省から事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」(MLVA 事務連絡)が発出され、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の遺伝子型別法を反復配列多型解析法 (Multiple-Locus Variable-number tandem repeats Analysis; MLVA) に統一することとなり、地方衛生研究所 (地衛研) において MLVA の導入が進められている。MLVA は、繰り返し配列を含む複数の遺伝子座から得られた PCR 産物について、それぞれの分子量に基づいて算出したリピート数を比較する方法である。数字のみでの比較が可能なため、他施設での実施結果と比較が容易といった利点があるが、数字のみの結果を比較するため、実施施設での検査の精度が保証されていることが必要となる。そこで、今年度の東海・北陸ブロック研究班活動では MLVA 法を既に導入している施設及び導入予定の実施可能施設を対象に、MLVA 法の精度管理を実施することで、東海・北陸ブロックの検査精度の保持・向上を目的とした。

さらに本年度から MLVA 法を導入する予定の施設に対し、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施することで、MLVA 法の導入を推進した。また、東海・北陸ブロックで今年度分子疫学手法を用いて解析した事例の報告も併せて行った。

B. 研究方法

1. MLVA 法精度管理

愛知県衛生研究所 (愛知衛研) から7施設 (衛生研究所4カ所、愛知県内中核市保健所若しくは衛生試験所3カ所) に試薬 (Qiagen Multiplex PCR kit)、リピート数未知 EHEC 抽出 DNA (0.5ng/ μ L) 4 検体 (0111 1 検体、0157 2 検体及び 026 1 検体)、リピート数既知 EHEC 抽出 DNA (0.5ng/ μ L) 3 検体 (0157 2 検体及び 026 1 検体)、MLVA 実施手順書 (別添) 及び MLVA 結果判定用エクセルファイルを配布した。配布した精度管理株のリピート数を

表1及び表2に示した。各施設において、配布 DNA に対して MLVA 法を実施し、MLVA 手順書に従い、GeneMapper からエクスポートした結果を MLVA 結果判定用エクセルシートに結果を貼り付け、当所へメールでの返答を依頼した。令和2年10月に抽出 DNA 及び試薬を各施設に送付し、11月に返信された解析結果を当所にてまとめた。また、MLVA 法に使用する PCR 使用機器、PCR 使用酵素、PCR 産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。アンケートの内容を表3に示す。なお、本研究においては分離菌株抽出 DNA のみを用いており、患者情報は利用していない。

2. MLVA 法導入研修の実施

MLVA 法の導入を予定している愛知県内中核市の3施設4名を対象として、令和2年6月25日・26日の2日間で、MLVA 導入研修を愛知県衛生研究所にて開催した。研修は愛知県衛生研究所職員が講師を担当し、MLVA 法の原理及び実際の手順に関する講義の後、EHEC 抽出 DNA 4件を使用した実習を行った。

C. 研究結果及びD. 考察

1. MLVA 法精度管理

各施設から提出された MLVA 法実施結果及び当所で実施した MLVA 法実施結果の各領域のリピート数を比較した。比較結果を表4に示す。検体 No.1 (0111) では8施設中1施設で結果が不一致であった。一致していなかった領域は 0157-34 であり、7施設においてリピート3と回答があったところ、不一致であった1施設においてはバンドが検出されなかった。検体 No.2 (0157)、検体 No.3 (026) 及び検体 No.4 (0157) では全施設で結果が一致した。

bin set のずれがみられたのは1施設あり、目視による修正を実施したと報告があった。ずれがみられた領域は検体 No.1 の2領域 (EHC-2 及び EH111-11)、検体 No.2 の1領域 (EH157-12) 及び検体 No.4 の1領域 (EH157-12) であった。目視による修正後の結果は他施設と一致していた。各施設における MLVA 法で得られるピークの高さには大きな差がみられた。2領域 (EH111-8 及び 0157-9) では、判定に苦慮する

と考えられる程度にピークが低い検体もあった。ピークの高さの施設ごとの差は使用するシーケンサーの違いやPCR酵素及びプライマー濃度等の反応時点での違い等が考えられた。今回の精度管理においては、ピーク高さの違いによる判定不一致は見られなかったが、今後、低ピークをノイズとして判定することによる誤判定をしてしまう可能性はある。各施設で安定した結果を得ることを可能にすることは今後の課題であると考えられた。

アンケートの結果を表6に示す。PCR使用機器はApplied Biosystems Veritiが4施設、BioRad T100が1施設、GeneAmp PCR System 9700が1施設、SimpliAmp サーマルサイクラーが1施設、TaKaRa PCR Thermal Cycler DiceTM TP600が1施設であり、全ての施設でRamp rateについての回答はなかった。PCR使用酵素はQIAGEN Multiplex PCR kitを使用しているのが7施設、QIAGEN Multiplex PCR plus kitを使用しているのが1施設であった。PCR産物の希釈倍率は50倍希釈が2施設、100倍希釈が5施設あり、1施設では100倍希釈で実施後、ピーク高さを見て希釈倍率を20から50倍で調整していた。使用シーケンサーは3500 Genetic Analyzer Seriesが7施設、SeqStudioが1施設であった。データ解析時使用Bin setは全ての施設において、感染研から配布されたBin setを使用していた。陽性コントロールの使用頻度は毎回使用しているのが3施設、結果に違和感を覚えたときに使用するのが4施設、使用していない施設が1施設であった。陽性コントロールは自施設での検査精度を確認するうえで重要となるため、できる限り使用することが望ましいと考えられる。ピークとして判定する高さは自施設で閾値を設定して判定している施設が3施設、陽性コントロールを参考にする判定するとした施設が2施設あり、それ以外に波形、stutter peak、pull-up peak等から判定している施設や、ピーク高さが低かった場合に再試験を実施する施設があった。MLVA法の実施に関する機器や試薬に関する回答に比べ、判定に関する回答内容は多岐にわたっており、判定に関する研修や判定の統一プロトコルの作成等を行うことが、今後必要となると考えられた。

今回の精度管理ではMLVA結果判定用エクセルファイルも同時に配布したため、領域等の転記ミス等の人的ミスは見られなかった。本ファイルではエクセルのVLOOKUP関数やVALUE関数を利用して、GeneMapperでの解析結果をMLVA事務連絡別添2ファイル中の領域順へと並べ替えをしている。エクセルファイルの一部を表6に示す。MLVA法は数字のみでの比較が可能な方法であるため、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすることが重要である。そのため、出力ファイルの貼り付けと結果の確認のみですむMLVA結果判定用エクセルファイル等の記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

以上の結果、ピークの大小の差はあったが、リピート数が大きく外れていた施設は認められず、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックのMLVA法の検査精度は良好であると考えられた。

2. MLVA導入研修会の実施

MLVA導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。特にGeneMapperの使用方法及びデータのエクспорт方法に関する実習が、今後のためになったとの意見が多く聞かれた。今後もMLVA法に関して、担当者間での情報共有が重要であると考えられた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された*Shigella sonnei* 集団感染事例についてPFGE解析を行った(図1)。その結果、分離株全てが95%程度の相同性があった。

E. 結論

1. MLVA法精度管理

各施設から提出されたMLVA法実施結果の各領域のリピート数を比較したところ、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックのMLVA法の検査精度は良好であった。しかし、各施設におけるMLVA法で得られるピークの高さには大きな差がみられ、判定に苦慮する程度にピークが低い検体もあったこと

から、各施設で安定した結果を得ることを可能にすることが今後の課題であると考えられた。

また、出力ファイルの貼り付けと結果の確認のみで、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすことが可能な記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

2. MLVA 導入研修会の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。今後も MLVA 法に関して、担当者間での情報共有が重要であり、研修会等の開催も継続的に必要であると考えられた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った。その結果、分離株全てが 95%程度の相同性があった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 リピート数未知 EHEC の MLVA 法におけるリピート数

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		EH111-11	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
検体No.1	111	3	1	10	2	-2	8	11	9	6	-2	3	8	2	-2	1	-2	8
検体No.2	157	2	-2	1	7	-2	11	4	-2	-2	18	9	15	5	3	7	6	7
検体No.3	26	2	1	1	2	3	8	23	-2	-2	-2	1	13	2	-2	1	-2	-2
検体No.4	157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	24	9	10	3	6	8	-2	9

表 2 リピート数既知 EHEC の MLVA 法におけるリピート数

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		EH111-11	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
陽性コントロール1	157	2	-2	1	4	-2	5	6	-2	12	-2	9	7	3	9	7	5	3
陽性コントロール2	157	2	-2	1	4	-2	5	4	12	-2	13	12	10	5	4	4	12	7
陽性コントロール3	26	2	1	1	2	5	3	19	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2

表 3 MLVA 法に関するアンケート

PCR使用機器																		
	(Ramp rateを変更した場合はその旨の記載をお願いします)																	
PCR使用酵素	QIAGEN Multiplex PCR kit その他の場合 QIAGEN Multiplex PCR plus kit Platinum™ Multiplex PCR Master Mix その他																	
PCR産物の希釈倍率	倍 希釈方法 PCR産物 μ L DW μ L																	
使用シーケンサー																		
データ時使用Bin	自作Bin その他の場合 感染研配布Bin その他																	
PCの使用頻度	毎回 その他の場合 試薬等を変更したとき 結果に違和感を覚えたとき その他																	
ピークとして判定するHight	1000以上 その他の場合 500以上 PCを参考にする その他																	

表 4 令和 2 年度東海・北陸ブロック MLVA 法精度管理の結果

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
検体No.1	111	EH111-11	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
average		2448.6	2778.0	1627.5	3488.3	-2	3645	5548.6	2034.1	5094.4	-2	1509.1	1503.3	2454.1	-2	4911.4	-2	1670.3
median		2194	1947.5	1498.5	3287.5		3583	5469	1923	4188.5		1330	1112	2411		4079.5		1190.5
max		6046	5882	4025	8113		6548	12481	3975	12279		3879	3638	5164		10799		5568
min		473	1158	519	1025		740	967	460	1164		359	138	604		1010		526
note		bin修正有						bin修正有				不検出あり						
検体No.2	157	2	-2	1	7	-2	11	4	-2	-2	18	9	15	5	3	7	6	7
average		2372.3		1149.5	2908.9		3853.4	6440.4			4681.8	1606.0	4621.6	2761.8	2774.4	4480.6	4702.0	2139.6
median		1736		598	2300.5		3537	5458			5098	989	4222	2463	1374.5	2750	2605	1048.5
max		6133		4901	7164		7507	15123			7320	3561	10881	6066	9609	10100	13915	8236
min		374		238	622		541	698			475	465	273	496	405	899	730	253
note					bin修正有													
検体No.3	26	2	1	1	2	3	8	23	-2	-2	-2	1	13	2	-2	1	-2	-2
average		2048.1	2021.4	2146.5	3119.9	2418.0	3224.3	3490.8				1611.6	1260.1	2272.4		3685.8		
median		1752	1542.5	1026	2569	2120.5	2650.5	2881				1063	795.5	1780		3084		
max		4488	4091	9898	10632	5264	7193	10018				4987	3057	7003		8626		
min		730	912	197	545	715	786	768				236	92	658		829		
note																		
検体No.4	157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	24	9	10	3	6	8	-2	9
average		2230.9		1037.5	2779.9		3537.6	6068.0			3600.5	1419.4	4793.5	2449.4	2437.3	4005.6		2138.5
median		2535.5		506	2248		3193	5287.5			3699	1225	4340.5	2068.5	1991	3843		1880
max		3974		4267	6256		6549	13425			5548	3044	10009	5157	5733	6601		4564
min		553		167	1336		955	1378			783	229	873	853	628	937		692
note					bin修正有													

表5 MLVA 結果判定用エクセルファイル抜粋

mix1									
#	Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 1-1	Allele 2	Height 2	Sample Name	Marker	Height
1	mix1_XXXXXXXX	O157-34	153-01	6999			XXXXXXXX	O157-34	01
2	mix1_XXXXXXXX	EHC-2	340-21	14685				EHC-2	21
3	mix1_XXXXXXXX	O157-9	520-09	10427				O157-9	09
4	mix1_XXXXXXXX	EHC-1	135-10	12402				EHC-1	10
5	mix1_XXXXXXXX	EHC-5	121-02	5975	181-12	3302		EHC-5	02
6	mix1_XXXXXXXX	O157-3						O157-3	-2
7	mix1_XXXXXXXX	O157-25	122-02	300				O157-25	NG
8	mix1_XXXXXXXX	EH157-12	415-02	8618				EH157-12	02
9	mix1_XXXXXXXX	EH111-8	237-01	7158				EH111-8	01

GeneMapperからのExportファイルを貼り付け

2本目のピークがある場合はこちらに表示 (セル青色)

ピークの高さが1000以下の場合、“NG”と表示
ピークと判断した場合、数式内部の“1000”を
適当な数字に変更

=IFERROR(VALUE(VLOOKUP(AO2,\$J\$3:\$K\$11,2,FALSE)),"NG")

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	
XXXXXXXX	3	1	1	2	-2	10	21	2	6	-2	1	9	NG	-2	1	-2	8

表6 アンケート結果

PCR使用機器	施設数	使用シーケンサー	施設数	ピークとして判定するHight	施設数
Applied Biosystems Veriti	4	3500 Genetic Analyzer	6	500以上	1
BioRad T100	1	3500xL Genetic Analyzer	1	PCを参考にする	2
GeneAmp PCR System 9700	1	SeqStudio	1	その他	5
SimpliAmpサーマルサイクラー	1	総計	8	波形等から確認	
TaKaRa PCR Thermal Cycler DiceTM TP600	1	データ解析時使用Bin	施設数	200以上	
総計	8	感染研配布Bin	8	約175	
PCR使用酵素	施設数	総計	8	100以上 (再試験実施)	
QIAGEN Multiplex PCR kit	7	PCの使用頻度	施設数	総計	8
QIAGEN Multiplex PCR plus kit	1	毎回	3		
総計	8	結果に違和感を覚えたとき	4		
PCR産物の希釈倍率	施設数	その他 (使用していない)	1		
50	2	総計	8		
100	5				
20~100	1				
総計	8				

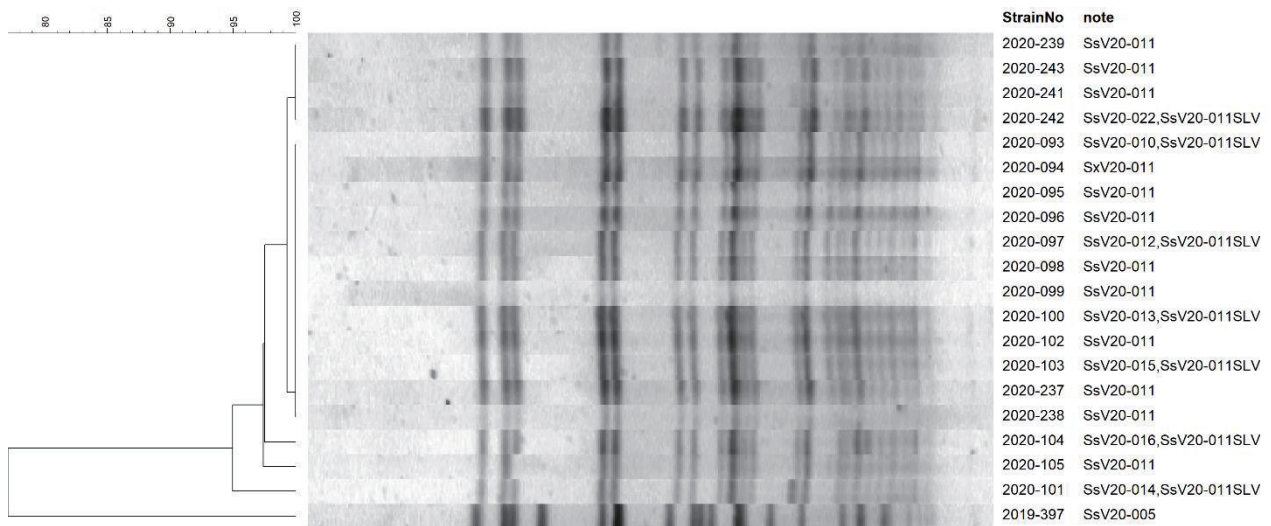
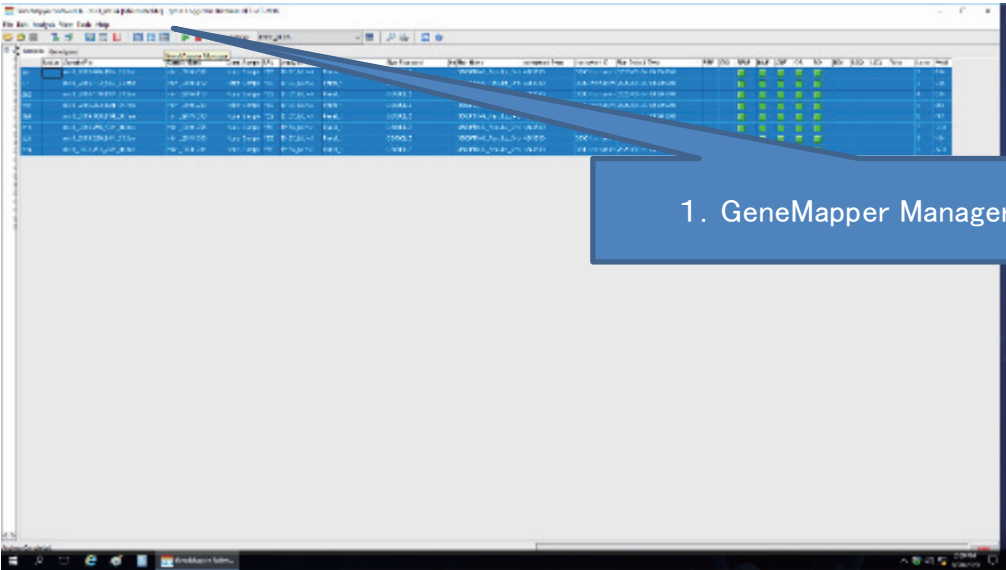


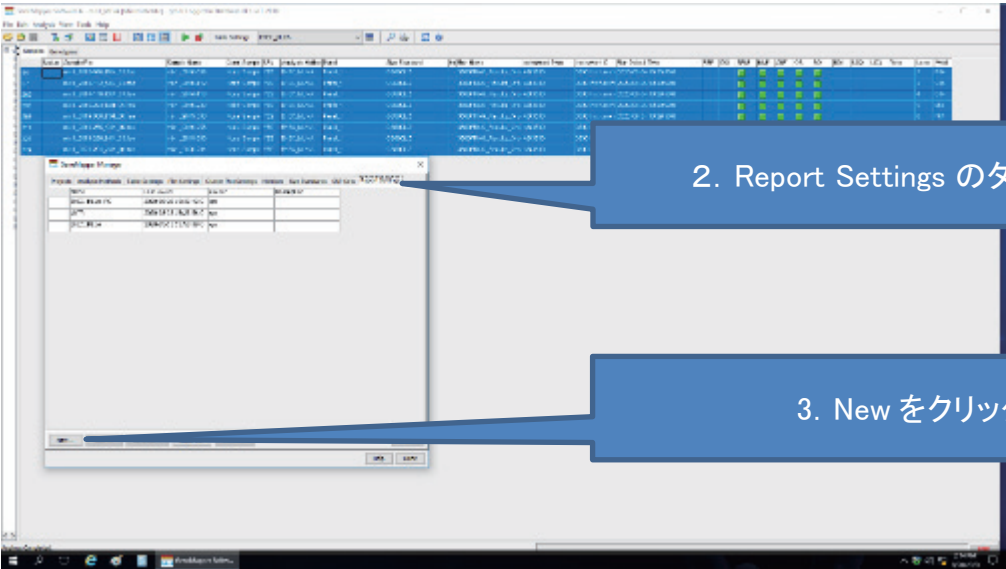
図1 *Shigella sonnei* の PFGE 図

note に記載されているのは国立感染症研究所にて実施した MLVA 法の解析結果

(別添) MLVA 実施手順書 (GeneMapper からのデータの Export の手順のみ抜粋)

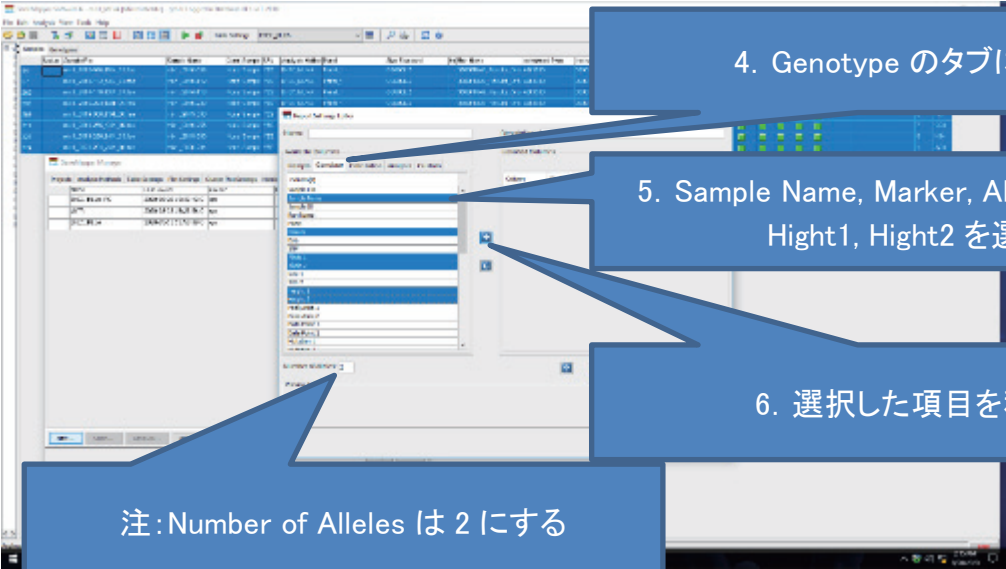


1. GeneMapper Manager をクリック



2. Report Settings のタブに移動

3. New をクリック

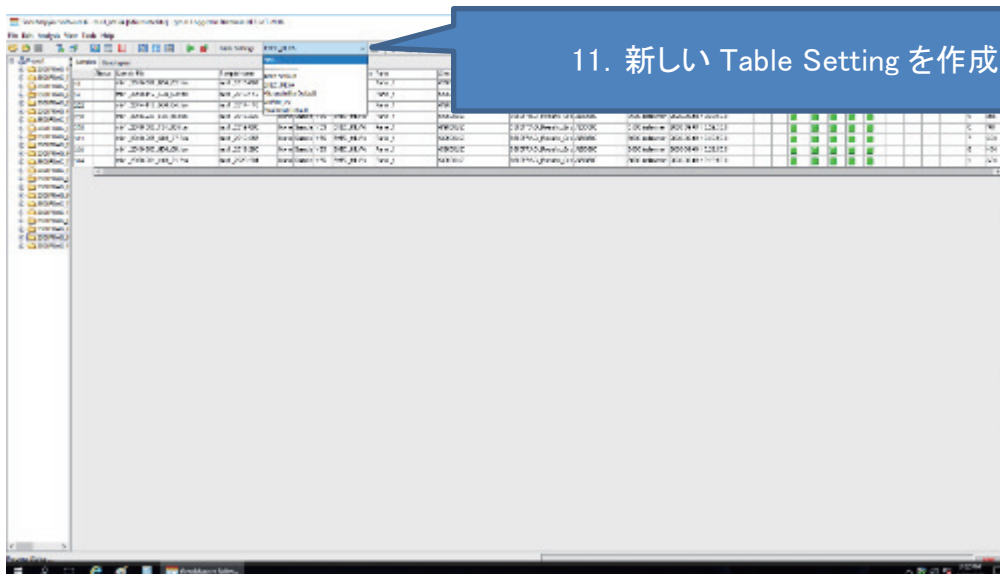
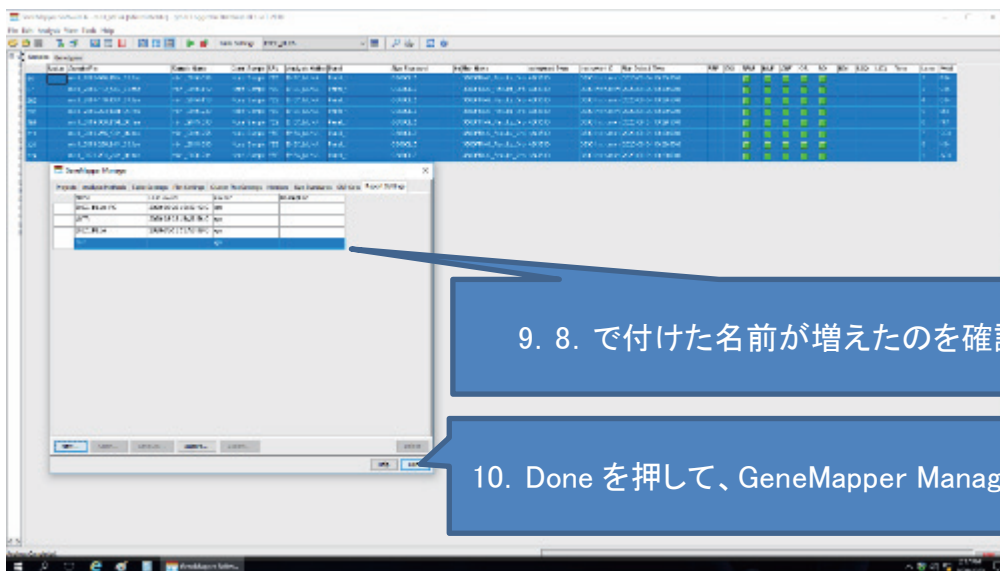
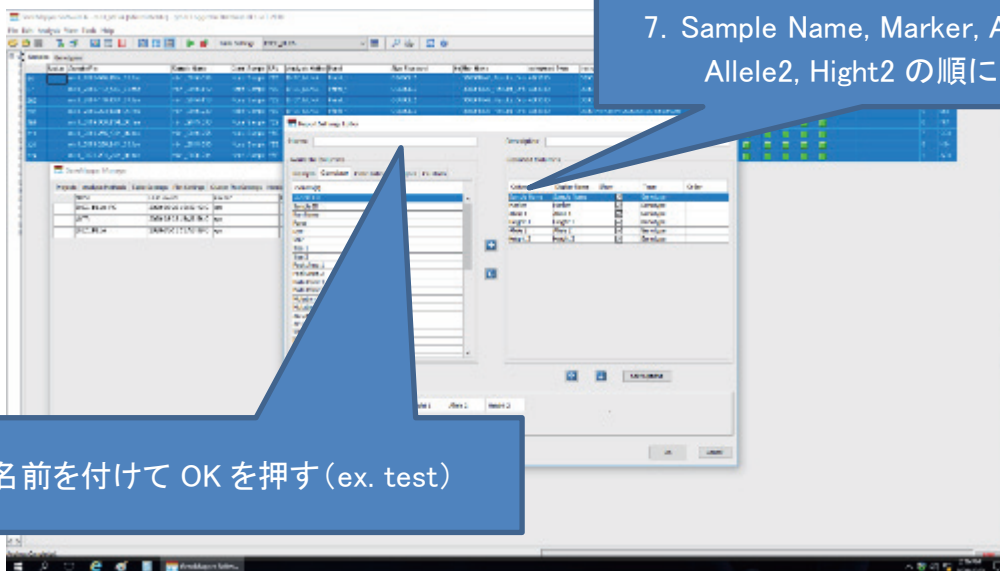


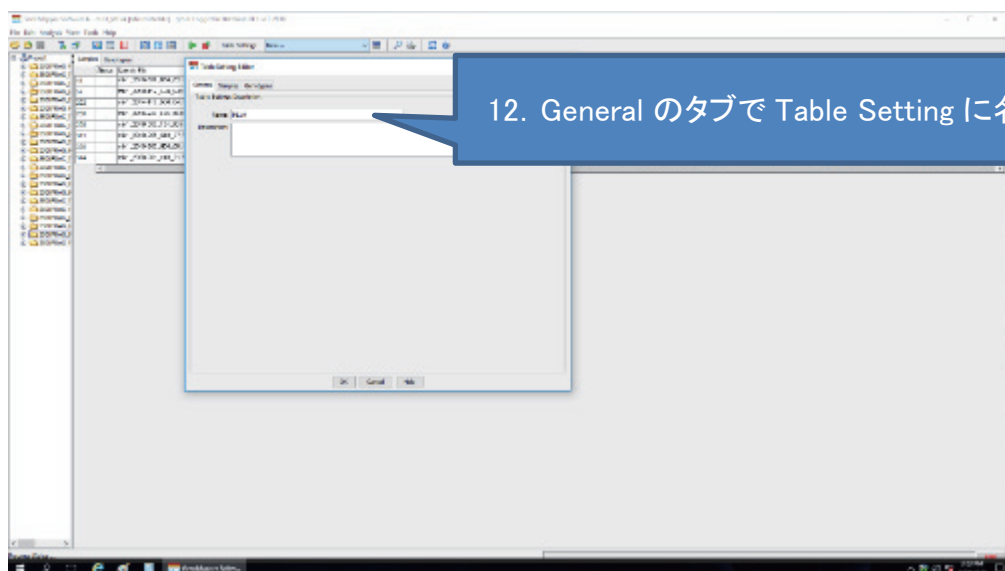
4. Genotype のタブに移動

5. Sample Name, Marker, Allele1, Allele2, Height1, Height2 を選択

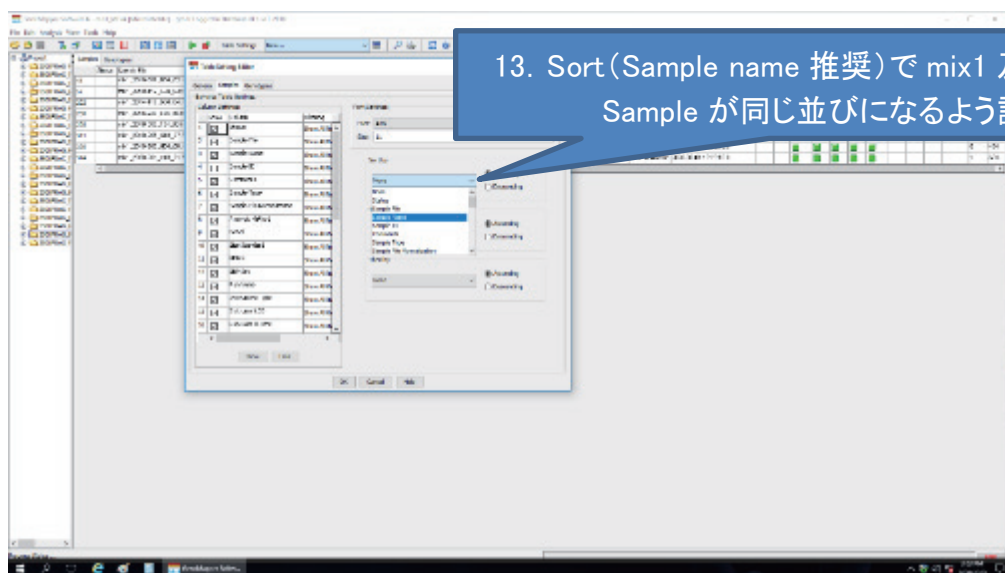
6. 選択した項目を移動

注: Number of Alleles は 2 にする

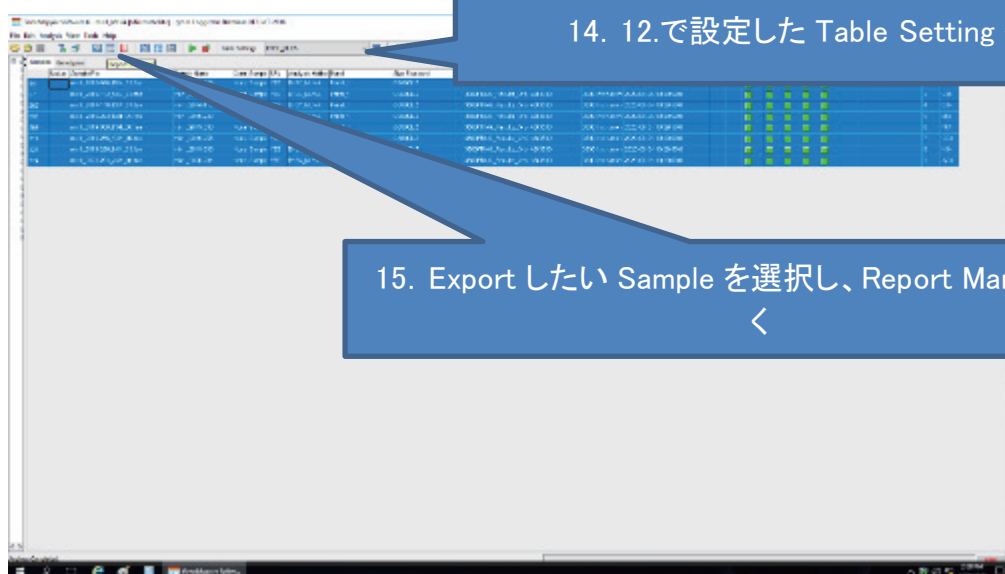




12. General のタブで Table Setting に名前を付ける

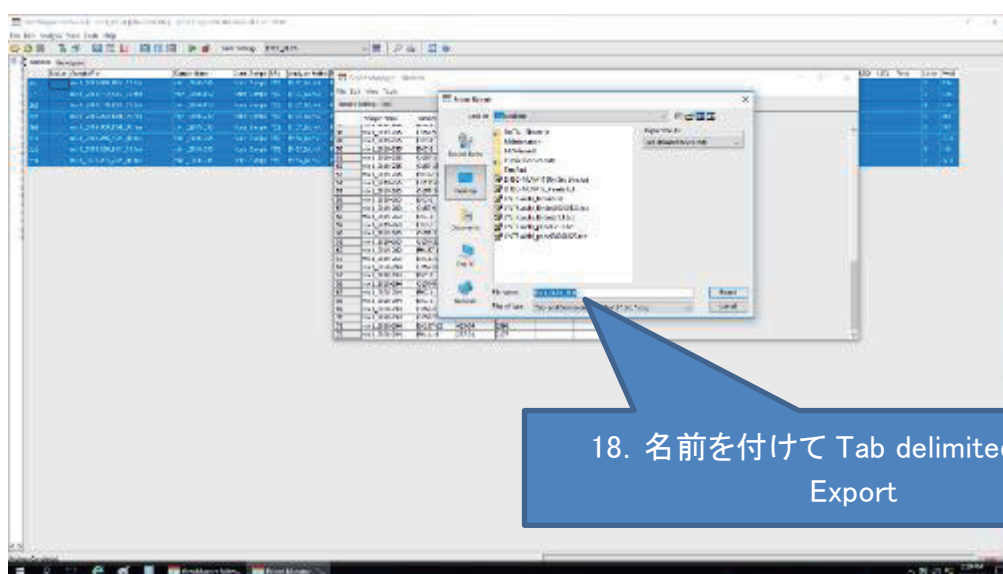
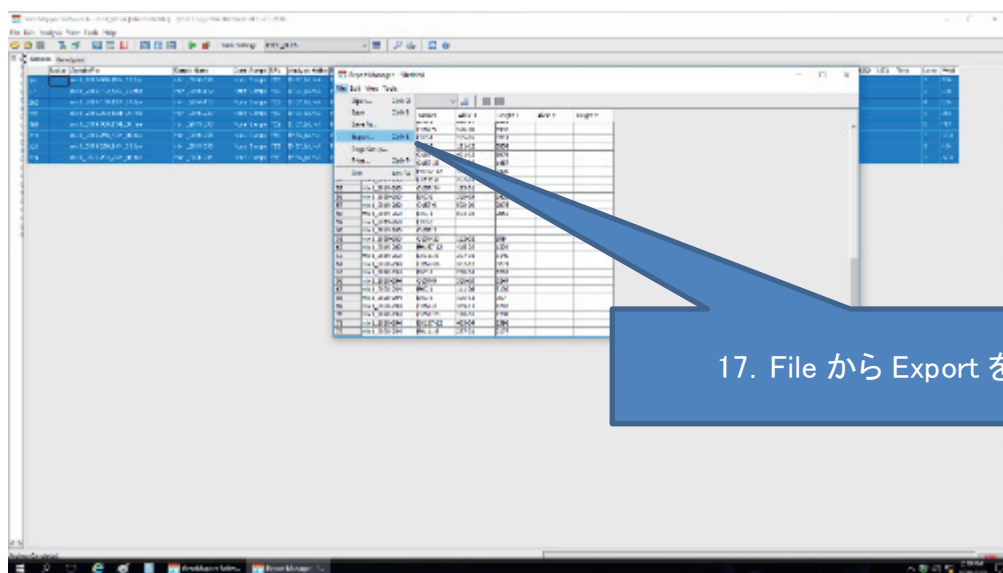
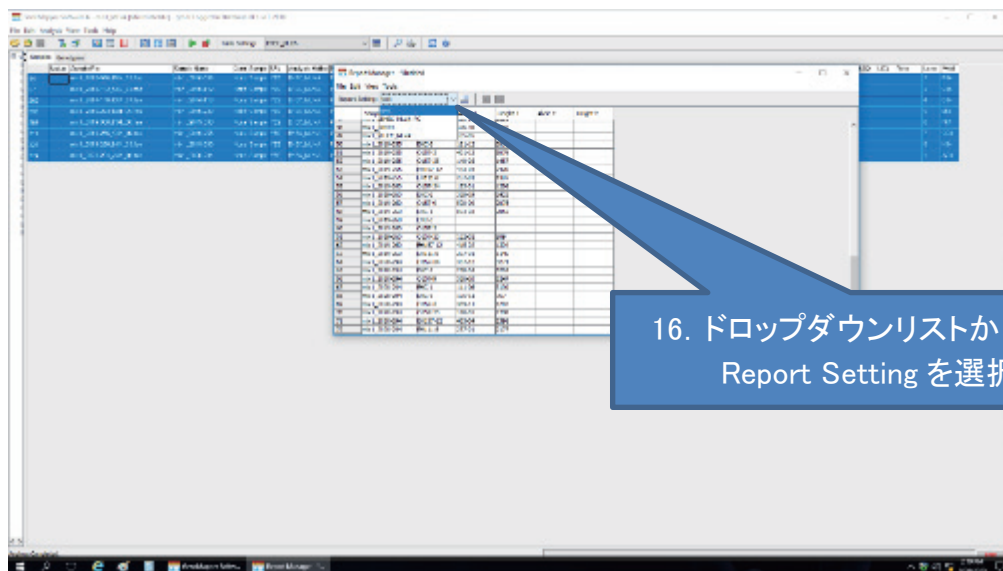


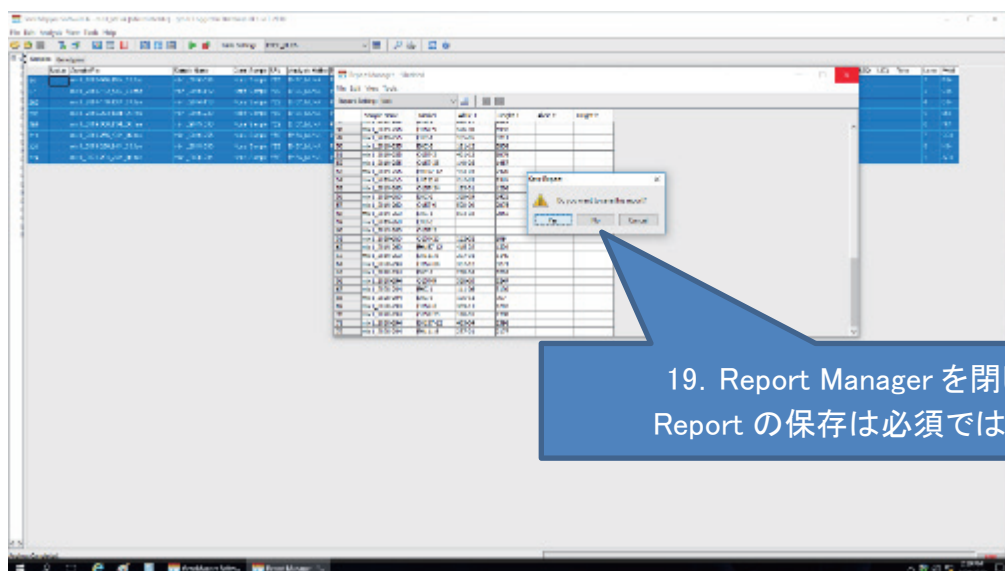
13. Sort (Sample name 推奨) で mix1 及び mix2 の Sample が同じ並びになるよう設定



14. 12.で設定した Table Setting を選択

15. Export したい Sample を選択し、Report Manager を開く





Export file (Tab delimited text) を MLVA 解析用エクセルファイルに貼り付ける (Sample 48 件まで貼り付けることが可能)。

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 2 年度分担研究報告書

高度解析法の構築と近畿ブロックにおける情報共有体制の構築の検討

研究分担者	河合高生	地方独立行政法人大阪健康安全 基盤研究所
研究協力者	若林友騎、梅川奈央、高橋佑介 原田哲也、河原隆二、勢戸和子 石川和彦 浅井紀夫、小仲兼次 渡辺正義 荻田堅一、齋藤悦子 濱夏樹、野本竜平 横田隼一郎、黒田久美子 平垣内雅規、平田翔子 福田弘美、岩崎直昭 吉田孝子 池端孝清 庄真理子	地方独立行政法人大阪健康安全 基盤研究所 滋賀県衛生科学センター 京都府保健環境研究所 京都市衛生環境研究所 兵庫県立健康生活科学研究所 神戸市環境保健研究所 姫路市環境衛生研究所 尼崎市衛生研究所 堺市衛生研究所 奈良県保健研究センター 和歌山市衛生研究所 和歌山県環境衛生研究センター

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）の遺伝子型別法である反復配列多型解析法（Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis ; MLVA）の地方衛生研究所（地衛研）への導入促進を目的として、平成 30 年度から検討を継続している MLVA 新規解析法に改良を加え、その有効性を評価した。近畿ブロック内の研究協力地衛研 10 施設を対象に結果の信頼性確保のための精度管理を実施した。また、MLVA に関する Q&A を作成し、地衛研における MLVA の導入・実施を支援した。研究協力地衛研 5 施設とともに改良した MLVA 新規解析法を評価した結果、1 施設を除いて、供試した 83%以上の菌株について 17 遺伝子座すべてのリピート数を正確に決定することができた。MLVA 新規解析法は、他施設で作成された bin 設定ファイルをインポートする既存の方法と比較して、同等以上の精度でリピート数を決定できると考えられた。MLVA の精度管理については、10 施設中 4 施設が配布した 12 株すべてを正しく解答した一方で、3 施設は 2 株以上を誤答し、施設間で MLVA の技術レベルに差があることが明らかになった。継続的な精度管理の実施による技術レベルの底上げが必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品由来感染症において原因菌の分子疫学解析は行政対応に重要なツールである。近畿ブロックの地方衛生研究所（地衛研）では、腸管出血性大腸菌（EHEC）の遺伝子型別法として、IS-printing System（IS）法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法を共通の解析手法として使用してきた。近年、EHEC の遺伝子型別法を反復配列多型解析法（Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis ; MLVA）に統一する旨が通知されたことを受け、地衛研において MLVA の導入が進められている。MLVA は、繰り返し配列を含む複数の遺伝子座から得られた PCR 産物について、それぞれの分子量に基づいて算出したリピート数を比較する方法である。MLVA の大きな利点の一つは、各実施施設で得られた結果を容易に比較できることにあるが、このためには各施設で正確にリピート数を決定できることが大前提となる。通常、各遺伝子座のリピート数を算出するには、実際に検査で使用する機器を用いて bin セットを構築することが必須となる。しかし、bin セットの構築には各遺伝子座について様々なリピート数を保有する多数の菌株を解析する必要があるため、これが MLVA 導入の際の障害の 1 つになることが多い。

本分担研究では、24 株の参照株の解析結果から回帰分析を実施し、その分析結果に基づいてリピート数を決定する、新規のリピート数決定法（新規解析法）の開発を進めてきた。昨年度の研究では、遺伝子座 EHC-6 は他の遺伝子座と比較して、リピー

ト数を正確に決定できる菌株の割合が低いことが明らかになった。遺伝子座 EHC-6 は、回帰分析に用いた参照株のリピート数の最小値が 3（塩基長 414 bp）、最大値が 33（塩基長 684 bp）であり、他の遺伝子座と比較してリピート数の幅が広い。そのため、直線回帰では高分子量領域において推定値と実測値に乖離が生じ、これが精度を低下させる要因であると考えられた。そこで、本年度はより実測値に適合した回帰モデルとして、多項式回帰分析を採用し、遺伝子座 EHC-6 の決定精度の改善を試みた。

また、結果の信頼性確保を目的とする MLVA の精度管理を実施するとともに、MLVA 実施時に躓きやすいポイントあるいは悩みやすいポイントをまとめた Q&A を作成することで、近畿ブロックにおける MLVA の導入・実施を支援した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

自作 bin セットの作成には、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所（大安研）で保存している EHEC 24 株（参照株、表 1）を使用した。MLVA の精度管理には、大安研で保存している EHEC 12 株を使用した（精度管理株、表 2）。新規解析法の評価には、各協力地衛研で今年度に収集された菌株を使用した。

2. MLVA の実施

MLVA は、腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック（O157、O26、O111 編 第一版（Ver. 1.2）2018 年 11 月編 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググル

ープ編)を参照して実施した。

3. 遺伝子座 EHC-6 の回帰分析

参照株 24 株のうち増幅産物が得られた 7 株 (2020-08、-14、-15、-16、-21、-23、-24) の泳動データを用いて、単回帰分析と二次多項式回帰分析を実施した。また、これらの結果に基づき、それぞれの bin セットを作成し、過去に大安研で解析した 44 株についてリピート数を決定した。

4. 回帰分析に基づく bin セットの作成

MLVA の新規解析法の評価を担う当所(大安研)ならびに近畿ブロックの地衛研 5 施設においては、参照株 24 株の DNA を用いて MLVA を実施し、保有するキャピラリー式シーケンサーで泳動した際の増幅産物サイズを測定した。参照株のリピート数を説明変数、各施設で泳動した時の増幅産物サイズを目的変数として、表計算ソフト Excel を用いて単回帰分析を実施した。遺伝子座 O157-34 および遺伝子座 O157-19 については、リピート数がそれぞれ 1 となる 5 株 (2020-6、-13、-14、-15、-22) および 10 株 (2020-6、-7、-8、-13、-14、-15、-16、-22、-23、-24) のデータを除いて回帰分析を実施した。遺伝子座 EHC-6 については、二次多項式回帰分析を実施した。得られた回帰分析結果について、回帰直線と回帰係数の有意性の検定を行い、危険率を 5%として評価した。

回帰直線から得られた各リピート数に応じて予測される PCR 増幅産物サイズを bin の中央値とし、bin のオフセット値を ± 1.5 bp として bin セットを作成した。遺伝子座 O157-34 および遺伝子座 O157-19 のリピート数が 1 の bin は、上述の 5 株および 10 株

の増幅産物サイズの平均値 ± 1.5 bp として作成した。

5. 自作 bin セットの評価

施設毎に作成した bin セットを自施設の解析ソフト (GeneMapper) にインポートし、自作 bin セットとして解析に使用した。また、平成 30 年に国立感染症研究所 (感染研) から分与された bin セットを同様にインポートし、感染研 bin セットとして解析に使用した。各施設で分離された EHEC O157、O26、O111 について MLVA を実施し、自作 bin セットおよび感染研 bin セットを用いてリピート数を決定した。リピート数の決定は表 3 の基準に従って実施した。

評価に用いた菌株は感染研に送付し、MLVA の実施を依頼した。感染研での解析結果を当該菌株の標準リピート数とし、施設毎に自作 bin セットあるいは感染研 bin セットを用いて決定したリピート数との一致率を比較した。

6. MLVA の精度管理

精度管理の対象とした 10 施設に、12 株の精度管理株から抽出した DNA を送付した。精度管理株のリピート数を表 2 に示す。各施設には、遺伝子座毎のリピート数を記入した判定表の提出を求めた。判定できない遺伝子座が存在する場合は、その遺伝子座のリピート数は空欄とし、欄外に判定できない理由を記載することとした。17 遺伝子座すべてのリピート数を正確に決定できた場合を正答とみなした。ただし、EQA20-04 の遺伝子座 O157-25 および EQA20-11 の遺伝子座 O157-37 については、判定できない理由が適切に記載されている場合、空欄のま

までも正答とみなした。

7. MLVA に関する Q&A の作成

近畿ブロックの協力地衛研に対して、MLVA に関する質問事項をメールで募集した。集まった質問事項に回答を加筆し、MLVA に関する Q&A を作成した。作成した Q&A を近畿ブロックの協力地衛研にメールで配布した。

(倫理面への配慮)

本研究で取り扱う菌株および感染者情報は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に基づく調査によって得られたもので、個人情報情報は研究参加施設において匿名化し、厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 新規解析法の改良

遺伝子座 EHC-6 について、単回帰分析と二次多項式回帰分析を実施した。増幅産物が得られた参照株 7 株のデータに基づいて回帰分析を実施したところ、自由度修正済み決定係数が単回帰分析では 0.999872、二次多項式回帰分析では 0.999998 となり、二次多項式回帰分析を用いることで決定係数がより 1.0 に近似した。

次に、単回帰分析および二次多項式回帰分析の結果に基づいて bin セットを作成し、遺伝子座 EHC-6 のリポート数を決定できた株数を比較した。過去に大安研で解析した菌株のうち、遺伝子座 EHC-6 で増幅産物が得られた 44 株の泳動データを用いたところ、単回帰分析では 8 株のリポート数を決定できなかった (表 4)。リポート数ごとに比較すると、リポート数が 3~12 までの菌株は

単回帰分析でリポート数を決定できたものの、リポート数が 13 の菌株は 3 株中 1 株が、リポート数が 16~21 の菌株はすべてがリポート数を決定できなかった。一方、二次多項式回帰分析を用いた場合は、44 株すべてのリポート数を決定できた。この結果、遺伝子座 EHC-6 には、回帰モデルとして二次多項式回帰を採用することにした。

2. 改良自作 bin セットの評価

当所と研究協力地衛研 5 施設において、自施設で収集した菌株を用いて MLVA を実施し、改良した自作 bin セットおよび感染研 bin セットを使用してリポート数をそれぞれ決定した。決定したリポート数が標準リポート数と一致した菌株の割合を表 5 に示した。施設 No. 4 を除く 5 施設すべてにおいて、自作 bin セットを用いることで、供試菌株の 83% 以上について 17 遺伝子座すべてのリポート数を決定できた。感染研 bin セットを使用した際の一致率と比較すると、自作 bin セットの一致率は、感染研 bin セットのそれと同等以上であった。各 bin セットを用いてリポート数を決定あるいは推定した菌株の割合を表 6 に示した。

自作 bin セットを使用して解析した場合、施設 No. 1 では、6 株中 5 株 (83%) で 17 遺伝子座のリポート数はすべて標準リポート数と一致した。リポート数が一致しなかった 1 株では、決定した遺伝子座 O157-37 のリポート数は 8 であったが、標準リポート数は 9 であった。

施設 No. 2 では、30 株中 25 株 (83%) で 17 遺伝子座すべてのリポート数が標準リポート数と一致した。自作 bin セットでリポー

ト数を決定できなかった遺伝子座のうち、遺伝子座 EHC-1 は近傍の bin からリピート数を推定できた。しかし、遺伝子座 O157-36、遺伝子座 O157-37、遺伝子座 EHC-6 では各 1 株ずつについては、自作 bin セットで決定したリピート数と標準リピート数に差異が見られた。すなわち、上記 3 遺伝子座では、決定したリピート数はそれぞれ、9、6、3 であったが、標準リピート数はいずれも「-2」（増幅なし）であった。また、1 株については、遺伝子座 O157-37 で bin セットの範囲外にピークが検出されたため、リピート数を決定することができなかった。

施設 No. 3 および No. 6 ではそれぞれ 15 株、33 株を解析し、自作 bin セットの使用により、全株について 17 遺伝子座すべてのリピート数が標準リピート数と一致した。

施設 No. 4 では 2 株を解析したが、遺伝子座 EH111-11 および遺伝子座 EH157-12 のリピート数を自作 bin セットで決定できなかった。しかし、いずれの遺伝子座も近傍の bin からリピート数を推定することは可能であった。

施設 No. 5 では、17 株中 16 株（94%）で自作 bin セットで決定したリピート数は標準リピート数と一致した。リピート数を決定できなかった 1 株は、遺伝子座 O157-9 においてピークが bin から外れたものであったが、近傍の bin からリピート数を推定することは可能であった。

遺伝子座 EHC-6 については、6 施設で解析した合計 121 株のうち 7 株で、増幅産物が検出された。このうち 6 株は、自作 bin セットを使用して決定したリピート数と標準

リピート数が一致した。結果が一致しなかった 1 株では、決定したリピート数は 3 であったが、標準リピート数は「-2」（増幅なし）であった。

感染研 bin セットを使用して解析した場合、4 施設では決定したリピート数が標準リピート数と一致する菌株は 1 株もなく、リピート数が一致した株の割合は、施設 No. 1 の 83%が最大であった。リピート数を決定できなかった菌株のほとんどは、近傍の bin からリピート数を推定することが可能だったため、施設 No. 1、No. 2、No. 4、No. 5 においては、それぞれで供試した菌株の 83%、93%、100%、100%で、決定または推定したリピート数が標準リピート数と一致した。また、この 4 施設では、自作 bin セットの範囲外にピークが検出されたためにリピート数を決定できなかった施設 No. 2 の 1 株を除き、感染研 bin セットと自作 bin セットの結果が一致した。一方、施設 No. 3 および施設 No. 6 においては、感染研 bin セットを用いて決定または推定したリピート数が標準リピート数と一致した菌株の割合は、それぞれ 80%、9%となり、自作 bin セットを用いた場合のそれと比較して、低い割合であった。

3. MLVA の精度管理

参加した 10 施設の精度管理結果を表 7 に示す。配布した 12 株すべてで正答が報告された施設は 4 施設であった。一方、結果に誤りが認められた 6 施設のうち 3 施設は、2 株以上を誤答した。EQA20-04 は、遺伝子座 O157-25 のリピート数が 16 の株で、感染研 bin セットの範囲外にピークが検出される

(図 1-1)。この株の遺伝子座 O157-25 については、2 施設が「-2」(増幅なし)と解答した。同様に、感染研 bin セットの範囲外にピークが検出される EQA20-11 の遺伝子座 O157-37 についても(図 1-2)、3 施設が「-2」(増幅なし)と解答した。また、EQA20-07 については、10 施設すべてが正しいリピート数を報告したが、3 施設は遺伝子座 EHC-5 について、正答のピークと同時に検出される小ピーク(ダブルピーク)に関する記載がなかった。加えて、遺伝子座 O157-36 と遺伝子座 O157-37 の解答が逆になっている、「-2」(増幅なし)が正答のところを 2 と解答しているなど、結果の転記ミスと疑われる誤答がいくつか認められた。

4. MLVA に関する Q&A の作成

近畿ブロックの協力地衛研にメールで MLVA に関する質問事項を募集し、9 施設から計 31 項目の質問を得た。得られた質問を項目ごとに分類し、Q&A 形式にして回答を追記した上で、協力地衛研に配布した(別紙 1)。

D. 考察

平成 30 年度から検討を続けている新規リピート数決定法を改良した。遺伝子座 EHC-6 について、二次多項式回帰分析を用いてリピート数決定率の向上を試みたところ、増幅産物が得られた 7 株中、6 株のリピート数を正確に決定できた。残りの 1 株では、感染研の解析結果と一致しなかったが、リピート数を 3 と決定することができた。この 1 株については、感染研に菌株を搬送し、感染研で MLVA を実施するまでの間に

変異が生じ、遺伝子座 EHC-6 のリピート数に変化した可能性が考えられた。遺伝子座 EHC-6 にピークが出現する保存株を使った解析において、44 株すべてでリピート数を決定できたことも踏まえると、本遺伝子座については、二次多項式回帰分析を用いることでリピート数の決定精度を改善できると考えられた。

MLVA のリピート数決定法として、他施設で作成された bin セットを使用する方法がしばしば用いられる。この方法は、簡便であるが、MLVA を実施する施設環境によっては bin セットにずれが生じ、リピート数を正しく決定できない場合がある。本研究でも、感染研 bin セットを使用した場合、施設 No. 3~No. 6 では、一部の遺伝子座で bin セットのずれが生じたために、リピート数を決定できなかった。一方で、開発した解析法は、各施設で解析した泳動データを元に回帰分析を実施して bin セットを作成するため、上記のようなずれは生じにくいと考えられる。実際、施設 No. 4 を除いた 5 施設では、83%以上の一致率でリピート数を決定できており、感染研 bin セットを用いた場合と比べても同等以上の成績が得られた(表 5)。

施設 No. 4 については、自作 bin セットを用いた場合、遺伝子座 EH111-11 と遺伝子座 EH157-12 のリピート数を決定できなかった。これは、bin セット作成のために参照株の MLVA を実施したときと bin セットの評価のために MLVA を実施したときで、泳動距離に差が生じたことを示唆している。この要因として、泳動時の気温や使用したポリマ

一のロットなど、泳動条件の違いが存在したと考えられた。

近傍の bin からリポート数を推定できた菌株を含めると、施設 No. 1、No. 4、No. 5 では、自作 bin セットの結果と感染研 bin セットの結果が一致した（表 6）。施設 No. 3 および No. 6 においては、自作 bin セットの方が、感染研 bin セットより高い精度でリポート数を推定できており、リポート数を推定できた菌株を含めた場合も、自作 bin セットは感染研 bin セットと比較して、同等以上の成績が得られると考えられた。一方、施設 No. 2 において、bin セットの範囲外にピークが出現したためにリポート数を決定できなかった株が 1 株報告されており、定期的に回帰分析に用いる参照株の見直しを行い、bin セットの範囲を拡張することが重要であると考えられた。

MLVA の精度管理結果は、施設ごとの正答数に差が見られ、近畿ブロック内の地衛研の MLVA 技術レベルには差があることが明らかになった。特に、bin セットの範囲外にピークが出現する場合に判定を誤るケースが多かった。感染研から定期的に注意喚起されているものの、bin セットの範囲外にピークが出現する場合があることを改めて周知する必要があると考えられた。また、転記ミスが疑われる誤答もいくつか認められており、こうした些細なミスを減らせる仕組み作りが必要である。ダブルピークが検出される菌株（EQA20-07）については、全参加施設が、ピーク高の高いピークを当該菌株のリポート数として報告した。一方で、同時に検出される小ピークについては、

記載のない施設が 3 施設あった。このような小ピークに関する情報は、菌株異同の判断の際に有用な情報となることから、リポート数と併せて報告することが望ましく、複数ピークが検出される場合の対応について啓発が必要であることが示唆された。参加した地衛研の中には、MLVA を導入した直後で実施経験の浅い施設もあったと考えられることから、検査結果の信頼性確保のための精度管理は、今後も継続する必要があると考えられた。

MLVA に関する Q&A 作成のために協力地衛研から質問事項を募集したところ、9 施設から 31 項目の質問が寄せられた。ピークの判定基準などの類似した質問事項が複数あり、MLVA 実施時に躓きやすいポイントは、共通していることが明らかになった。本研究で作成した Q&A は、近畿ブロック内にとどまらず、MLVA を実施するすべての施設で活用できると期待される。

E. 結論

遺伝子座 EHC-6 について、二次多項式回帰分析を採用することにより、MLVA の新規解析法のリポート数決定精度が向上した。他施設で作成した bin セットを使用して解析する従来法と比較して、開発した新規解析法は同等以上の精度でリポート数を決定できると考えられた。

MLVA の精度管理については、参加 10 施設中 4 施設が配布した 12 株すべてで正しい解答を報告した一方で、2 株以上を誤答した施設が 3 施設あり、近畿ブロック内の施設間で MLVA 技術レベルに差があることが明

らかになった。継続的な精度管理による技術レベルの底上げが必要であることが示唆された。

MLVA に関する疑問点等を近畿ブロック内の地衛研から募集し、Q&A を作成した。作成した Q&A は、近畿ブロック以外の地衛研においても MLVA の導入・実施に役立つと期待される。

F. 研究発表

1. 誌上発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 参照株のリピート数

菌株番号	O血清群	各遺伝子座のリピート数																
		EH11-11	EH11-14	EH11-8	EH157-12	EH26-7	EH0-1	EH0-2	EH0-5	EH0-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
2020-01	O157	2	-2*	1	4	-2	12	6	-2	-2	9	10	12	5	5	7	15	5
2020-02	O157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	16	9	11	4	5	7	-2	12
2020-03	O157	2	-2	1	6	-2	6	4	-2	-2	13	13	11	6	7	3	5	10
2020-04	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	3	-2	12	12	21	6	8	6	3	8
2020-05	O157	2	-2	1	4	-2	4	5	-2	-2	-2	9	11	3	5	6	6	3
2020-06	O26	2	1	1	2	3	7	28	6	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
2020-07	O111	3	1	14	2	-2	12	10	8	-2	-2	3	9	2	-2	1	-2	-2
2020-08	O111	3	1	10	2	-2	7	3	-2	3	-2	3	10	2	-2	1	-2	6
2020-09	O157	2	-2	1	3	-2	5	6	-2	-2	5	10	-2	4	2	10	-2	6
2020-10	O157	2	-2	1	1	-2	6	7	15	-2	-2	9	5	3	3	6	7	15
2020-11	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	7	12	12	13	7	6	3	6
2020-12	O157	2	-2	1	7	-2	7	4	-2	-2	7	10	12	3	3	5	-2	8
2020-13	O26	2	1	1	2	2	7	23	-2	-2	-2	1	16	2	-2	1	-2	-2
2020-14	O26	2	1	1	2	4	7	16	2	8	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
2020-15	O26	2	1	1	2	3	10	19	6	18	-2	1	9	2	-2	1	-2	10
2020-16	O111	5	1	5	2	-2	13	11	7	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	14
2020-17	O157	2	-2	1	3	-2	7	7	6	-2	4	9	-2	4	3	9	7	7
2020-18	O157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	21	9	10	4	6	7	-2	9
2020-19	O157	2	-2	1	4	-2	5	5	-2	-2	17	10	17	2	17	6	4	7
2020-20	O157	2	-2	1	1	-2	7	6	20	-2	-2	9	12	4	2	6	6	7
2020-21	O157	2	-2	1	5	-2	6	4	13	33	13	12	10	4	6	6	8	8
2020-22	O26	2	1	1	2	5	10	19	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
2020-23	O111	4	1	5	2	-2	22	10	-2	3	-2	3	10	2	-2	1	-2	10
2020-24	O111	4	2	6	2	-2	6	12	-2	3	-2	3	8	2	-2	1	-2	8

*-2: 増幅産物なし

表 2 精度管理株のリピート数

菌株番号	各遺伝子座のリピート数															備考		
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH111-12	EH26-7	EHG-1	EHG-2	EHG-5	EHG-6	0157-3	0157-34	0157-9	0157-25	0157-17	0157-19		0157-36	0157-37
EQA20-01	2	-2*	1	4	-2	5	5	-2	-2	20	10	9	2	11	7	4	7	EHC-5:10と14に ダブルピーク
EQA20-02	2	-2	1	4	-2	7	4	9	-2	11	11	7	5	7	4	12	6	
EQA20-03	2	1	1	2	5	7	12	-2	-2	-2	1	10	2	-2	1	-2	-2	
EQA20-04	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	16	4	8	5	7	
EQA20-05	2	1	1	2	5	7	14	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	
EQA20-06	3	2	5	2	-2	8	10	6	3	-2	3	7	2	-2	1	-2	6	
EQA20-07	2	-2	1	5	-2	5	4	10	-2	12	13	11	5	8	7	5	7	
EQA20-08	2	-2	1	5	-2	6	4	7	-2	10	12	14	5	9	6	6	8	
EQA20-09	2	1	1	2	4	10	20	-2	21	-2	1	8	2	-2	1	-2	12	
EQA20-10	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	12	4	8	5	7	
EQA20-11	2	1	1	2	3	12	13	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	1	
EQA20-12	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	20	10	7	2	13	7	4	7	

*-2：増幅産物なし

表 3 bin セットの評価基準

判定結果	判定基準	記載方法
リピート数の決定	ピークの中心がbinの中に入っている	リピート数を記載
リピート数の推定	ピークの中心がbinの中に入っていないが、 ピークの一部分が近傍のbinに入っている	前後のbinから推定されるリピート数の直後に？を付与して記載
binセットの範囲外	用いたbinセットの最小値より増幅産物サイズが小さい、 もしくはbinセットの最大値より大きい	binセットの最小値の前に＜を付与して記載、 もしくは最大値の前に＞を付与して記載
増幅なし	ピークが見られない	-2と記載
判定不能	上記以外の場合	？と記載

表 4 遺伝子座 EHC-6 の回帰モデルの比較結果

EHC-6の リピート数	試験株数	リピート数を決定できた株数	
		単回帰分析	二次多項式 回帰分析
3	14	14	14
6	2	2	2
7	2	2	2
8	5	5	5
10	1	1	1
11	1	1	1
12	6	6	6
13	3	2	3
14	2	2	2
15	1	1	1
16	1	0	1
17	1	0	1
18	2	0	2
20	2	0	2
21	1	0	1
合計	44	36	44

表5 bin セットを用いて決定したリポート数と標準リポート数^aとの一致率

施設 (n=供試株数)	17遺伝子座すべて一致した株の割合 (%)	遺伝子座ごとのリポート数一致率 (%) (決定できたもの)																
		EH111-11	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
No.1 (n=6)																		
自作binセット	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
感染研binセット	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
No.2 (n=30)																		
自作binセット	83	100	100	100	100	100	90	100	100	97	100	100	100	100	100	100	97	93
感染研binセット	80	100	100	100	100	100	100	100	90	93	100	100	100	100	100	100	97	97
No.3 (n=15)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	0	87	100	0	93	100	0	100	100	40	0	27	100	40	53	100	67
No.4 (n=2)																		
自作binセット	0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	100	100	100	0	100	100	50	50	100	100	50	100	100	100	100	100	100
No.5 (n=17)																		
自作binセット	94	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	94	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	47	100	100	18	100	100	0	100	94	100	94	100	100	100	100	100	100
No.6 (n=33)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	97	100	100	0	100	100	36	100	94	97	100	76	97	100	100	100	100

^a, 感染研で MLVA を実施して決定されたリポート数

表 6 bin セットを用いて決定あるいは推定したリポート数と標準リポート数^aとの一致率

施設 (n=供試株数)	17遺伝子座すべて一致した株の割合 (%)	遺伝子座ごとのリポート数一致率 (%) (推定できたものを含む)																
		EH111-11	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
No.1 (n=6)																		
自作binセット	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
感染研binセット	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
No.2 (n=30)																		
自作binセット	90	100	100	100	100	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	97	93
感染研binセット	93	100	100	100	100	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	97	97
No.3 (n=15)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	80	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
No.4 (n=2)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
No.5 (n=17)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
No.6 (n=33)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	9	100	100	100	9	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	100	100

^a, 感染研で MLVA を実施して決定されたリポート数

表 7 MLVA 精度管理結果

菌株番号	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F	施設G	施設H	施設I	施設J	正答数
EQA20-01	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	9
EQA20-03	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-04	○	○	×	×	○	×	○	×	○	○	6
EQA20-05	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-06	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○	8
EQA20-07	○	○	○	○*	○	○	○	○*	○*	○	10
EQA20-08	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-09	○	○	×	○	×	○	○	○	○	○	8
EQA20-10	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	9
EQA20-11	○	○	×	×	○	○	○	×	○	○	7
EQA20-12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
正答数	12	12	7	9	11	11	12	10	12	11	

○：正答、×：誤答

*ダブルピークに関する記載なし。

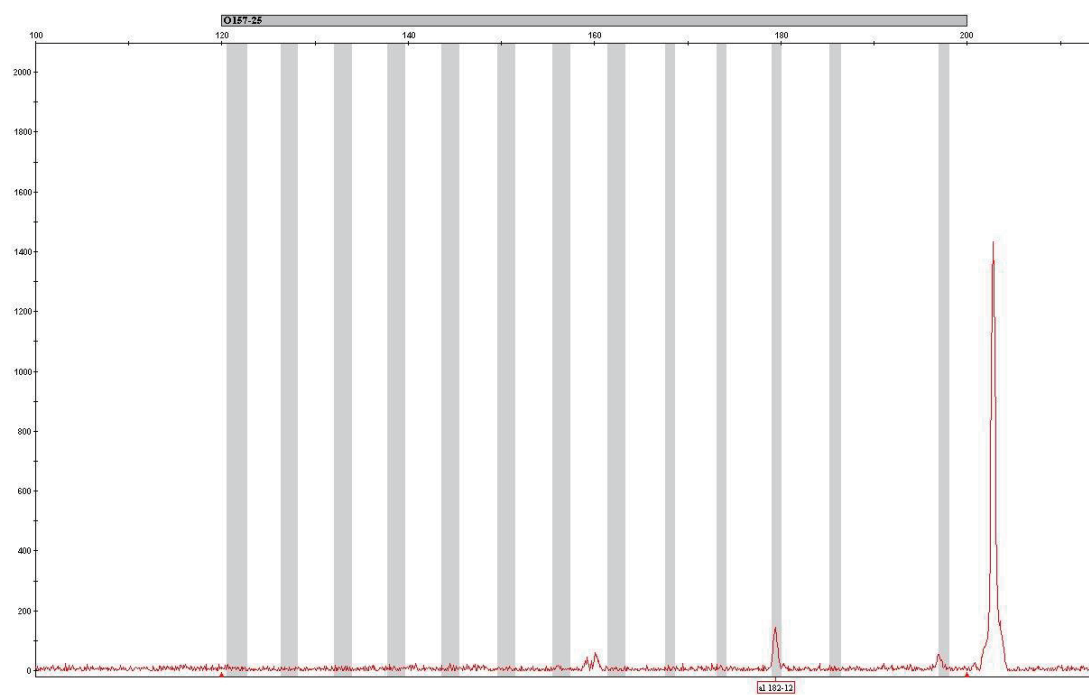


図 1-1 精度管理株 EQA20-04 の GeneMapper の解析結果(遺伝子座 O157-25)。平成 30 年に配布された感染研 bin セットの範囲は、灰色網掛けで表示した。

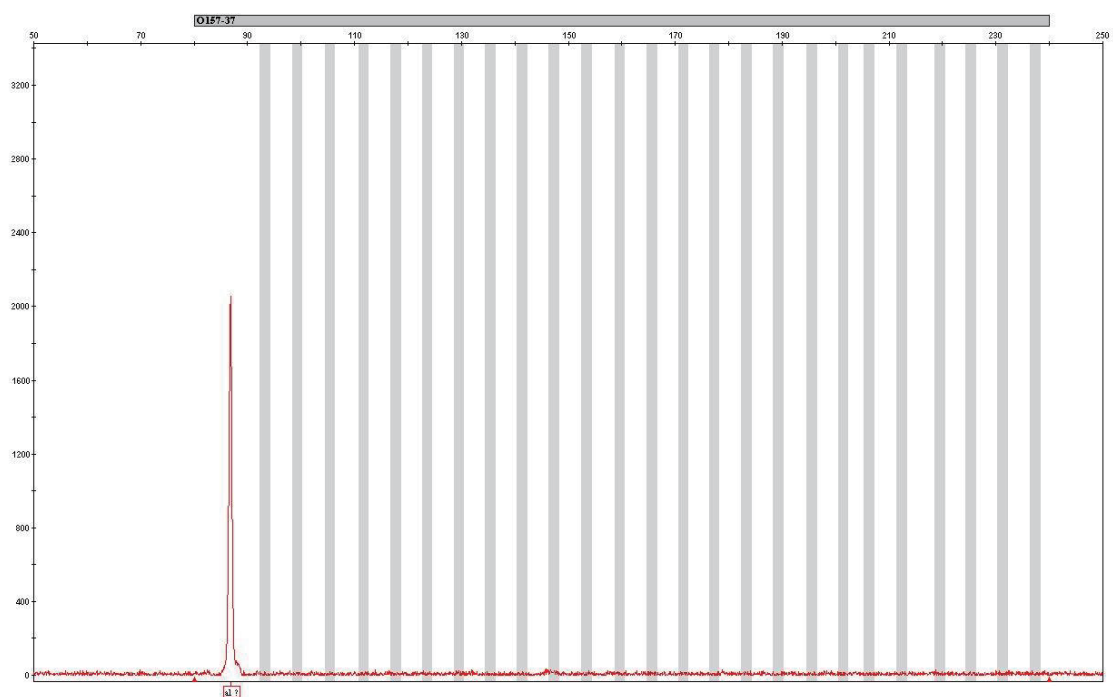


図 1-2 精度管理株 EQA20-11 の GeneMapper の解析結果(遺伝子座 O157-37)。平成 30 年に配布された感染研 bin セットの範囲は、灰色網掛けで表示した。

令和3年2月12日版

MLVA に関する Q&A

厚生労働科学研究

「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」

近畿ブロック研究班作成

MLVA に関する Q&A 目次

	頁
● MLVA 全般に関する Q&A -----	3
● 試薬に関する Q&A -----	3
● GeneMapper の設定に関する Q&A -----	4
● bin の調整に関する Q&A -----	5
● 陽性コントロールに関する Q&A -----	5
● 特徴的なピークに関する Q&A -----	6
● ピークの判定基準に関する Q&A -----	8
● MLVA 結果に関する Q&A -----	11
● その他の Q&A -----	13

<MLVA 全般に関する Q&A>

Q. MLVA の原理はわかりますが、実際には何を測定しているのか、実感としてイメージしづらいです。

A. 各遺伝子座ごとに非蛍光単一プライマーを使って PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動などで、産物の泳動サイズを 1 つ 1 つ確認してください。次に、蛍光プライマーミックスを用いて Multiplex PCR を実施し、キャピラリー電気泳動後のフラグメント解析を実施してください。得られた 2 つのデータを観察し、各遺伝子座についての泳動サイズとピークのサイズを比較することで、MLVA 全体の理解が深まると考えます。また、複数の菌株について、いくつかの遺伝子座の PCR 産物のダイレクトシーケンスを行い、塩基配列からリピート数を算出してフラグメント解析データと比較すれば、より理解が深まるのではないのでしょうか。

<試薬に関する Q&A>

Q. 泳動装置に使用するポリマーは、高温になると劣化が進むと説明書に記載されています。3500 Genetic analyzer を設置している実験室の温度管理には、何か特別な注意を払う必要があるのでしょうか。

A. 高温になるとポリマーが劣化するのはもちろん、室温が大きく変化することで泳動距離が変化するため、特に MLVA のようなフラグメント解析を行う場合は、室温を一定に保つことが望ましいです。Genetic Analyzer を設置する実験室は温度管理を実施することを推奨します。大安研森ノ宮センターの場合、冷房により年間を通して 22℃程度に室温を維持しています。

Q. 泳動時に使用する陰極バッファのセプタは、バッファの交換の都度、変えていますでしょうか（当所では、96 ウェルのセプタはプレートが変わる毎に変えていますが、陰極バッファ用は使い回しています）。

A. 大安研森ノ宮センターでは ABI の Genetic Analyzer 3130 を使用しており、陰極バッファ、96 ウェルのセプタともに、使用後に洗浄して再利用しています。しかし、再利用を繰り返すと、バッファコンテナとセプタの密着が弱くなり、外れやすくなります。シーケンサー作動中にセプタが外れると故障の原因になりますので、セプタが外れやすくなってきたら新品に交換します。あくまでもセプタは消耗品ですので、繰り返し使用した際に生じるリスクをご理解の上、再利用してください。

Q. ポリマーやバッファーなどのシーケンサーの消耗品は開封後の使用期限が短いので、できるだけ試薬が無駄にならないように、検体を溜めて一斉に解析したり、割高ですが 96 ウェル用のポリマーを購入したりしています。検査の運用上で工夫されていることがあれば、ご紹介ください。

A. 大安研森ノ宮センター（Genetic Analyzer 3130）の場合、ポリマーは大容量のものを購入後、チューブに小分け分注して冷蔵保存し、一定期間ごとに少量ずつ交換しています。バッファーは、サードパーティーの販売する非純正のシーケンスバッファーを使用しています。また、フラグメント解析とサンガーシーケンスは、同じポリマーとバッファーを共通で使用しています。

<GeneMapper の設定に関する Q&A>

Q. 当所では、EHEC-MLVA のフラグメント解析の Run Module に、感染研の「Fragment Analysis50_POP7_izu」を使用していますが、デフォルトの「Fragment Analysis50_POP7」と比較すると泳動時間に差がみられます。このことに関して、「Fragment Analysis50_POP7_izu」を使用した方が良い理由、メリットなどはあるでしょうか。

A. 基本的にはどちらの使用でも問題ないと考えます。解析できる塩基長は「Fragment Analysis50_POP7」では約 700 bp、「Fragment Analysis50_POP7_izu」では約 1,100 bp です（大安研森ノ宮センターの Genetic Analyzer 3130 の場合）。遺伝子座 EHC-6 では、600 bp 以上の位置にピークがまれに出現しますが、これまでに大安研森ノ宮センターで確認されたピークサイズの最大値は約 630 bp です。このため、「Fragment Analysis50_POP7」でも解析可能と予想します。

Q. GeneMapper で解析する際に Analysis Method の設定に変更を加えているでしょうか。

A. 大安研森ノ宮センターでは、Peak detector のタブに変更を加えています。デフォルトの設定ではノイズや非特異ピークも allele として検出されることが多いため、サイズマーカーに使用する LIZ（オレンジ）を除く蛍光色素の Peak Amplitude Thresholds の数値をデフォルト値より高く設定しています。Peak Amplitude Thresholds の数値は、本 Q&A の 10 頁に記載の方法で決定した Cut off 値を目安に設定します。その他、Analysis Method の設定を変更することで、検出する allele の数やピークの形状を指定できますので、各施設で使用するシーケンサーの特性に合わせて変更してください。

<bin の調整に関する Q&A>

Q. 解析を繰り返すと、初回に MLVA を実施した時よりもピークが左にずれる傾向がみられます。こういった理由でピークがずれるのでしょうか。

Q. 年度初めと年度末では、参照株のピークの位置が bin と少しずつずれてきます。また、試験株のピークも bin から外れ、「allele:？」と表示されることが徐々に増える気がします。原因と対処法を教えてください。

A. フラグメント解析の泳動距離は、キャピラリーやポリマーを交換した際に変化することがあります。また、泳動距離は温度によって変化するため、季節の変化によってピーク位置がずれるケースもあります。ピーク位置のずれによってピークが bin に入らなくなった際は、bin の位置を調整してください。

Q. bin の調整は、こういったタイミングで行うのでしょうか。また、調整する場合は全領域を調整するのでしょうか。それとも、該当する領域のみ調整するのでしょうか。

A. bin 調整のタイミングに明確な基準はありません。1 つの目安として、毎回の測定時に、リピート数既知の菌株 DNA を陽性コントロールとして同時に測定し、その陽性コントロールが bin に入らなくなった時に調整することがタイミングの候補に挙げられます。調整する場合は、bin に入らなくなった遺伝子座のすべてを一律に調整することが望ましいと考えます。

<陽性コントロールに関する Q&A>

Q. 増幅がない領域について、それが希釈過剰や反応効率の悪さ、機器の親和性や試薬の劣化などによるものではないことを担保するための検査系やコントロールの設定について、良い方法があれば教えてください。

A. 大安研森ノ宮センターでは、毎回の測定時にリピート数既知の菌株 DNA を陽性コントロールとして同時に測定し、そのリピート数を正しく決定できることをもって検査系の精度を担保しています。

Q. O 血清群によってピークが出現しない遺伝子座があります。血清群によって陽性コントロールの種類を変える必要があるでしょうか（例えば、O157 用、O26 用など）。

A. 17 遺伝子座すべてについて増幅する陽性コントロールを毎回測定することが理想と考えます。このような陽性コントロールは、最低 2 種類の DNA を用いることで準備できま

す。しかし、4 本キャピラリーのシーケンサーを使用している大安研森ノ宮センターの場合、陽性コントロールだけで 1 run 分（2 種類の DNA×2 種類の PCR Mix = 4 反応）を使用することは効率が悪いと、通常はどの血清群の場合でも、EH111-14 および EH26-7 以外の 15 遺伝子座の増幅が得られる O157 株 DNA のみを陽性コントロールとして使用しています。EH111-14 あるいは EH26-7 の結果に疑義があるなど、反応系に問題がないことを確認する場合には、これらの 2 遺伝子座が増幅する別の DNA を陽性コントロールに使用します。

Q. 陽性コントロールのピークが bin からずれた場合、その時の測定のみ bin をずらすのか、それとも「change」で既知のピークに合わせるのか、または測定し直すのか、どのような対応がよいのでしょうか。

A. 陽性コントロールの意義を考えると、その測定は不成立とみなし、再測定が必要です。それでも陽性コントロールが bin の範囲から外れてしまう場合は、bin を調整し、陽性コントロールが正しく決定できる条件に再設定した後に、実際のサンプルを測定すべきと考えます。

<特徴的なピークに関する Q&A>

Q. それぞれの血清型で必ずピークが出現する遺伝子座と出現しない遺伝子座を一覧にしてみられないでしょうか。

Q. ダブルピークの出やすい遺伝子座や出にくい遺伝子座は存在するのでしょうか。

A. 大安研森ノ宮センターの解析データをまとめました。O 血清群による解析数に差がありますので、あくまでも参考データとして活用してください。ダブルピークは、特に EHC-5 で出現する傾向がありますが、株数が少ないため、こちらも参考程度に考えてください。

表 1 大安研森ノ宮センターにおける各遺伝子座のピーク出現割合

O血清群	株数	各遺伝子座において増幅が見られる株の割合（％）							
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5
O157	190	100	0	100	100	0	100	100	31
O26	46	100	98	100	100	98	100	100	20
O111	24	100	100	100	100	0	100	100	21

O血清群		各遺伝子座において増幅が見られる株の割合（％）							
		EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36
O157	8	86	100	95	100	100	100	99	100
O26	28	0	100	100	100	0	100	0	9
O111	92	0	100	100	100	0	100	0	88

表 2 大安研森ノ宮センターにおけるダブルピークの出現率と遺伝子座の割合

遺伝子座名	ダブルピークが 検出される株数	解析株総数（260 株）に占めるダブル ピーク出現株の割合
EHC-5	14	5.4%
EHC-6	1	0.4%
O157-3	1	0.4%
O157-9	4	1.5%
O157-25	1	0.4%
O157-37	4	1.5%

Q. 真のピークとノイズを見分けるに当たって、遺伝子座毎に典型的なピークの特徴（形、スタッターピークが出やすい、など）や注意点などがあれば、例示していただけないでしょうか。

A. 遺伝子座 EH111-8 や O157-34 は PCR 増幅効率が悪く、検出される蛍光強度が低い場合が多いです。遺伝子座 EHC-1 や EHC-5、O157-17 は付加されるアデノシンの数の違いによる split peak が明瞭に検出されやすく、1 塩基違いのピークが 2～3 個連なったような形状になる傾向があります。スタッターピークに関しては、繰り返し数が非常に大きな一部の菌株で観察される以外、明瞭なピークとして観察されることは、経験上ほとんどありません。

Q. False peak について以下のような経験があれば、その対処法を教えてください

- (1) O26 株の遺伝子座 O157-37 において、ややブロードな false peak が見られました。
- (2) キャピラリー交換からしばらくの間、すべての蛍光色素 (VIC、PET、NED、6-FAM、LIZ) において、同じサイズに false peak が見られました。

A. (1) ブロードな false peak は血清群 O26 に特有の現象ではなく、アーティファクトによるものと考えますが、同様の経験がないので対処法はわかりません。しかしながら、DNA テンプレートの希釈や DNA 抽出法の変更により改善する可能性がありますので、ご検討ください。

(2) このようなピークは一般に、気泡やポリマーの結晶、細胞残渣（デブリ）などの異物がキャピラリーに入った場合に観測されます。異物がキャピラリーを通過すると機械が蛍光と認識し、すべての蛍光色素において同じサイズの false peak が出現します。キャピラリー交換の際に、異物混入の原因となる何かが起こったと想像されます。

<ピークの判定基準に関する Q&A>

Q. 高さの低いピークについて、ノイズや非特異ピークとの判別に苦慮するケースがあります。判別のポイントや追加の確認検査などがあれば、教えてください。

Q bin にかかるところに比較的小さなピークが出現した場合、判定に悩むことがあります。例えば、ピークの蛍光強度が 200~300 程度で、それが bin に収まってリポート数が表示されている場合などです。プライマダイマーに由来するピークが数十 bp 程度の位置に明瞭に出現していれば、その遺伝子座では PCR 増幅が行われなかったと考えて、蛍光強度の低いピークはノイズと判断しています。しかし、ノイズかどうか判断しにくい遺伝子座のグループ（蛍光色）があります。EH111-8 が含まれるグループでは、プライマダイマーに由来するピークが明瞭に観察できるため、それ以外に小さなピークが出現してもノイズだとわかりますが、O157-36 の含まれるグループでは未反応のプライマに由来するピークがわかりにくくてノイズとして拾うことがあります。希釈倍率を変えて再泳動、場合によっては PCR をやり直して再判定することになるのでしょうか。ケースバイケースかもしれませんが、ノイズの判定方法を教えてください（段階的に希釈して、希釈倍率に応じてピークの高さが変われば真のピークとみなし、そうでなければノイズと判定するのでしょうか。もしくは、経験に裏付けされた感覚的な判定をするのでしょうか）。

A. 検出されるピークには、①蛍光の漏れ込み、②ノイズ、③真のピークの 3 通りが考えられます。順に確認を行い、①と②が否定された場合、③の可能性が高いと判断します。大安研森ノ宮センターでは、以下の手順で①~③を区別しています。

①は、PCR 産物の希釈が不十分な場合など、蛍光強度の高いピークが波長の近い蛍光検出器へ漏れ込むことで生じます。この場合、各蛍光色素（6-FAM、VIC、NED、PET、LIZ）の波長と検出器の性質、他の PCR 産物のピーク強度などから、漏れ込みと推定できるケースが多いです（図 1）。

・例 1：遺伝子座 EHC-1 や EHC-2 の蛍光(VIC[Emission wavelength(E): 554nm]) が、6-FAM[E: 520nm]の検出器に漏れ込み、遺伝子座 O157-34 にピークとして検出される

・例 2：遺伝子座 O157-37 の蛍光(PET[E: 595nm])が、NED[E: 575nm]の検出器に漏れ込み、遺伝子座 O157-36 にピークとして検出される。

このように、検出される小ピークに近い蛍光波長を有するピークと比較することにより、ほとんどの小ピークは蛍光の漏れ込みと判断できると考えます。

②については、Height 値の低いピークが、設定した bin セットと関連性の低い位置に点する場合、あるいは、測定ごとにピーク的位置が移動する場合などに、ノイズの可能性があると判断します。必要に応じて、希釈率を段階的に下げて再泳動し、ピーク的位置が変化するかどうか、あるいは、希釈率に応じてピークの Height 値が変動するかどうか

かを基準に、ノイズと真のピークのどちらであるかを判別します。ノイズが頻繁に検出されて判定の妨げとなる場合は、PCR 産物の希釈倍率を上げる、cut off 値を変更する、PCR 条件の再検討を行うなど、MLVA 実施条件を見直すことを推奨します。

①蛍光の漏れ込みと②ノイズが否定でき、明瞭なピーク(プライマーダイマーによるものを除く)が検出されれば、③真のピークと判定します。確認が必要な場合は、当該遺伝子座の単一プライマーセットを用いて PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物のバンドが明確に認められれば、③真のピークであると判断する材料の 1 つになります。

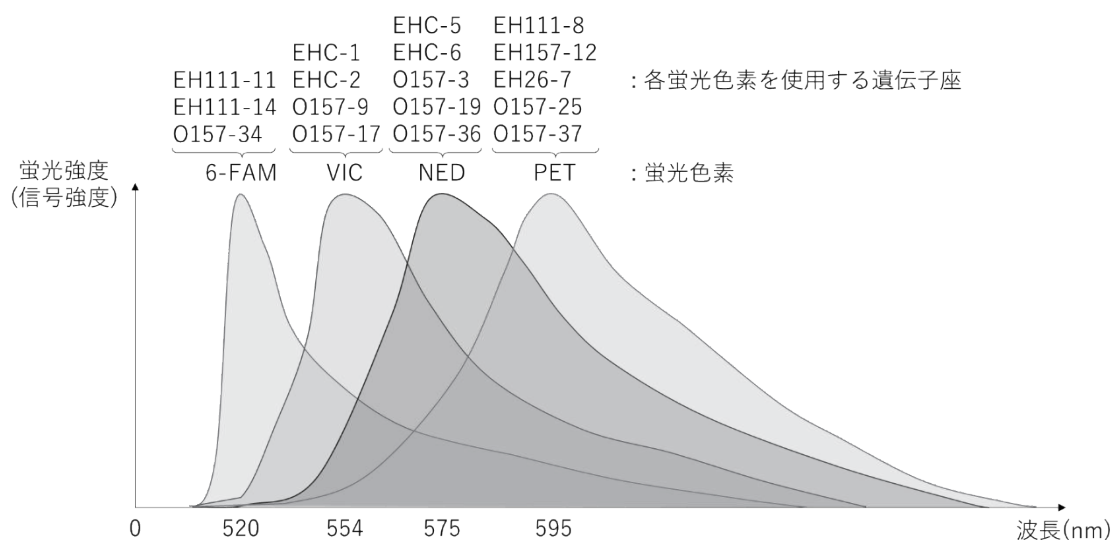


図 1：各蛍光プライマーに使用する蛍光波長の分布と、検出される蛍光強度のイメージ

-
- Q. 当所では現在、2018 年に感染研から配布いただいたパネルと bin セットを使用しています。通常の検査で特に困ることはないのですが、精度管理株の中にはパネルで指定された領域外にピークが出現して解析できないものがありました。今後、このような菌株が分離される可能性もあると思います。その際は、検出されたピークが本物かどうか実際に塩基配列を読むことにより判定し、パネルや bin セットの修正を行うという考え方でよいでしょうか。
- Q. bin の設定範囲以外にピークが認められた場合は、どのように判断したらよいでしょうか。
- Q. bin が設定されていない位置に未知のピークが出現した場合は、どのように判定すればよいでしょうか。

A. はじめに、当該ピークが蛍光の漏れ込みやノイズ、プライマーダイマーでないことを確認してください。真のピークであることが確認できれば、以下の①、②いずれかの方法でリピート数を決定してください。

①当該遺伝子座について、非蛍光の単一プライマーセットを用いて PCR を実施し、サンガーシーケンス法で増幅産物の塩基配列を解読してリピート数を算出します。

②近接する既存の bin から比例計算で推定します。近接する既存の bin の位置(サイズ)と検出されたピークサイズの差を、各遺伝子座の繰り返し単位の塩基長で除算し、その差分からリピート数を推定します。

上記の2つの方法で決定できなかった場合や、算出されたリピート数が小数になった場合などは、感染研に相談してください。

bin セットの範囲外に検出されたピークのリピート数を決定した際は、パネルおよび bin セットの修正を行ってください。上記のいずれの方法で決定しても問題はありませんが、決定したリピート数の確度に不安がある場合は、泳動データや菌株を感染研に送付して確認を依頼することを強く推奨します。

Q. ピークが2つ以上認められた場合は、どのように判断すればよいでしょうか。

Q. 1つのローカスに複数のピークが検出された場合は、どれを判定に用いればいいのでしょうか。

A. Height 値が最も高いピークを、その遺伝子座のリピート数としてください。その際、Height 値の低いピークも合わせて報告してください。1 遺伝子座においてしばしば2つ以上のピークが認められることがあり、近縁株では、主要ピーク以外のピークのリピート数まで一致する場合があります。また、測定するタイミングによって各ピークの Height 値の高低が逆転することもあります。Height 値の低いピークを記録に残すことで、Height 値の逆転が起こった際に菌株異同の判断に活用できます。このような情報は菌株間の関連性を調べる上で有用な手がかりとなるため、大安研森ノ宮センターでは、主要ピーク以外のピークリピート数を、備考欄に記録しています。

Q. 微妙なピークはどのくらいの Height 値まで採用すればよいでしょうか。

Q. ピークの Cut off 値の設定方法を教えてください。

A. シーケンサーの種類や希釈条件など、MLVA の実施環境によって蛍光強度が異なるため、ピークの Height 値の基準 (Cut off 値) を一律に示すことはできません。また、ピークの高さについては、同じ施設、同じ実施環境であっても、テンプレート DNA の状態や PCR の増幅効率、希釈の際の手技のばらつきなどによって、実施の都度に変化する場合もあります。一方、実施条件を変えない限り、ノイズの高さは測定ごとに大きく変化し

ません。このことを利用して、各施設でのノイズの高さから Cut off 値の目安を決定することができます。リピート数既知の菌株を何株か泳動し、「増幅産物なし」ということが明らかな遺伝子座について、観測されるノイズや非特異ピークの蛍光強度を元に Cut off 値の目安を決定してください。

Q. 特定の遺伝子座（EH111-8 など）の蛍光ピーク（真のピーク）が弱く、リピート数を決定できないことがあります。よい対処法はないでしょうか。

A. 検出される蛍光強度を上げるため、PCR 産物の希釈率を下げて再度キャピラリー電気泳動を実施してください。複数の株で同様の現象が継続的に認められる場合は、希釈倍率を検討するか、プライマーミックスを新たに調製する必要があります。なお、増幅効率の悪い遺伝子座については、プライマー配列や PCR 条件の改良が今後の検討課題と考えています。

Q. ピークが 2 つの連続した山のような形になり、bin には片方のピークのみ含まれることがあります。allele が表示されることもありますが、「allele : ?」と表示される場合があります。この理由と対処法を教えてください。

A. 塩基長が約 1 bp 異なる連続した 2 つ、もしくは 2 つ以上のピークは、PCR 増幅時に付加されるアデノシンの数が異なることで生じると考えられています。いずれかのピークが bin に含まれていれば、その bin の allele number をリピート数として問題ありません。

<MLVA 結果に関する Q&A>

Q. MLVA の結果を検査成績書に記載する場合、どのように記載すればよいでしょうか。

A. ①MLVA 型のみ、②リピート数のみ、③MLVA 型とリピート数の両方、いずれの記載でも問題ないと考えます。ただし、①MLVA 型の場合、菌株間の遺伝的距離（異なる遺伝子座の数）がわからなくなるため、これを補足するための情報を追加することが望ましいと考えます。例えば、2 つの菌株の MLVA 結果を 20m0001 と 20m0002 と報告する場合、これだけではこの 2 菌株が「何遺伝子座違い」なのかがわからず、近縁な株かどうかの判断ができません。大安研森ノ宮センターでは、成績書には MLVA 型名のみを記載し、補足資料として、MLVA 型間の遺伝的距離がわかるように Minimum Spanning Tree を併せて添付しています。

Q. 感染研から返却される MLVA 解析結果は、中心となる MLVA 型以外が線で結ばれていることがしばしばあります（下図例）。この Minimum Spanning Tree の解釈について教えてください。

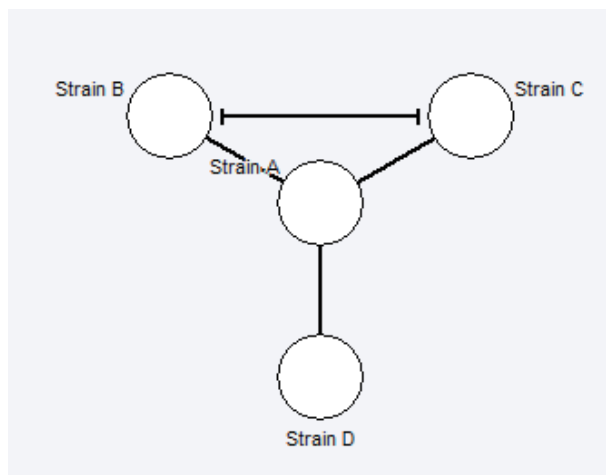


図 2. 中心となる MLVA 型以外が線で結ばれている Minimum Spanning Tree の例

A. この図において、菌株 A を基準とすると、菌株 B、C、D は菌株 A に対してそれぞれ 1 遺伝子座異なる菌株です。加えて、菌株 B と菌株 C も互いに 1 遺伝子座違いです。菌株 A、B、C の変異箇所が同じ遺伝子座の場合、このような図になります。参考に、図 2 の作成に使用した菌株のリピート数を下表に示します。

表 3. 図 2 の Minimum Spanning Tree 作成に用いた菌株のリピート数

菌株 番号	EH111- 11	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
A	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	16	4	8	5	7
B	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	12	4	8	5	7
C	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	13	4	8	5	7
D	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	16	4	8	5	6

Q. MLVA の結果をもって食中毒事件と断定する場合、リピート数の不一致はいくつまで許容されますか。

A. 感染源が同一と考えられる事例の調査において、2 遺伝子座異なる菌株が検出されたケースがいくつか報告されています。このため、同一事例であっても 2 遺伝子座程度の変異は起こりうると考えられています。

しかし、この逆は必ずしも成立しません。すなわち、「2 遺伝子座以内の変異であれば、すべて同一事例である」ということは成立しません。そのため、MLVA の結果を解釈す

る際には、絶対的な基準としてリピート数の不一致数を定めることはせず、疫学情報と MLVA の結果を照らし合わせて妥当性を評価することが必要です。

例えば、疫学情報から共通の感染源の存在を疑われた複数患者から 2 遺伝子座違いの菌株が検出された場合、上述の通り、「もともと同じクローンの菌株に変異が生じた」と考えて、食中毒事例と断定することは妥当と考えます。一方、患者から分離された菌株の MLVA 型が完全一致した場合でも、同じ MLVA 型の菌株に別々の要因で感染した可能性が否定できないので、疫学情報と菌株情報を総合的に判断し、最も妥当な結論を見いだすことが基本となります。

また、いくつかの遺伝子座はプラスミド上に存在していると考えられています。この場合、複数の遺伝子座のリピート数が一度に変化する可能性があるため、どの遺伝子座に変異が見られるかを考慮することも必要になります。

<その他の Q&A>

Q. MLVA の結果が特に活用できた事例について、紹介できるものがあれば教えてください。

A. セントラルキッチンを持つ同一系列の複数の飲食店で発生した EHEC O157 の食中毒事例において、MLVA が有効に活用されました。それぞれの店舗で発生した患者は数人でしたが、セントラルキッチンを介して同じ O157 株に感染する機会（可能性）があったこと、患者から同一 MLVA 型の菌株が分離されたことから、食中毒と断定することができました。

Q. 今後、IS-printing のように、近畿ブロックの分離菌株の MLVA type のデータベース的なもの（アリアルプロファイルも閲覧可能な）を構築する予定はありますか。

A. Diffuse outbreak の早期探知のため、IS-printing のような MLVA データベースの構築が必要と考えています。一方で、データベースの有効活用には、協力地衛研担当者の全面的な協力が不可欠です。今後、アンケートなどを通じて、MLVA データベース構築の必要性について担当者と意見交換を行いながら、検討を進めたいと考えています。

<Q&A 作成協力施設一覧（50 音順）>

尼崎市立衛生研究所

大阪健康安全基盤研究所

京都市衛生環境研究所

京都府保健環境研究所

神戸市環境保健研究所

滋賀県衛生科学センター

姫路市環境衛生研究所

兵庫県立健康生活科学研究所

和歌山市衛生研究所

<謝辞>

本 Q&A は厚生労働科学研究費「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（H30-新興行政-一般-001）」の支援を受けて作成されました。

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２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
	林 宏樹	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
	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
	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	氏家 絢子	〃
	矢儀田 優佳	〃
	影山 温子	高知県衛生環境研究所
	尾崎 早矢香	〃
	河合 央博	岡山県環境保健センター
	岡田 達郎	〃
	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・解析を行うことが感染源特定や拡大防止のために有用である。そのためには、地方衛生研究所（地衛研）における病原体分離株の分子疫学解析手法の解析精度・解析能力の向上による精度管理体制の維持・強化が不可欠である。そこで、中四国ブロック内の地衛研を対象に、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、一部の地衛研を除いて、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改善や工夫、検査結果の適正な点検が必要と思われた。また、MLVA 法については、近年、MLVA 法を導入する地衛研が増加しており、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は、MLVA 法で解析を行う地衛研に対して、本研究成果に基づく継続的な技術的支援が、必要であると考えられた。

令和２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。その結果、同一の MLVA 型の EHEC 菌株による感染事例が中四国ブロックを含む全国の複数の自治体で確認されたが、中四国ブロック内では同一汚染源による腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかった。

本研究によって EHEC 分子疫学解析手法である IS-printing System、PFGE 法、MLVA 法による中四国ブロックの地衛研のサーベイランス技術水準の向上に貢献したものと考える。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域的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。令和元年度に引き続き令和2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：ヒト患者等由来 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 情報と令和2年4月から令和3年1月までに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。

2. 分子疫学解析法及び精度管理

(1) IS-PS

IS-PS (Version2:TOY0B0 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。菌株 3 の領域 EHC-5 はリピート数 8 と 9 のダブルピークが出現し、リピート数 8 でピークがより高い株を使用した。

(4) 精度管理

令和2年度は 9 施設 ((A) ~ (K), (A) 及び(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 8 施設 ((B) ~ (K), (D) 及び(F)を除く)、PFGE 法は 8 施設 ((C) ~ (K), (D)を除く)、MLVA 法は 9 施設 ((B) ~ (K), (D)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、8 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。いずれの施設も適正にバンドが認識できており、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 (I) では菌株 4 で 1st Primer set の 1-13、1-14、1-15 の集計にミスがあり、IS コードの

判定に違いが見られた。

(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。ほとんどの施設でおおむね良好な泳動像が得られた。

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 72% であった。菌株 1 と 2 の類似度は、全施設が類似度 100% で一致していた。菌株 3 と 4 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 J では各菌株の遺伝子座 0157-3 及び 0157-36 で他施設とは 1 リピートずつ異なる結果となった。菌株 3 では解析領域 EHC-5 はリピート数 8 と 9 のダブルピークが出現する株を使用した、どの施設も正確にダブルピークを検出していた。

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、表 8、表 9、図 3 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。しかし、同一の MLVA 型及び同一の MLVAcomplex の株が、中四国ブロック内及び他の複数の自治体で検出される事例も多く見られた。また、中四国ブロック内のある自治体では EHEC 届出数が令和 2 年 12 月末時点で 100 を超えていた。これは、令和 2 年 8 月から 10 月にかけて当該自治体で 22 名の 0157VT1,2 の MLVA 遺伝子型 20m0245 (20c038) を原因とする腸管出血性大腸菌感染症の多発が要因として考え

られたが、感染源は不明であった。さらに、症例多発時と同時期に、中四国以外の 3 自治体計 3 名に同じ遺伝子型菌による事例が見られた。中四国ブロックでは同一 IS コードだが MLVA 型が違う事例、同一 MLVA 型だが IS コードが違う事例も見られた。

D. 考 察

令和 2 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、技術の改善及び工夫が必要と思われた。中四国ブロック全体では、地衛研内での人事異動もあり、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 (I) では菌株 4 で 1st Primer set の 1-13、1-14、1-15 の集計の単純ミスによって、IS コードの判定に違いが見られたものと考えられた。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、操作手技等の技術の習熟が進展しているものと考えられた。MLVA 法について、施設 J では各菌株の遺伝子座 0157-3 及び 0157-36 で他施設とは異なる結果となった。この原因について検討した結果、フラグメント解析の最適化のため通常のプライマーに数塩基を付加した Tailed Primer を使用しており、増幅産物がわずかに大きくなり、Tailed Primer を使用したという認識が不足していたことが原因ではないかと考えられた。菌株 3 の解析領域 EHC-5 はリピート数 8 と 9 のダブルピークが出現することを事前に確認していたが、どの施設も正確にダブルピークを検出していた。正確な検査のために、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重要であると考えられた。全国的な MLVA 法の導入に係る通知に基づいて、各地衛研でも導入が更に進んでいるが、MLVA 法の導入に関しては十分な研修、準備が必要であり、今後の導入時や

担当者の異動時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 EHEC による感染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多く見られた。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かった。

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。同じ MLVA 型菌が検出されたものの、その疫学的関連性の不明な事例も多くみられた。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、MLVA 法等による病原体の解析のみでは、同一感染源による集団事例であるとの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。PFGE 法では、参加したほとんどの施設では概ね良好な結果が得られたが、IS-PS 及び MLVA 法では一部の施設で結果が異なった。
2. IS-PS では、IS コードは多くの施設が一致したが、1 施設で集計の単純ミスによって、IS コードの判定に違いが見られたものと考えられた。
3. MLVA 法は、複数の遺伝子座で結果が他施設と異なる施設があり、この施設では、Tailed Primer を使用しており、遺伝子増幅産物が通常のプライマー使用時よりわずかに大きくなり、Tailed Primer を使用していたという認識不足が、その要因

と考えられた。MLVA 法導入に関して十分な研修、準備、技術的支援や導入後の精度管理の必要性が認められた。

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

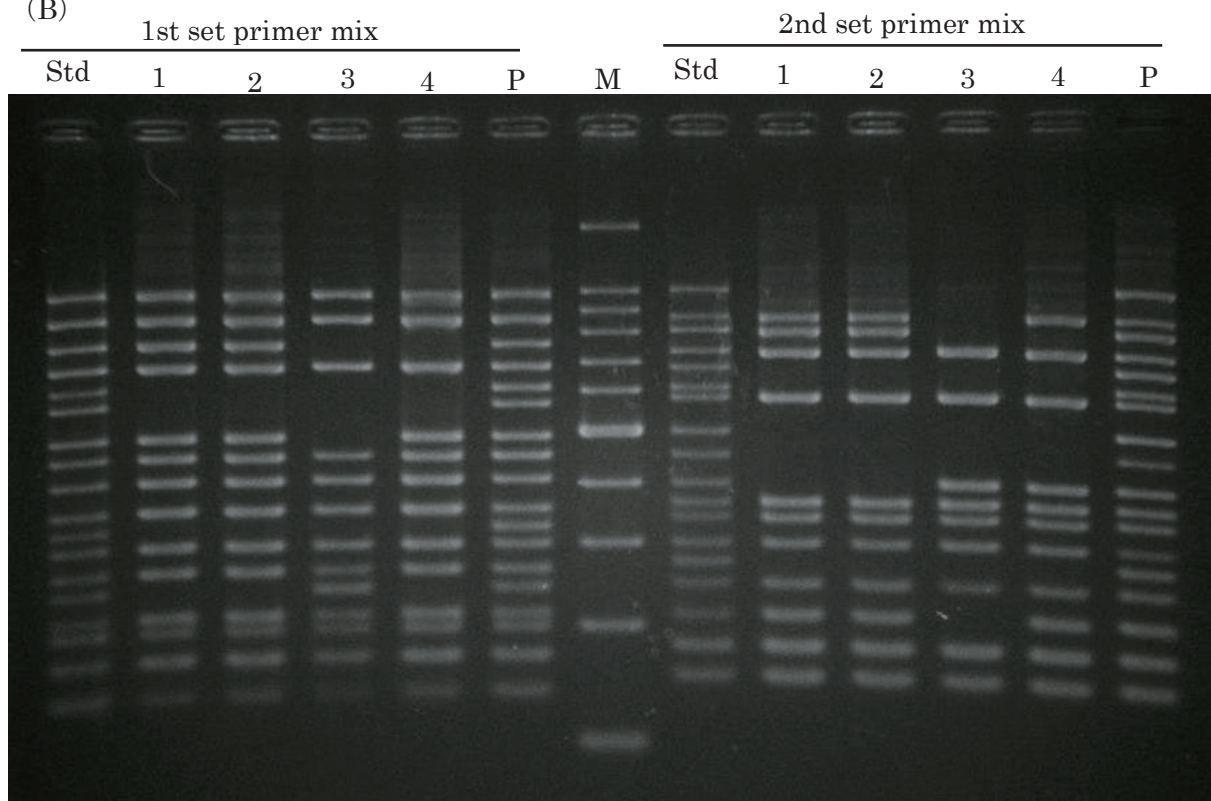
菌株 No.	血 清 型			由来
	O群	H型	STx型	
1	O157	7	1,2	2019 健康保菌者
2	O157	7	1,2	2019 患者
3	O157	7	1,2	2019 患者
4	O157	7	1,2	2020 患者

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	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
C	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
D	—	—	—	—	—	—	—	—
E	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
F	—	—	—	—	—	—	—	—
G	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
H	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
I	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317577	211757
J	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
K	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757

図 1 IS-PS 泳動像

(B)

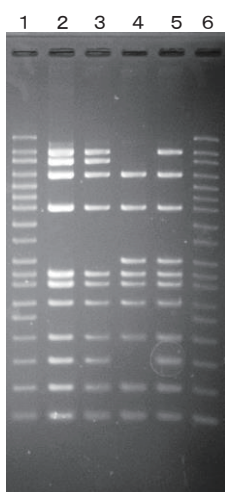
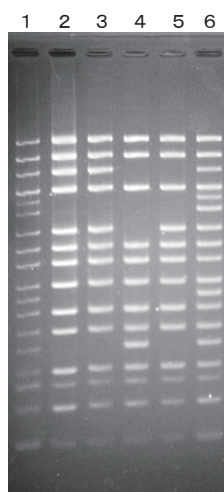


Std:Standard DNA, **P:**Template Mix, **M:**DNA marker
1:STEC 1, **2:**STEC 2, **3:**STEC 3, **4:**STEC 4

(C)

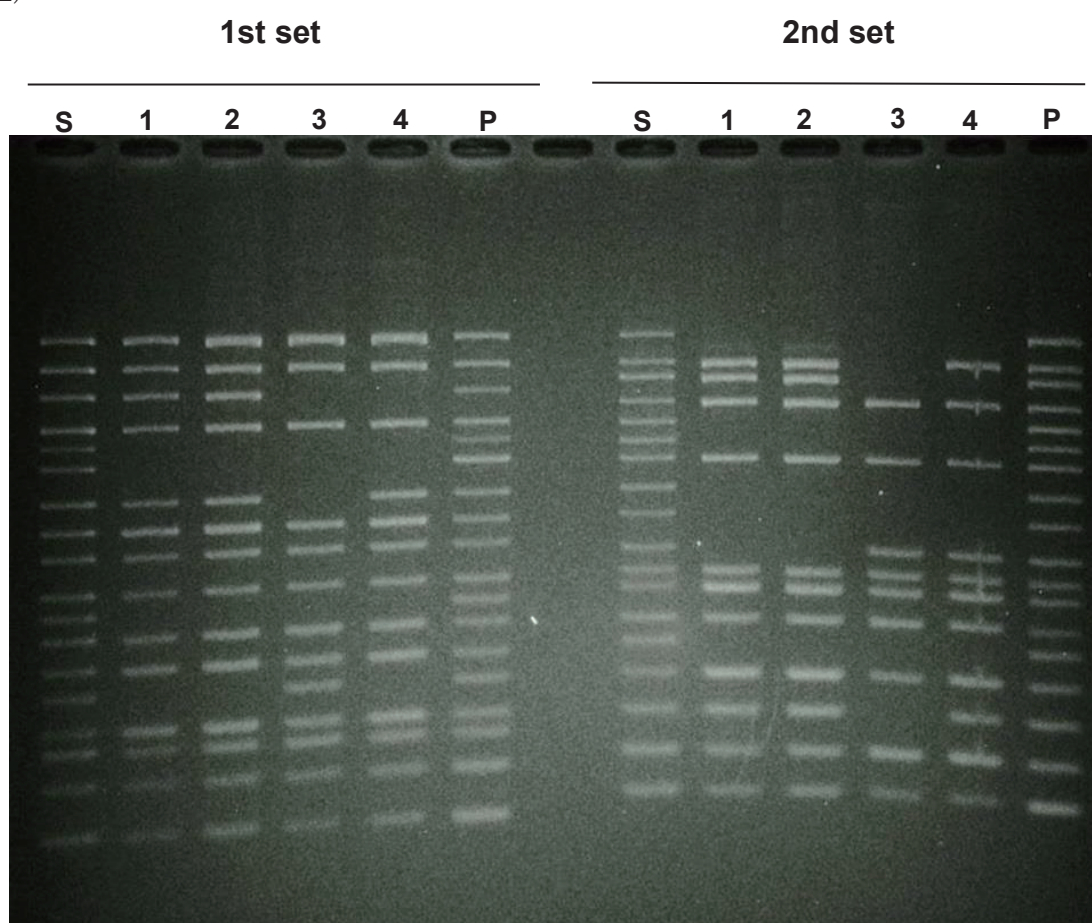
1st Primer Set

2nd Primer Set



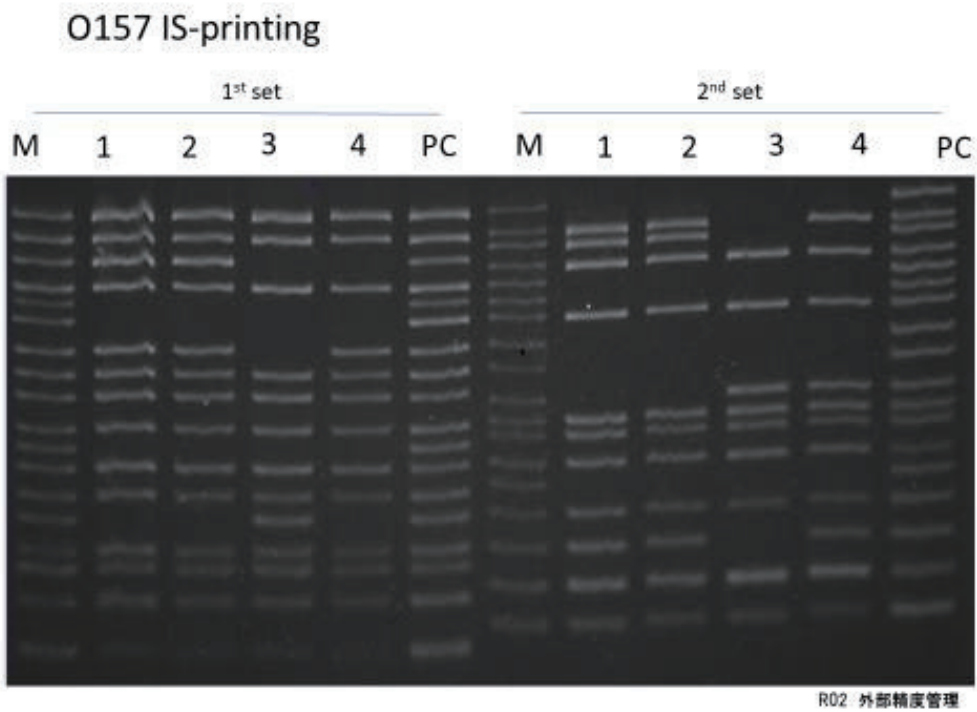
レーン
 1 Standard
 2 STEC1
 3 STEC2
 4 STEC3
 5 STEC4
 6 P.C.

(E)

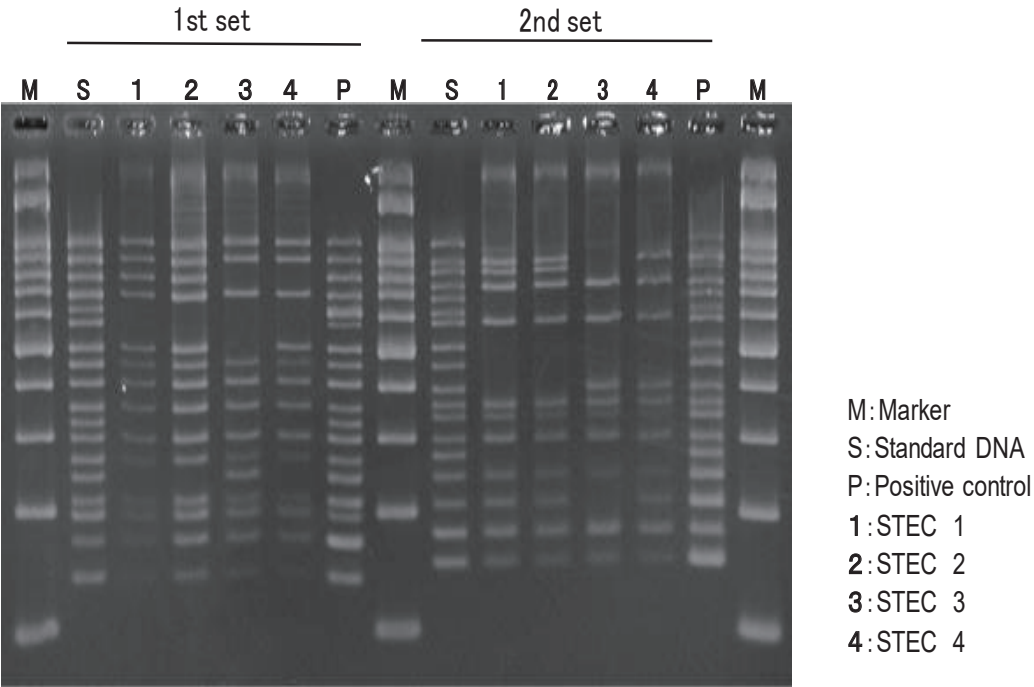


S : Standard DNA
1 : STEC1
2 : STEC2
3 : STEC3
4 : STEC4
P : PCR Template Mix

(G)

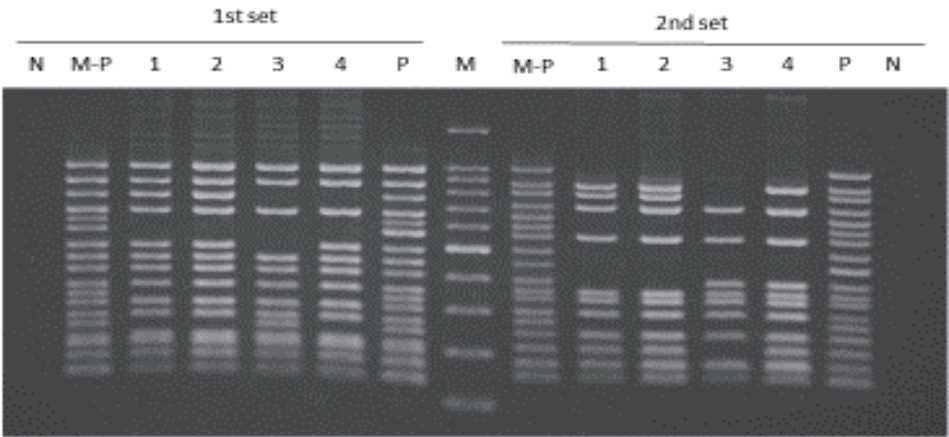


(I)



(J)

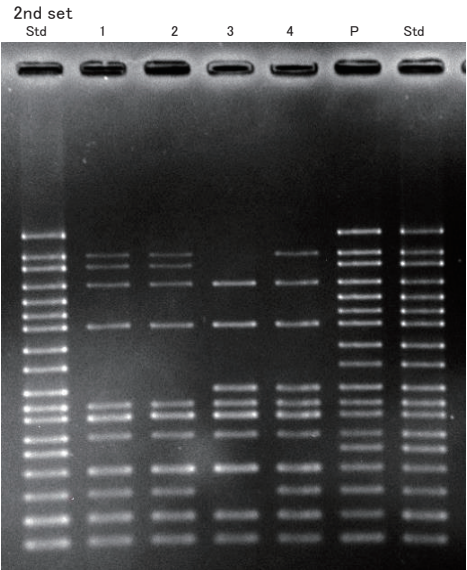
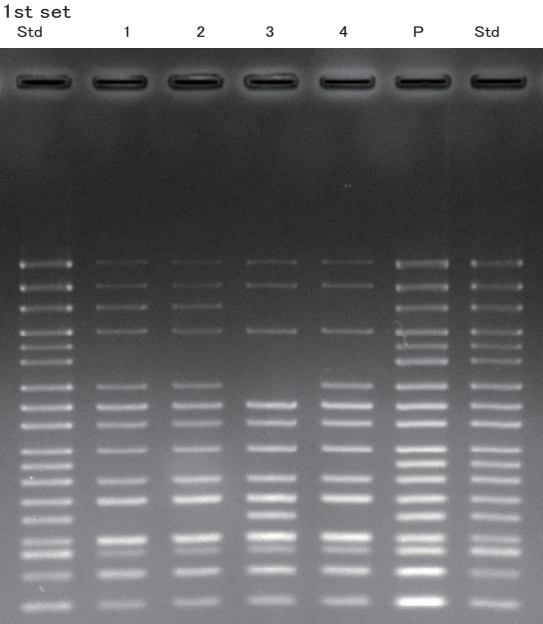
IS-printing泳動写真



1 : STEC1
2 : STEC2
3 : STEC3
4 : STEC4

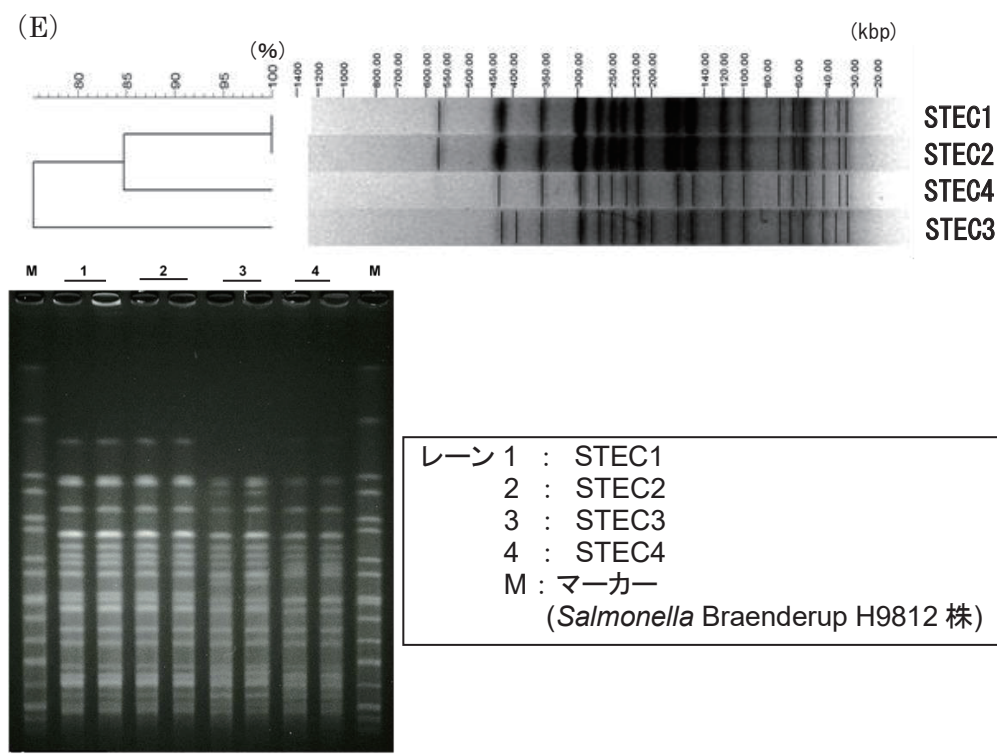
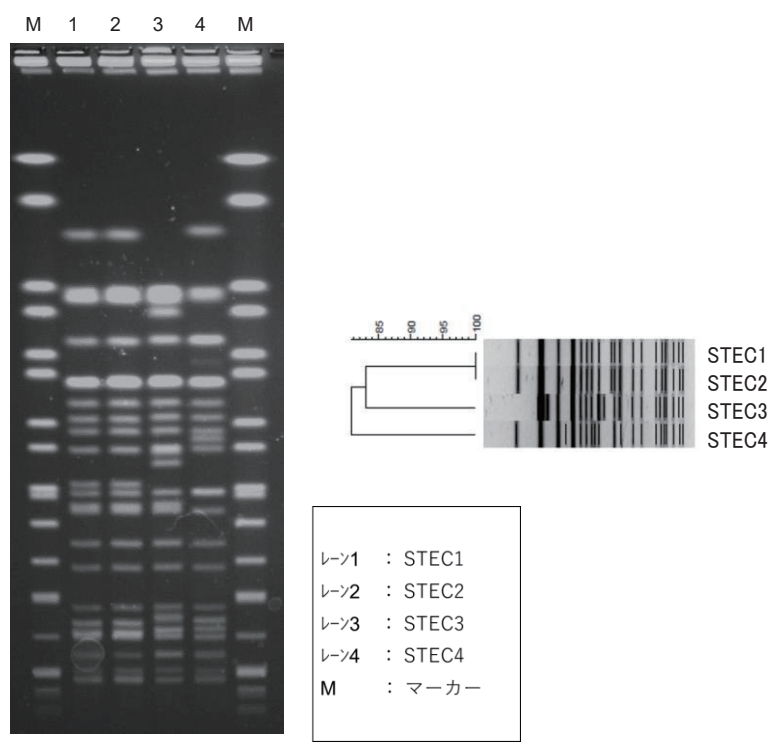
P: positive control
N: negative control (DW)
M-P : 1st/2nd marker
M: 100bp ladder marker

(K)

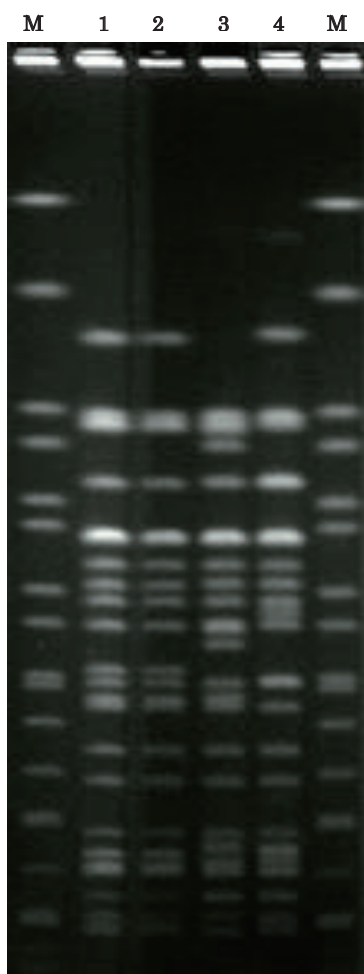


Std :Standard DNA
1 :STEC1
2 :STEC2
3 :STEC3
4 :STEC4
P :Positive control

図 2 PFGE 法による泳動像とデンドログラム解析結果
(C)



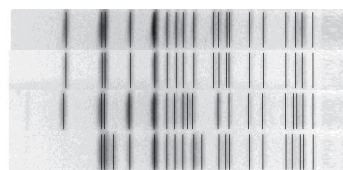
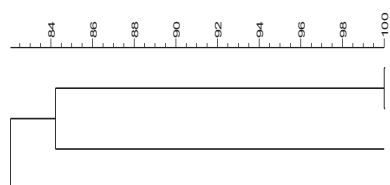
(F)



1 : STEC1
2 : STEC2
3 : STEC3
4 : STEC4
M : Marker

PFGE-XbaI

PFGE-XbaI

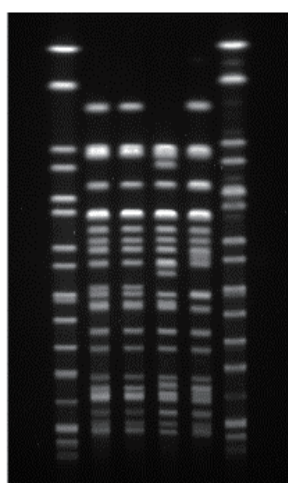


STEC1
STEC2
STEC4
STEC3

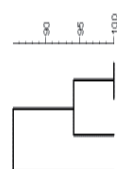
(G)

PFGE(Xba1)

M 1 2 3 4 M



デンドログラム(UPGMA法、係数;Dice)

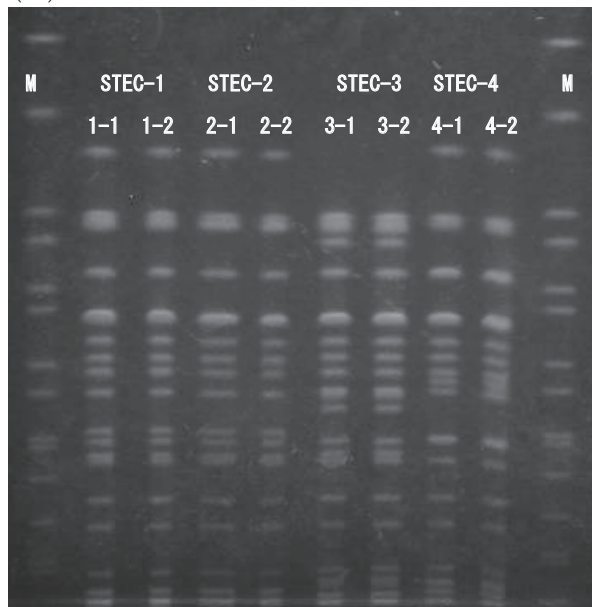


STEC1
STEC2
STEC4
STEC3

R02 外部精度管理

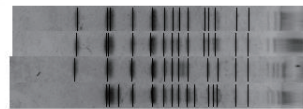
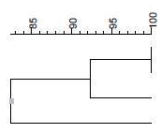
R02 外部精度管理

(H)



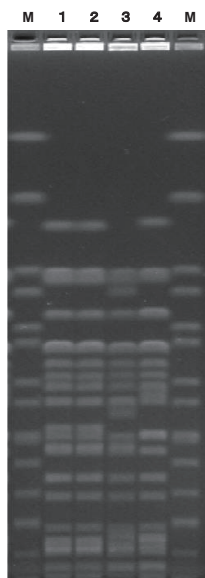
E.coli PFGE

E.coli PFGE

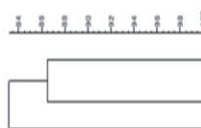


2020PulseNet STEC2-1
2020PulseNet STEC1-1
2020PulseNet STEC4-1
2020PulseNet STEC3-1

(I)

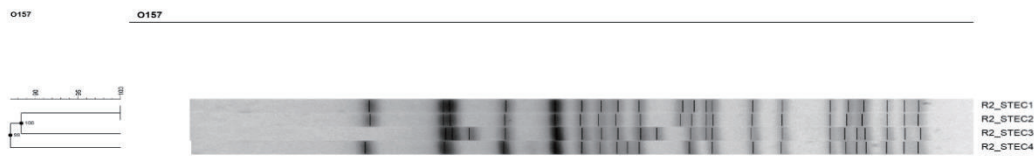


M: Marker (S.Braenderup)
1: STEC 1
2: STEC 2
3: STEC 3
4: STEC 4

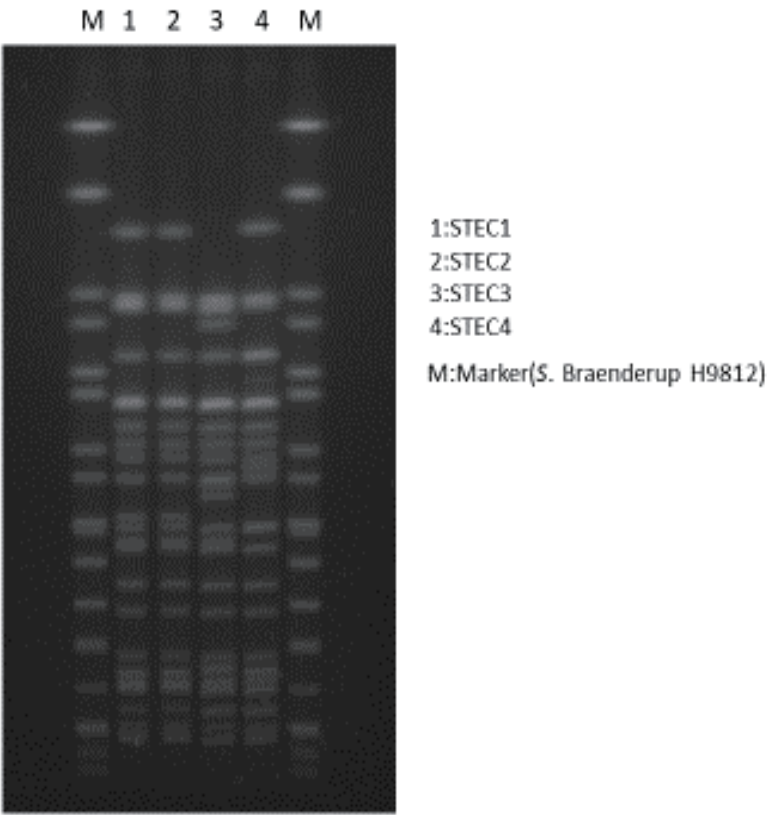


STEC1
STEC2
STEC4
STEC3

(J)



PFGE泳動写真



(K)

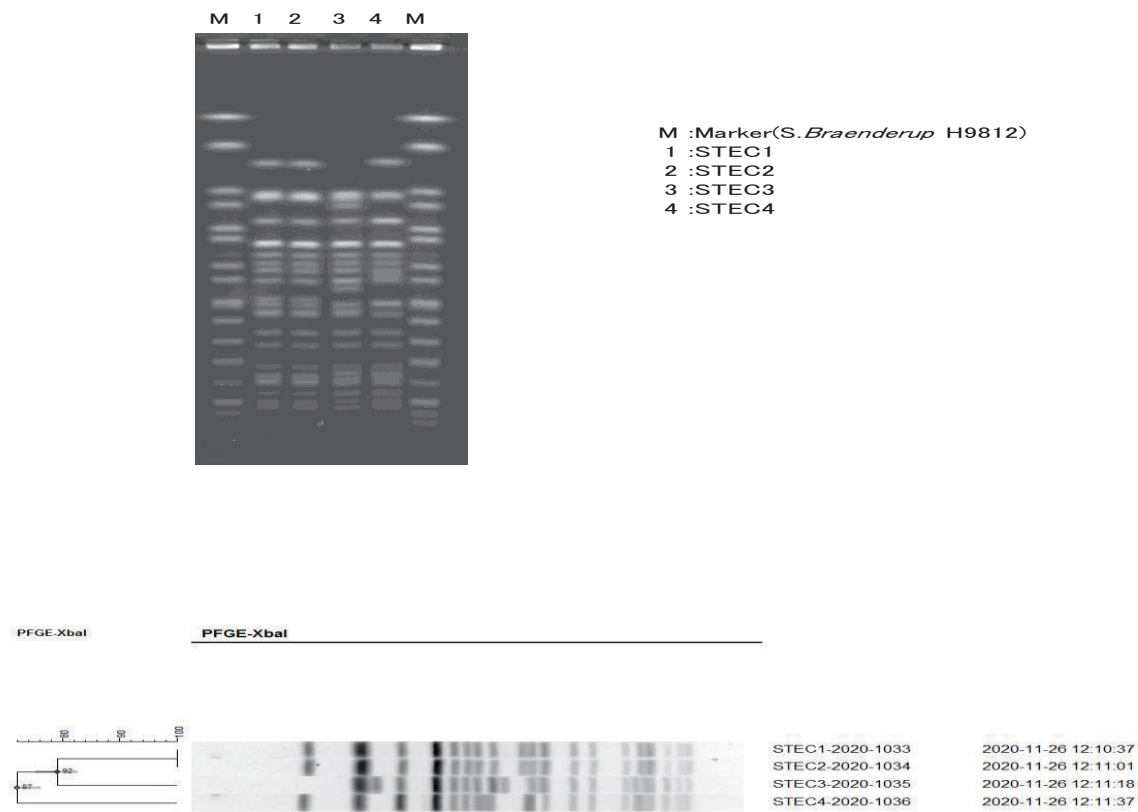


表 3 PFGE 法によりデンドログラム解析結果

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2－菌株3⇒＞菌株4(100－80%)
(D)	PFGE実施せず
(E)	菌株1=菌株2－菌株4⇒＞菌株3(100－76%)
(F)	菌株1=菌株2－菌株4⇒＞菌株3(100－82%)
(G)	菌株1=菌株2－菌株4⇒＞菌株3(100－85%)
(H)	菌株1=菌株2－菌株4⇒＞菌株3(100－82%)
(I)	菌株1=菌株2－菌株4⇒＞菌株3(100－83%)
(J)	菌株1=菌株2－菌株3⇒＞菌株4(100－87%)
(K)	菌株1=菌株2－菌株3⇒＞菌株4(100－72%)

= : 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																
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EH0-1	EH0-2	EH0-5	EH0-9	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
STEO1	B	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	O	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	E	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	F	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	Q	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	H	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	I	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	J	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	11	12	12	8	8	7	4	8
	K	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
STEO2	B	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	O	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	E	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	F	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	Q	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	H	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	I	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	J	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	11	12	12	8	8	7	4	8
	K	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
STEO3	B	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	O	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	E	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	F	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	Q	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	H	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	I	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	J	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	11	12	7	5	11	5	6	7
	K	2	-2	1	4	-2	7	4	8 *	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
STEO4	B	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	O	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	E	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	F	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	Q	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	H	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	I	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	J	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	11	12	10	5	7	6	8	7
	K	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7

* リポート数「9」にもピークがあったが、「8」のピークが高い

表 5

施設 F

中四国ブロック患者由来STEC株(2020年度)						感染研 PFGE型	感染研 MLVA型	感染研 MLVA complex	備考(疫学的関連など)
F	20008	6月	O ₆ H ₂₂	H _g 25	1	解析済			
F	20009	6月	111	H-	1・2		20m3009		
F	20010	6月	157	7	1・2		16m0034		
F	20015	6月	103	2	1		16m4003	20c401	菌株No.20017の家族内事例
F	20016	6月	103	2	1		16m4003	20c401	菌株No.20017の家族内事例
F	20017	6月	103	2	1		16m4003	20c401	家族内事例
F	20018	6月	157	7	1・2		20m0047	20c003	
F	20020	7月	26	11	1		13m2015	20c203	菌株No.20017の家族内事例
F	20033	8月	26	11	1		20m2064	20c204	菌株No.20035の家族内事例
F	20034	8月	26	11	1		20m2065	20c204	菌株No.20035の家族内事例
F	20035	8月	26	11	1		20m2040	20c204	家族内事例
F	20039	9月	157	7	2		20m0041	20c020	
F	20040	9月	121	19	2		20m5009		
F	20041	10月	26	11	1		20m2126		菌株No.20042の家族内事例
F	20042	10月	26	11	1		20m2126		家族内事例
F	20043	10月	103	11	1		20m4035		
F	20048	9月	128	H _g 2	1・2	解析中			
F	20049	11月	121	19	2		20m5015		
F	20050	11月	128	45	2	解析中			
F	20051	12月	1	20	1	解析中			
F	21001	1月	103	2	1	未送付	未送付	未送付	

表 6

施設 G

県 名	菌株No	発生月	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	20Y01	3月	0128	H2	1			解析済み			
G	20Y02	5月	0157	H7	1+2	015457	311656		20m0048		
G	20Y03	5月	026	H11	1				15m2067		
G	20Y04	6月	0157	H7	2	305457	211642		20m0058		家族
G	20Y05	6月	0157	H7	2	305457	211642		20m0058		
G	20Y06	6月	026	H11	1				20m2039		20Y09と家族
G	20Y07	6月	0157	H7	2	305457	211642		20m0058		
G	20Y08	6月	026	H11	1				20m2039		20Y15と家族
G	20Y09	6月	026	H11	1				20m2039		20Y06家族
G	20Y10	5月	026	H11	1				20m2046		20Y14と家族
G	20Y11	6月	026	H11	1				19m2117		
G	20Y12	6月	026	H11	1				20m2039		
G	20Y13	6月	026	H11	1				20m2039		
G	20Y14	6月	026	H11	1				20m2046		20Y10と家族
G	20Y15	6月	026	H11	1				20m2039		20Y08と家族
G	20Y16	6月	026	H11	1				13m2027		
G	20Y17	6月	026	H11	1				20m2052		
G	20Y18	7月	0157	H7	2	145047	301443		20m0167		
G	20Y19	7月	0g172	H25	2			解析済み			
G	20Y20	7月	0157	H7	1+2	317577	211756		20m0180		家族
G	20Y21	7月	0157	H7	1+2	317577	211756		20m0180		
G	20Y22	7月	0157	H7	1+2	317577	211756		20m0180		
G	20Y23	8月	0157	H7	1+2	317157	211756		20m0230		20Y27の家族
G	20Y24	8月	0157	H7	1+2	013057	214447		20m0228		同居家族
G	20Y25	9月	0157	H7	1+2	013057	214447		20m0228		
G	20Y26	9月	0157	H7	1+2	217577	211547		20m0229		
G	20Y27	8月	0157	H7	1+2	317157	211756		20m0230		20Y23と家族
G	20Y28	8月	0157	H7	1+2	011057	310047		20m0207	20c026	
G	20Y29	8月	0157	H7	1+2	317577	211757		17m0160		
G	20Y30	8月	0157	H7	1+2	215457	311656		17m0487		
G	20Y31	8月	0157	H7	1+2	317577	211756		16m0093		
G	20Y32	10月	0115	H25	2			解析済み			
G	20Y33	10月	0103	H2	1				20m4032		
G	20Y34	10月	026	H11	1				20m2111		
G	20Y35	11月	091	H14	1+2				20m8012		

表 7

施設 H

(R2年度)STEC事例

県名	菌株No	発生月	分類	年代	O型	H型	VT型	感染研MLVA型	備考
H	1	2020年5月	患者	80歳代	121	19	2	18m5007	
H	2	2020年6月	患者	40歳代	156	－	1		
H	3	2020年7月	患者	30歳代	157	7	1,2	20m0184	
H	4	2020年8月	患者	70歳代	157	7	1,2	18m0297	
H	5	2020年8月	接触者	60歳代	157	7	1,2	18m0297	
H	6	2020年8月	接触者	40歳代	157	7	1,2	18m0297	
H	7	2020年8月	患者	10歳代	157	7	1,2	17m0160	
H	8	2020年8月	患者	20歳代	157	7	1,2	20m0233	
H	9	2020年8月	患者	40歳代	157	7	1,2	20m0233	
H	10	2020年8月	患者	70歳代	157	7	1,2	20m0234	
H	11	2020年10月	患者	20歳代	157	7	1,2	17m0160	
H	12	2020年9月	患者	10歳代	157	7	1,2	17m0160	
H	13	2020年10月	患者	30歳代	157	7	1,2	20m0348	
H	14	2020年10月	患者	20歳代	157	7	1,2	20m0169	
H	15	2020年10月	接触者	20歳代	157	7	1,2	20m0169	
H	16	2020年10月	患者	10歳代	111	－/g8	1	20m3039	

表 8

施設 I

中四国ブロック患者由来STEC株(2020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	EH20-8	4月	156	25	1			解析済			保菌者
I	EH20-9	6月	26	11	1				15m2113	20c203	患者
I	EH20-10	7月	103	2	1				20m4022		患者
I	EH20-11	7月	103	2	1				20m4023		患者
I	EH20-12	7月	26	11	1				20m2070		患者(EH200012, 13, 18は家族)
I	EH20-13	7月	26	11	1				20m2070		患者(EH200012, 13, 18は家族)
I	EH20-14	8月	26	11	1				13m2015	20c203	患者
I	EH20-15	8月	26	11	1				13m2015	20c203	患者
I	EH20-16	8月	157	-	1, 2	011057	310047		20m0207	20c026	患者(EH200016, 20は姉弟)
I	EH20-17	8月	113	21	1, 2			解析済			保菌者
I	EH20-18	7月	26	11	1				20m2070		患者(EH200012, 13, 18は家族)
I	EH20-19	8月	157	7	1, 2	141047	302447		14m0486		患者
I	EH20-20	8月	112ab	19	2			解析済			保菌者(EH200016, 20は姉弟)
I	EH20-21	9月	157	7	1, 2	717555	611657		20m0169		患者
I	EH20-22	10月	26	11	1				20m2105		患者
I	EH20-23	11月	157	-	1, 2	717557	611657		20m0169		患者
I	EH20-24	11月	OUT	(H _g 8)	1			解析済			保菌者
I	EH20-25	11月	157	7	2	005457	211242		20m0427		患者(EH200025, 26は親子)
I	EH20-26	12月	157	7	2	005457	211242		20m0427		保菌者(EH200025, 26は親子)
I	EH20-27	12月	109	21	2			解析中			保菌者
I	EH21-1	12月	63	6	2			解析中			保菌者

表 9

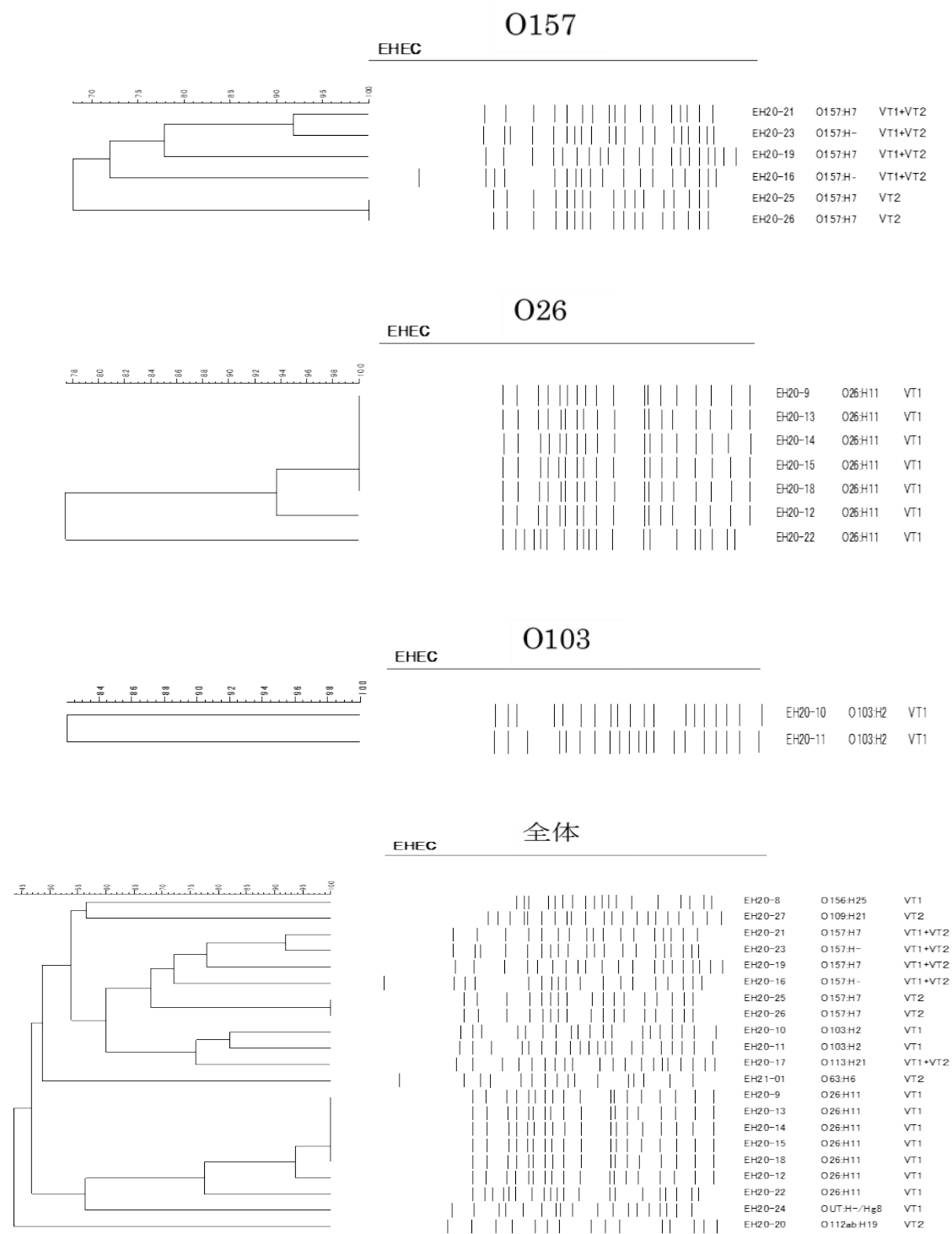
施設 I

中四国ブロック患者由来STEC株(2020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	EH20-9	26	11	2	1	1	2	3	12	15	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-12	26	11	2	1	1	2	3	14	14	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	4
I	EH20-13	26	11	2	1	1	2	3	14	14	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	4
I	EH20-14	26	11	2	1	1	2	3	12	14	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-15	26	11	2	1	1	2	3	12	14	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-16	157	-	2	-2	1	3	-2	8	5	-2	11	18	10	14	4	3	11	4	5
I	EH20-18	26	11	2	1	1	2	3	14	14	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	4
I	EH20-19	157	7	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	10	4	3	5	5	-2
I	EH20-21	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	7	3	6
I	EH20-22	26	11	2	1	1	2	2	8	14	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-23	157	-	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	7	3	6
I	EH20-25	157	7	2	-2	1	6	-2	8	4	-2	-2	17	9	7	6	4	6	10	6
I	EH20-26	157	7	2	-2	1	6	-2	8	4	-2	-2	17	9	7	6	4	6	10	6

図 3

PFGE 解析結果（施設 I）



島根県における腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所

林 宏樹

研究要旨

令和 2 年度に島根県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 (以下、「O157」という。) 感染症 6 事例 7 株について、IS-printing system (以下、「IS」という。) 法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (以下、「MLVA」という。) 法を実施し、分子疫学解析としての有用性を検討した。その結果、3 事例で MLVA type が一致した。また、他の 1 事例では、この 3 事例と同一の IS コードを示した一方、MLVA 法では single-locus variant であった。これらの 4 事例には疫学的関連性は認められず、同一感染源の暴露を受けたとの判断はできなかった。

このように散発的に同一タイプの遺伝子型が検出される場合は、詳細な疫学情報の収集や、より識別能の高い分子疫学解析法について検討が望まれる。

A. 研究目的

令和 2 年度に島根県内で発生した O157 感染症事例について、IS 法と MLVA 法による解析結果を比較し、分子疫学解析としての有用性を検討した。

増幅なしを「0」と判定、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化 (IS コード) した (表 1)。

B. 研究方法

1. 供試菌株

令和 2 年度に島根県で届出のあった (令和 2 年 7 月 17 日から令和 2 年 11 月 13 日の届出まで) O157 感染症 6 事例 7 株を用いた。

2. 方法

(1). IS 法

IS-printing System (東洋紡) の説明書に記載された方法に準じて実施した。結果は、プライマーセットごとにスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、

(2). MLVA 法

Izumiya らの方法¹⁾に従い実施した。18 領域のうち locusO157-10 を除く領域について解析した。QIAGEN multiplex PCR kit (QIAGEN) を使用した PCR 反応後、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 及び Gene Mapper Software ver. 5.0 (Applied Biosystems) を使用してフラグメント解析を行った。

size marker は、GeneScan 600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) を用いた。

また、MLVA 情報集計・可視化システ

ム MLVA-mate により Minimum Spanning Tree (MST) を作成し²⁾、クラスター解析を行った。

C. 研究結果

島根県における令和 2 年度の O157 感染症の発生は、6 事例 7 件であった。IS 法による解析では、事例 B, C, D 及び F で同一の IS コードを示し、その他の事例ではそれぞれ異なる IS コードを示した (表 2)。

MLVA 法による解析では、事例 B, C, D で同一の MLVA type を示し、その他の事例ではそれぞれ異なる MLVA type を示した (表 2, 3)。MST 解析について図 1 に示す。

D. 考察

令和 2 年度に島根県で発生した O157 感染症 6 事例のうち、事例 B, C, D 及び F は IS 法では同一の IS コードを示していた。また、MLVA 法では事例 B, C 及び D で MLVA type が一致しており、これらの事例は同一クローン由来の菌株である可能性が示唆された。

事例 B, C 及び D の発生時期は、1 ヶ月以内と比較的近かったが、疫学調査では関連性は認められなかった。また、事例 F の発生時期はこれらの事例とは 2-3 ヶ月離れていた。事例 F の株は、MLVA 法による解析で、事例 B, C 及び D の株と single-locus variant (EHC-1) であったことから、同一の IS コードを示した可

能性が考えられた。本県以外でも、これら 3 事例の株と同一 MLVA type の株が散見されたが、疫学的な関連性は認められなかった。

散発事例間の関連性を見るうえで、IS 法や MLVA 法は優れたシステムであるが、このような散発事例が発生した際には十分な疫学情報を入手できない場合があり、同一感染源の暴露を受けたかどうかを判断するのは難しい。これらの課題を解決するには、IS 法や MLVA 法よりも識別能の高い次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析について検討が望まれる。

E. 結論

1. IS 法や MLVA 法は、疫学的背景の不明な散発事例間の関連性を見るうえで有用な手法である。
2. IS 法は、迅速かつ簡便に実施できる有用なタイピング法ではあるが、MLVA 法よりも識別能力が低いことを考慮して用いる必要がある。
3. 今後、次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析について検討が望まれる。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Izumiya H, et al. Microbiol Immunol. 2010;54 (10) :596-77.
- 2) 南須原亮, 他. 東京都健康安全研究センター年報 2018;69:279-84.

表 1 IS 法の増幅バンドサイズ及び判定のコード変換

1st set primer																		
primer 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	hlyA
size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
判定例	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	7			1			7			5			5			5		

2nd set primer																		
primer 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
size (bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定例	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	2			1			1			6			5			7		

表 2 供試菌株及び IS 法及び MLVA 法の解析結果

事例	No.	届出年月日	VT	ISコード		MLVA type	疫学情報	症状の有無
				1st set	2nd set			
A	1	2020/7/17	2	145047	301142	20m5002		無
B	2	2020/8/15	2	002057	214442	17m0435		有
C	3	2020/8/17	2	002057	214442	17m0435	No.3-4は家族	有
	4	2020/8/20	2	002057	214442	17m0435		無
D	5	2020/9/1	2	002057	214442	17m0435		有
E	6	2020/9/12	1&2	215457	311656	20m0323		無
F	7	2020/11/13	2	002057	214442	20m0223		有

図 1 MLVA 法による Minimum Spanning Tree

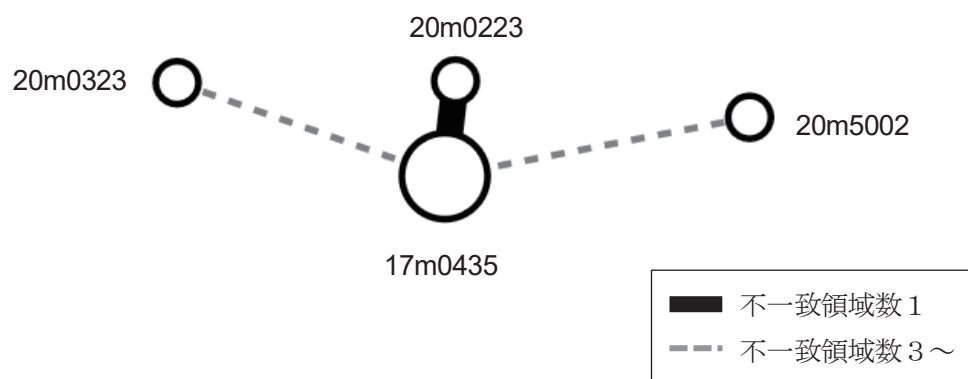


表 3 供試菌株のリピート数

事例 No.	リピート数 (-2：増幅産物なし)																MLVA type	
	EH111-11	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
A 1	2	-2	1	1	-2	6	8	-2	-2	-2	5	12	3	3	8	6	8	20m5002
B 2	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	6	17m0435
C 3	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	6	17m0435
C 4	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	6	17m0435
D 5	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	6	17m0435
E 6	2	-2	1	4	-2	8	5	-2	4	12	10	13	2	16	7	4	6	20m0323
F 7	2	-2	1	4	-2	16	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	6	20m0223

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 2 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
	瀧下恵里子	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
	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
	前田莉花	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
	大山み乃り	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
	片宗千春	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 3 年 2 月 10 日現在で 2,157 件であり、令和 2 年度は 101 件の登録であった。令和 2 年度に九州ブロックで収集された EHEC は 385 株であった。その 0 群血清型の内訳は 0157 が 154 株と最も多く、腸管出血性大腸菌 026 (以下「026」という。) が 81 株、腸管出血性大腸菌 0111 (以下「0111」という。) が 14 株の順であった。令和 2 年度の EHEC による集団発生事例は 17 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 6 事例、0103 によるものが 2

事例、腸管出血性大腸菌 0121 によるものが 1 事例、腸管出血性大腸菌血清型別不能によるものが 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、ISPS 及び MLVA の精度管理において、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 2 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 5 施設であり、ほとんどの地衛研において、EHEC の遺伝子型別解析は 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、PFGE と ISPS は同じ電気泳動像を示すが、MLVA では異なる遺伝子型を示す株を確認することを目的とし、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）。結果は問題に対する回答と電気泳動写真の提供を受けた。ISPS の精度管理は、それぞれの遺伝子座の有無と電気泳動写真の提供を受けた。MLVA の精度管理は、それぞれのローカスにおけるリピート数の提供を受けた。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 1 日から令和 2 年 12 月 28 日までの九州ブロックにおける 0157 の IS 型の登録数は 2,157 件であり、平成 29 年度以降は減少傾向にある（表 2）。平成 29 年度以降、ISPS のデータベースに登録する地衛研が減少しているためと考えられることから、今後、ISPS の運用方法について見直す必要があると考えられる。

登録された 2,157 件の 0157 の IS 型数は 402 種類に分類された。最も多く登録されている IS 型は「66324257743」で 218 株（10.1%）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、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）。

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。

令和 2 年 4 月 1 日から 12 月 28 日までに 385 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 154 株（40.0%）、026 が 81 株（21.0%）、0103 が 50 株（13.0%）、0121 が 25 株（6.5%）、0111 が 14 株（3.6%）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、0103、0121 及び 0111 で全体の 8 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 17 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 6 事例、0103 によるものが 2 事例、0121 によるものが 1 事例、0 型別不能によるものが 1 事例であった。発生場所別は、保育所及び家庭内であり、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、PFGE と ISPS は九州ブロックの全ての地衛研で実施されていた。MLVA は令和 2 年 11 月末の段階で 5 地衛研が実施しており、今後、導入予定が 3 地衛研であった（表 6）。導入予定の地衛研に対し、研究班で研修等の支援を行う必要があると考えられる。

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、同じ泳動像を示す検体 1 と検体 3 の関連性については、9 地衛研で一致した（表 7）。

ISPS の精度管理には、11 地衛研が参加した。今回、精度管理に使用した菌株は、Set-1 の 1-02 と 1-03 の間、Set-1 の 1-09 と 1-10 の間にエキストラバンドが現れる株を選択した（図 4）。ISPS の精度管理の結果、一部の地衛研において、誤判定が認められた（表 8.1 から表 8.4）。誤判定の多くはエキストラバンドの判定であった。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 7 地衛研が参加した。今回、精度管理の菌株は、全て MLVA 型が異なるものを使用した（表 9）。一部の地衛研において、EHC-5、EHC-6、EHC-2、0157-34 の各ローカスで誤判定が認められた（表 10.1 から表 10.4）。MLVA は PFGE と比較して手技が簡便であるが、使用するキャピラリーやポリマーの管理を厳密に行わなければならないことが知られている。また、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、研修を実施し技術レベルの向上に努める必要があると考えられる。

本年度、MLVA の研修を予定していたが、新型コロナウイルス感染症の流行により研修会を中止した。

D. 結論

九州ブロックにおける 0157 の IS 型のデータベースへの登録数は、令和元年度より減少した。ISPS 及び MLVA 共に PCR をベースとした手法であるため、分解能が高い MLVA を実

施する地衛研が増えたためと考えられる。今後、ISPS の運用方法について検討する必要がある。

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

なし

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1 令和2年度の精度管理に用いたEHEC

試料名	菌株名	分離年	由来	血清型	毒素型	MLVA型 (感染研)
検体1	19EC076	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	19m0534
検体2	19EC077	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	19m0555
検体3	19EC086	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	20m0034
検体4	19EC031	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	16m0399

事例

管内の施設で腸管出血性大腸菌O157を原因とする集団感染事例が発生した。また、同一地域において、当該施設と関連がないと考えられる患者からも腸管出血性大腸菌O157が検出されている。これらの事例において検出された腸管出血性大腸菌O157の関連性をPFGEにより明らかにして頂きたい。

回答

該当するものを○で囲んでください。検体1と比較して異なるバンドの本数を記載してください。

- 問1 検体1と検体2は（一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致）
その理由：検体1と検体2はPFGEに於いて 本のバンドが異なる。
- 問2 検体1と検体3は（一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致）
その理由：検体1と検体3はPFGEに於いて 本のバンドが異なる。
- 問3 検体1と検体4は（一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致）
その理由：検体1と検体4はPFGEに於いて 本のバンドが異なる。

図1 PFGE精度管理の問題

表2 九州ブロックの地衛研におけるIS型別登録数

地衛研	IS型別登録数											合計
	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	平成26年度	平成27年度	平成28年度	平成29年度	平成30年度	令和元年度	令和2年度	
1	112	48	61	26	28	46	29	26	25	53	37	491
2	50	53	44	24	32	42	35	23	39	37	23	402
3	30	15	12	15	38	46	10	11	20	29	7	233
4	12	12	17	52	28	15	40	23	11	0	0	210
5	23	18	11	28	26	10	25	17	7	27	14	206
6	6	5	4	8	2	7	2	2	2	2	0	40
7	13	16	24	18	11	14	31	14	13	15	14	183
8	16	10	5	30	25	0	0	0	0	0	0	86
9	5	3	7	2	4	5	3	1	4	7	0	41
10	20	17	16	4	3	4	5	1	5	3	2	80
11	19	25	21	15	8	15	16	9	14	11	4	157
12	6	7	7	2	1	0	3	1	0	1	0	28
合計	312	229	229	224	206	204	199	128	140	185	101	2157

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	2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	66324257743	22	32	4	11	33	50	9	5	12	35	5	38	39	67	7	15	1	27	6	2	7	8	1	218	
2	57733536074	3	15	23	8	16	10	27	14	10	6	6	23	33	6	19	21	13	12	2	1	5	3		138	
3	30671622280	33	11	1	7	11	2	2	3	2	2	1	31	7	4	1	13	3	2		2	6	6		75	
4	66457435083	6	2	9	10	1	5	9	11		17	3	13	9	4	3	19	1	10		2	4	8		73	
5	56643812046	31	14	3	13	3							19	17	7	3	6	2	8			1	1		64	
6	30653010185	9	4	4	14	6	3	2	4	1	5	3	7	10	4	5	8		4	8		6	2	1	55	
7	57733470538		2	12	1	16	5	4	1	5	4	1	13	7	1	19	6		1		1	2	1		51	
7	57868549067	4		3	2				15	25		2	20	13	3	6	2		3				1	3	51	
9	22081687688	12			2	16			10				15	9	9		3				2	1	1		40	
10	66456320969	1			3	5	10	5	5	6	1	1	12			24	1								37	

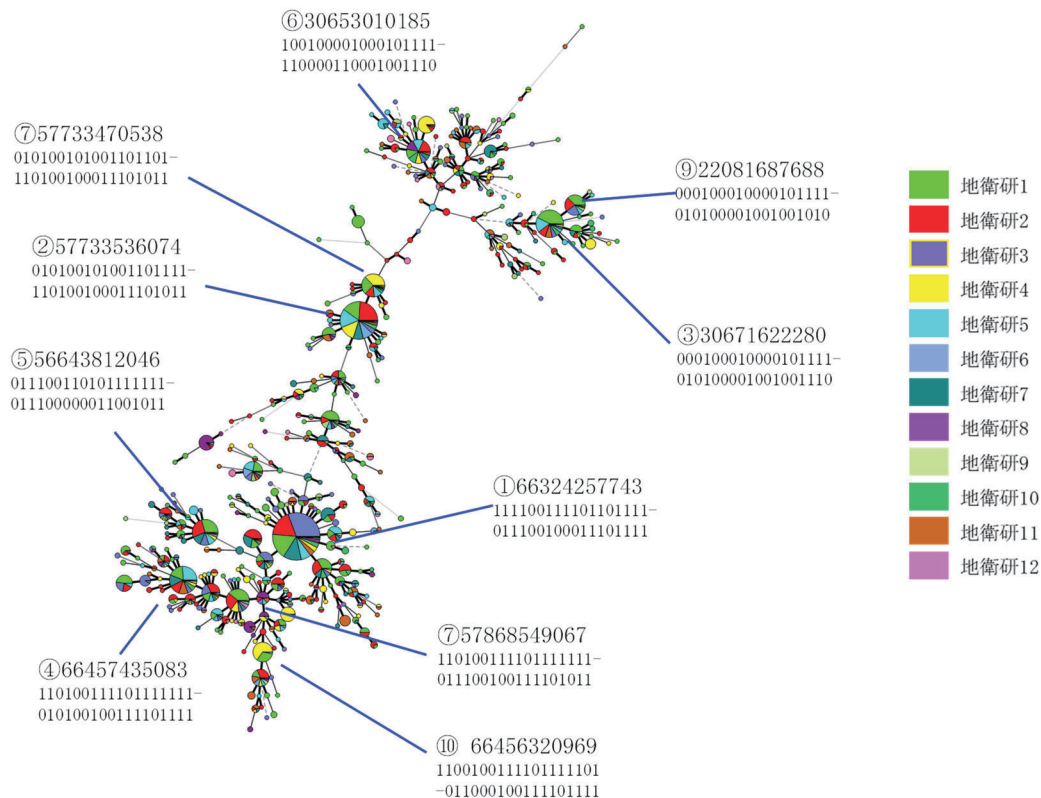


図2.1 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree（地衛研別）

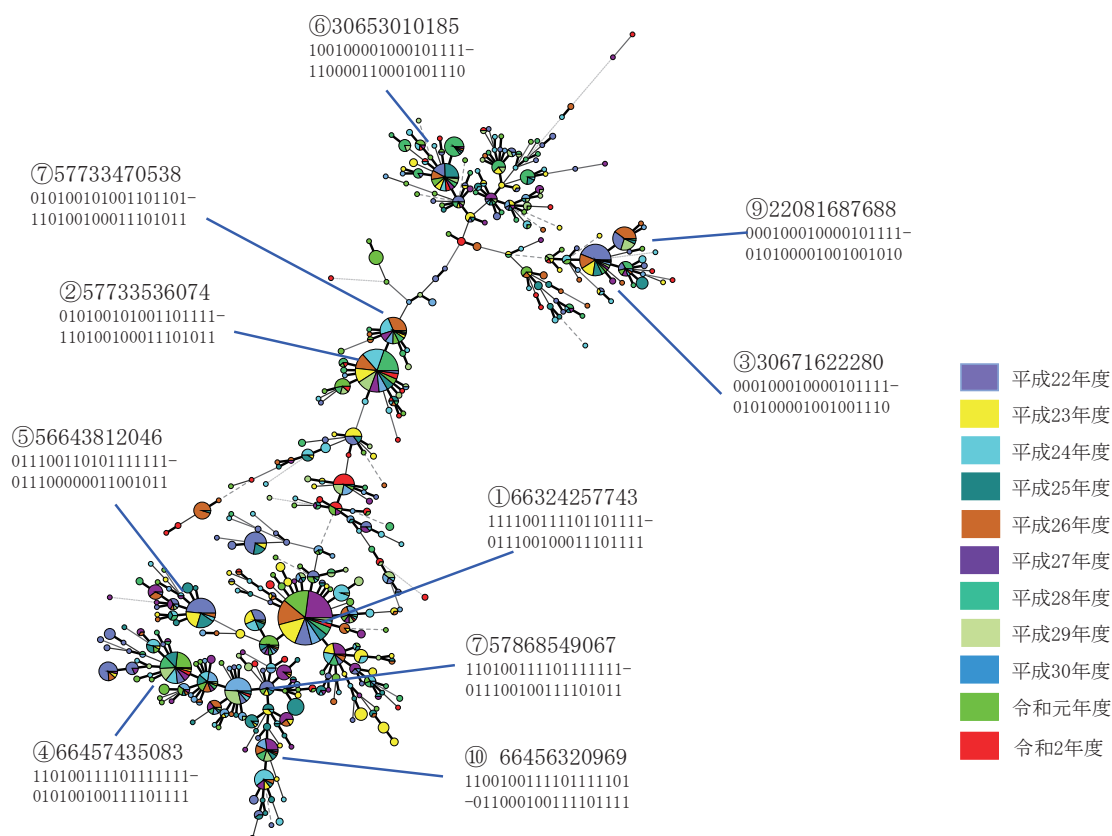


図2.2 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4 令和2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	0146	0128	0183	08	05	その他	
1	37	8	2	1						1		3		4	56
2	23	24	1	2	4	2	1				1		1	5	64
3	7	4	2	2	1			1				1			18
4	11	1		5										10	27
5	48	1	5	24	2		1				1			6	88
6		6			17										23
7	14	4		6										7	31
8	7	5													12
9	1	7	1	1		1	1		1	1				2	16
10	2	6					1							1	10
11	4	2	1	1	1			1						2	12
12	0	13	2	8				1					2	2	28
合計	154	81	14	50	25	3	4	3	1	2	2	4	3	39	385

表5 令和2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	stx_2	保育所	100	13
2	1	026: H11	stx_1	保育所	141	17
5	1	0157: H-	stx_1+stx_2	保育所	105	4
	2	0157: H7	stx_2	保育所	121	23
	3	0157: H7	stx_2	保育所	108	8
	4	0103: H2	stx_1	保育所	179	14
6	1	026: H11	stx_1	家族内	4	2
	2	026: H-	stx_1	保育所	160	4
	3	0121: H19	stx_2	保育所	145	16
7	1	OUT	stx_1+stx_2	保育所	39	4
	2	0157	stx_1+stx_2	保育所	93	2
8	1	026: H11	stx_1	家族内	34	2
	2	026: H11	stx_1	家族内	5	2
	3	0157: H7	stx_2	家族内	33	3
	4	0157: H7	stx_2	家族内	5	2
12	1	026: H11	stx_1	家族内	2	2
	2	0103: H2	stx_1	家族内	2	2

表6 EHECの分子疫学解析手法の実施状況（地衛研数）

	実施	全株実施	一部の株 に実施	導入予定
PFGE	12	0	12	0
ISPS	12	5	7	0
MLVA	5	4	1	3

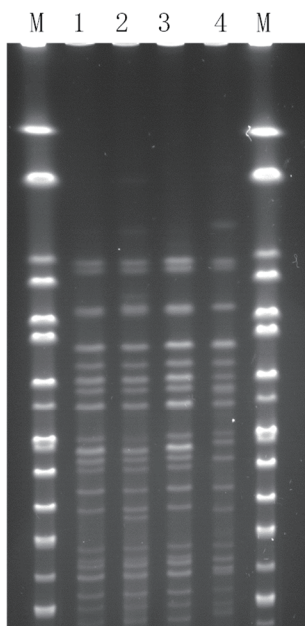


図3.1 地衛研1のPFGE電気泳動写真

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

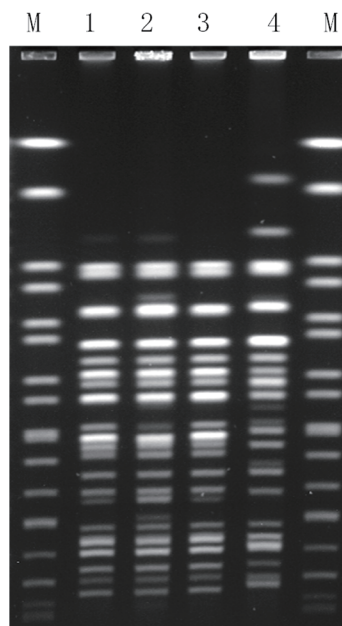


図3.2 地衛研2のPFGE電気泳動写真

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

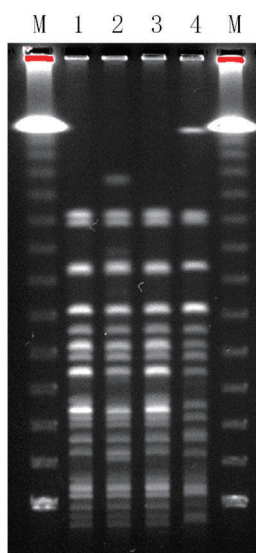


図3.3 地衛研3のPFGE電気泳動写真

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

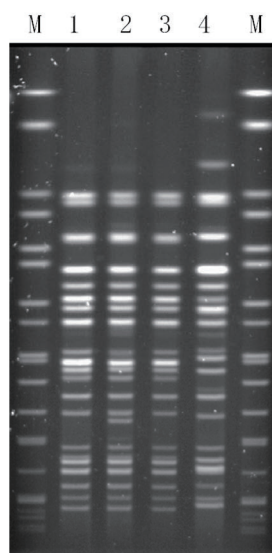


図3.4 地衛研4のPFGE電気泳動写真

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

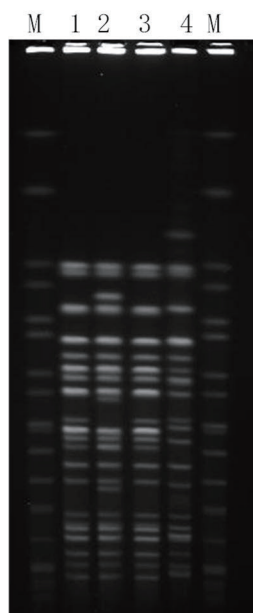


図3.5 地衛研5のPFGE電気泳動写真
M：サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

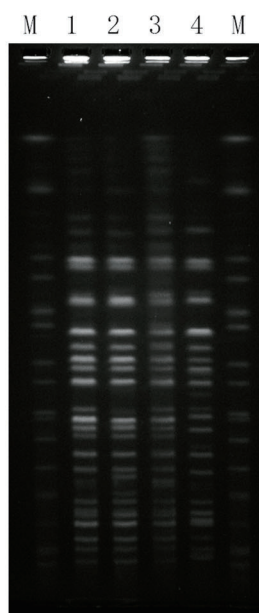


図3.6 地衛研6のPFGE電気泳動写真
M：サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

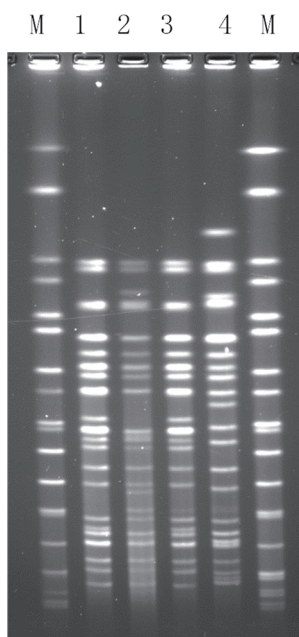


図3.7 地衛研7のPFGE電気泳動写真
M：サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

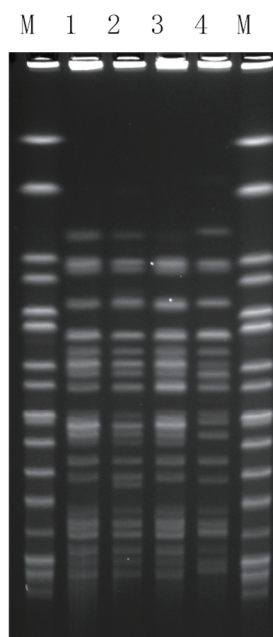


図3.8 地衛研8のPFGE電気泳動写真
M：サイズマーカー、レーン1:
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

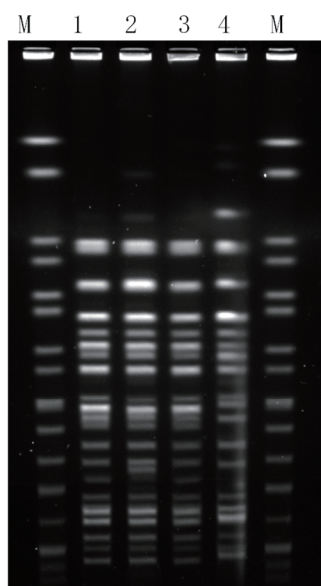


図3.9 地衛研9のPFGE電気泳動写真

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

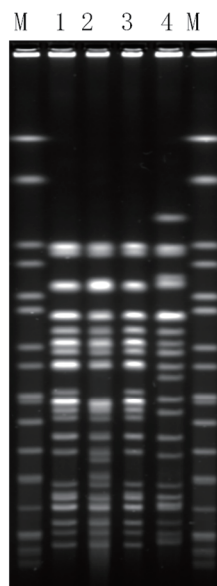


図3.10 地衛研10のPFGE電気泳動写真

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

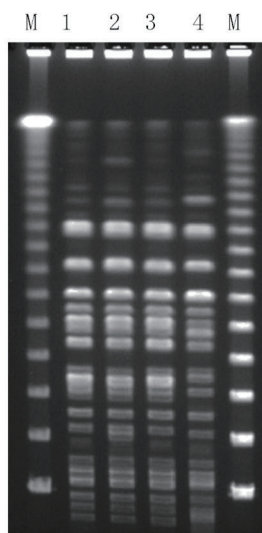


図3.11 地衛研11のPFGE電気泳動写真

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

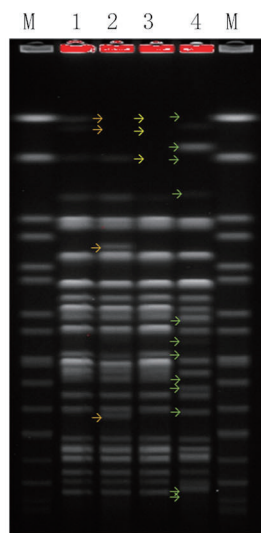


図3.12 地衛研12のPFGE電気泳動写真

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	密接に関係	2	一致	0	不一致	9
2	密接に関係	2	一致	0	不一致	14
3	密接に関係	3	一致	0	不一致	7
4	密接に関係	1	一致	0	不一致	17
5	関係する可能性がある	4	一致	0	不一致	9
6	密接に関係	3	密接に関係	1	不一致	9
7	関係する可能性がある	5	密接に関係	1	不一致	8
8	関係する可能性がある	5	一致	0	不一致	9
9	密接に関係	2	一致	0	不一致	10
10	密接に関係	3	一致	0	不一致	9
11	密接に関係	1	一致	0	関係する可能性がある	4
12	関係する可能性がある	4	密接に関係	3	不一致	12

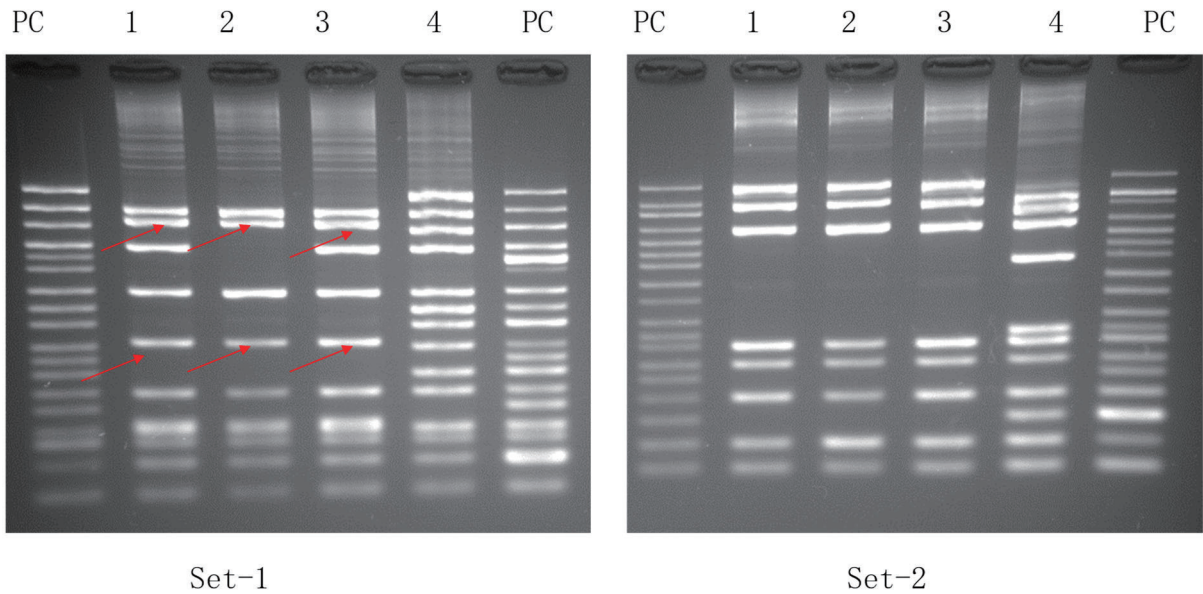


図4 ISPSの精度管理に使用した株の電気泳動写真

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、→：エキストラバンド

表8.1 菌株1に対する各地衛研のISPS結果

地衛研	set-1																	set-2																		
	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	eeae	1-16	hlyA	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
1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
3	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
4	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
7	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
8	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
9	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
10	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
11	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
12	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1

表8.2 菌株2に対する各地衛研のISPS結果

地衛研	set-1																set-2																stx2	stx1		
	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	eeae	1-16	hlyA	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
1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
7	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
8	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
9	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
10	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
11	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
12	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1

表8.3 菌株3に対する各地衛研のISPS結果

地衛研	set-1																eae	1- 16	hlyA	set-2																stx2	stx1
	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	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			
1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1				
2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1				
3	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1				
4	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1			
5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1			
7	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1			
8	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1				
9	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1			
10	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1			
11	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1			
12	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1			

表8.4 菌株4に対する各地衛研のISPS結果

地衛研	set-1																	set-2																			
	0-1	1-0	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	1-7	1-8	1-9	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	01	02				03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16			
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
3	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
4	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
5	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
7	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
8	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
9	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
10	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
11	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
12	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1		

表9 精度管理に使用した菌株のMLVA型

検体	MLVA型	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
菌株1	19m0534	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3
菌株2	19m0555	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3
菌株3	20m0034	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3
菌株4	16m0399	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6

表10.1 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	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
5	2	-2	1	4	-2	6	6	11	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
6	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
9	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
10	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
11	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
12	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	

表10.2 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	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
5	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
6	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
9	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
10	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	
11	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	-2	-2	9	16	3	10	7	5	3	
12	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3	

表10.3 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	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3	
5	2	-2	1	4	-2	6	6	11	11	-2	9	10	3	10	7	5	3	
6	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3	
9	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3	
10	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3	
11	2	-2	1	4	-2	6	6	12	-2	-2	9	10	3	10	7	5	3	
12	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3	

表10.4 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	12	12	7	7	6	3	6	
5	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6	
6	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6	
9	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6	
10	2	-2	1	4	-2	5	5	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6	
11	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	-2	12	7	7	6	3	6	
12	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6	

令和 2 年度分担研究報告書

毒素原性大腸菌 O159 による集団食中毒事例について

長崎県環境保健研究センター 保健衛生研究部 保健科
○右田雄二、増輪文治、蔡国喜、浦川美穂、田栗利紹

長崎県五島保健所 衛生環境課
石原雅行、山下綾香、吉松嗣晃

要旨

2019 年 10 月、医療機関から研修会の際に提供された仕出し弁当を喫食した 10 名中 5 名が下痢症状を呈しているとの情報を保健所が探知した。検便検査の結果、有症者 3 名および調理従事者 1 名から耐熱性エンテロトキシン (ST) 産生性の毒素原性大腸菌 (ETEC) O159 が分離された。PFGE 電気泳動による遺伝子型別は完全に一致していた。本事例は飲食店を原因施設とする集団食中毒事件と判断された。

A. 事例の概要

2019 年 10 月 19 日、五島保健所管内の医療機関から食中毒疑いの通報があった。同保健所の調査によると、10 月 9 日に当該医療機関で開催された研修会の際に提供された仕出し弁当を喫食した後、10 月 11 日～13 日にかけて 10 名中 5 名が下痢症状を呈した。衛生検査所の検査結果では、1 名の患者から病原性大腸菌 O159 を検出したとの情報を得た。

これより保健所は有症者 4 名及び調理従事者 2 名の検便検査を開始した。保健所では、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌および腸炎ビブリオにつ

いて、当所ではノロウイルス、下痢原性大腸菌、カンピロバクター属菌及びウェルシュ菌の検査を実施した。検食については保存されていなかった。

検査の結果、有症者 3 名および調理従事者 1 名から ST 毒素産生性の ETEC O159 が分離された。その他の病因物質は検出されなかった。その後、O159 株間の関連性を確認するためにパルスフィールドゲル (PFGE) 電気泳動による制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析を実施した。

B. 検査方法

1) 遺伝子スクリーニングおよび培養

下痢原性大腸菌の検査は、保健所と当所とで連携して検査した。即ち、搬入前日に保健所で糞便をトリプチケースソイブロス (TSB) に接種した検体を当所に持ち込み、37℃、6 時間程度培養した後、アルカリ熱抽出した増菌液の沈査を用いて PCR 法による *Stx1*、*Stx2*、*invE*、*ST* および *LT* 遺伝子の保有の有無をスクリーニングした。

腸管内に常在する大腸菌と識別困難な下痢原性大腸菌の検査方法は、糞便および増菌培養液を X-MG 培地および DHL 培地で 37℃ 20 時間培養後、平板上に形成された大腸菌様コロニーをディスポーニードルで釣菌し、調製済み PCR 反応液に直接加える Colony-direct PCR 法により検出を試みた。

2) 生化学性状試験

CLIG、TSI、LIM、VP、シモンズクエン酸培地にて 37℃ 18 時間培養し鑑別試験を実施した。

3) 血清型別試験

O 群別試験および H 型別試験は病原大腸菌免疫血清「生研」により実施した。

4) PFGE 電気泳動による RFLP 解析

被検菌および *Salmonella* Braenderup H9812 株を TSB に接種し、増菌液を九州ブロックマニュアルに準じてサンプル調製を行った。泳動は CHEFDR-Ⅲを用いて電圧 6 V/cm、パルスタイム 2.2 – 54.2 sec、泳動時間 18 時間、バッファー温度 14℃の条件で実施した。

C. 検査結果

TSB 増菌液による遺伝子スクリーニング試験の結果、有症者 4 名中 3 名および調理従事者 2 名中 1 名から *ST* 遺伝子が検出されたため、毒素原性大腸菌 (ETEC) の存在が強く疑われた。そのため *ST* 遺伝子陽性者の糞便および増菌液を培養した X-MG および DHL 平板上の大腸菌様コロニー (X-MG：濃緑～青紫色、DHL：赤色) について、Colony-direct PCR 法による *ST* 遺伝子の検出を行った。有症者 3 名については、それぞれ 16 コロニーを検査した中で *ST* 遺伝子陽性株を検出したが、調理従事者 1 名については検出するまでに 132 コロニーを検査した。

このようにして得られた分離株 4 株 (有症者：3 株、調理従事者：1 株) の生化学性状は、CLIG、TSI、LIM、VP およびシモンズクエン酸培地において典型的な大腸菌の生化学性状を示した。

O 群別試験および H 型別試験では、いずれの株も O159:H20 と同定された。

PFGE 電気泳動による RFLP 解析の結果 (図 1) では、4 株とも同じ泳動パターンを示した。

D. 結論および考察

2009 年から 2013 年までの国立感染症研究所の下痢原性大腸菌の集計結果¹⁾によると、ETEC は O159、O6、O169 および O148 で全体の 8 割を占め、多様な血清型が報告されている。本事例では、衛生検査所の検査結果で有症者 1 名から O159 が報告されたが、ETEC の産生毒素 (ST および LT) の保有の有無は不明で

あった。よって、保健所および当所では ETEC を含む食中毒病因物質の検査を実施した。

本調査の結果、患者 3 名および調理従事者 1 名から ST 毒素産生性の ETEC O159:H20 が分離され、RFLP 解析において同じ泳動パターンを示した。Tenover²⁾ の分類基準によると同一の感染事例として扱われる。

保健所の聞き取り調査によると、仕出し弁当を提供した店舗において調理したものを喫食した他グループには有症者はみられなかった。さらに O159 が検出された調理従事者 1 名は日頃から軟便を呈しており、常在的に本菌を保有していた可能性がある。

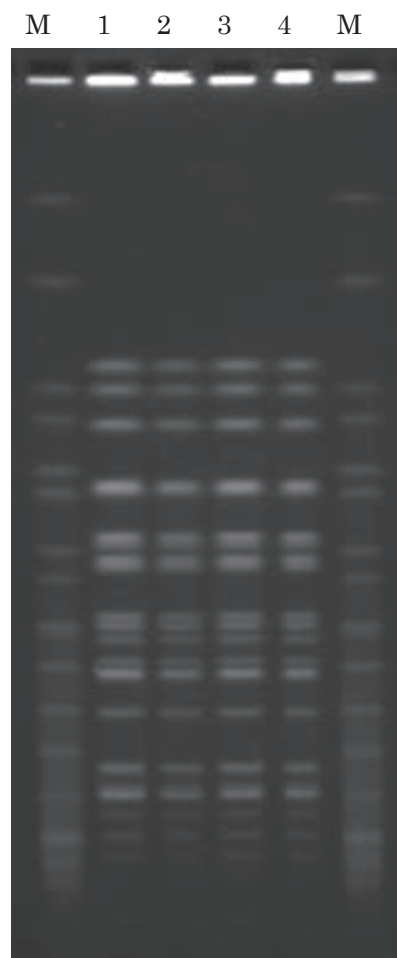
以上のことから、本調理従事者が仕出し弁当を作る際に手指を介して O159 を伝搬させた可能性が高いと考えられた。

E.文献

1) 第 34 回衛生微生物技術協議会レファレンスセンター関連会議⑤「大腸菌」資料 (2013 年 7 月、名古屋)

2) Tenover FC et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : Criteria for bacterial strain typing . J Clin Microbiol 1995 ;

33 : 2233—9.



Lane 1-3 : 有症者

Lane 4 : 調理従事者

M : マーカー (*Salmonella* Braenderup H9812)

図 1 O159 の RFLP 解析結果 (Xba I 消化)

令和 2 年度分担研究報告書

長崎市で発生したウエルシュ菌食中毒事例

長崎市保健環境試験所

江原裕子、島崎裕子、仁位和加奈、片上隼人

要旨

2019 年 9 月長崎市内の介護老人保健施設の敬老会においてウエルシュ菌を原因とする食中毒事件が発生した。当該施設が製造した弁当を喫食した 313 人中 80 人が下痢・腹痛等の症状を呈した。検査した 62 人中 43 人の糞便からウエルシュ菌検出またはウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子が検出された。共通食である弁当からもウエルシュ菌が検出されたが、市販の免疫血清では血清型別は確定できなかった。パルスフィールド電気泳動（P F G E）を実施し、検出菌株の同一性を検索し、疫学解析の指標とすることができた。

A. 事例の概要

2019 年 9 月 21 日、長崎市内の介護老人保健施設の敬老会に参加した施設入所者、スタッフ、来賓、および慰問団体スタッフが腹痛・下痢等の症状を呈した。共通食は当該施設が製造した弁当のみであった。有症者及びスタッフの便 62 検体、検食 19 検体、ふきとり 7 検体の細菌検査を実施した。初日に搬入された有症者 8 人についてはノロウイルス検査を実施したが陰性であった。

B. 検査方法

1. 分離培養検査

便は 0.5%塩化ナトリウム加 1%ペプトン水で 10%乳剤とし、チオグリコール酸培地、カナマイシン含有 C W 寒天培地

を使用し、ウエルシュ菌の分離を行った。アネロパックケンキ（スギヤマゲン）を用いて 18~20 時間嫌気培養した C W 寒天培地からレシチナーゼ反応による黄色を帯びた白濁環をもつ乳黄色の集落を釣菌した。検食は、10 g 採取したものに PBS90ml を加え、ホモジナイズして試料とした。

2. 血清型別試験

分離された菌の血清型別試験は、耐熱性 A 型ウエルシュ菌免疫血清（デンカ生研）を用いた。

3. エンテロトキシンの検出およびエンテロトキシン遺伝子の検出

有症者糞便を生理食塩水で 10 倍乳剤とした遠心上清について、PET-RPLA（デ

ンカ生研)を用いて、ウエルシュ菌エンテロトキシンの検出を試みた。また、ウエルシュ菌毒素遺伝子検出用プライマーセット CPE (タカラ)を用いて、ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子の確認を行った。

4. P F G E による遺伝子解析

分離株を GAM ブイヨンで 35℃一晩培養後、培養液 1000 μ l を PBS で洗浄し、精製水 500 μ l に懸濁した。等量の 1% Seaken Gold Agarose を加えてアガロースブロックを作成した。1mg/ml Lysozyme で 37℃1 時間溶菌、1mg/ml ProteinaseK で処理後、PefablocSC で不活化し、制限酵素 Sma I で 30℃16 時間酵素処理を行った。電圧 6.0V/cm、Initial 0.5 秒、Final 40.0 秒、19 時間の条件で泳動した。サイズマーカーは、Salmonella Braenderup H9812 を使用し、Xba I で処理した。

C. 検査結果

有症者便 36 検体中 34 件、無症状であったが弁当を喫食していたスタッフ便 26 検体中 13 件より、CW 培地でウエルシュ菌様のコロニーが確認された。ウエルシュ菌様のコロニーをスワイプして、滅菌精製水にとりウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検査を実施したところ、有症者便 33 件 (92%)、無症状者便 10 件 (38%) にエンテロトキシン遺伝子が確認できた。さらに、スワイプで陽性となった検体から単独コロニーを数個ずつ純培養し、これについてもエンテロトキシン遺伝子の確認を行った。また、有症者便の 10% 乳剤を、PET-RPLA を用いてウエルシュ菌エンテロトキシン検査を実

施し、10 検体中 9 件についてエンテロトキシンが確認できた。

検食として、原因と疑われた弁当が搬入されたが、盛り付けられた弁当のまま冷凍されたものであった。19 食品に分けて検査を実施したところ、エビ、レンコン、鮭、鴨、かまぼこ、卵焼き、煮物、もみじふなど多数の検食から、エンテロトキシン遺伝子が検出された。食品は盛り付け時に接触しているものも多く、解凍時のドリップに浸っている状態であった。検便からウエルシュ菌が検出され、当初原因食品として煮物が疑われたが、2,000cfu/g と汚染菌量が低く、原因食品の特定には至らなかった。

ふきとり検体からは食中毒菌は検出されなかった。

また、便や検食より分離されたウエルシュ菌を市販のキットにより Hobbs 型による血清型別を試みたが、型別不能であった。

介護老人保健施設入所者 2 名、スタッフ 2 名、同一敷地内にあるグループホーム入所者 1 名、余興を行った慰問団体スタッフ 1 名、検食 2 検体について、P F G E による遺伝子解析を実施した。P F G E パターンは、検食 1 検体 (No8) を除きすべて同一であった。(図 1)

D. 結論

健康者でも耐熱性ウエルシュ菌を腸管内に 15~25% と高率に保菌しており、本菌による食中毒と決定するには注意が必要である。

患者便から高率 (92%) にウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子が確認できたこと、糞便中からエンテロトキシンが証

明できたこと、弁当と患者便から検出されたウエルシュ菌が P F G E により同一のパターンを示したことなどから、何らかの要因により、ウエルシュ菌に汚染された弁当を原因とする食中毒であると断定した。

本事例では、市販の免疫血清で、血清型別を確認できなかったが、P F G E により、検食と患者便のウエルシュ菌の同一性が推察でき、疫学解析の指標とすることができた。

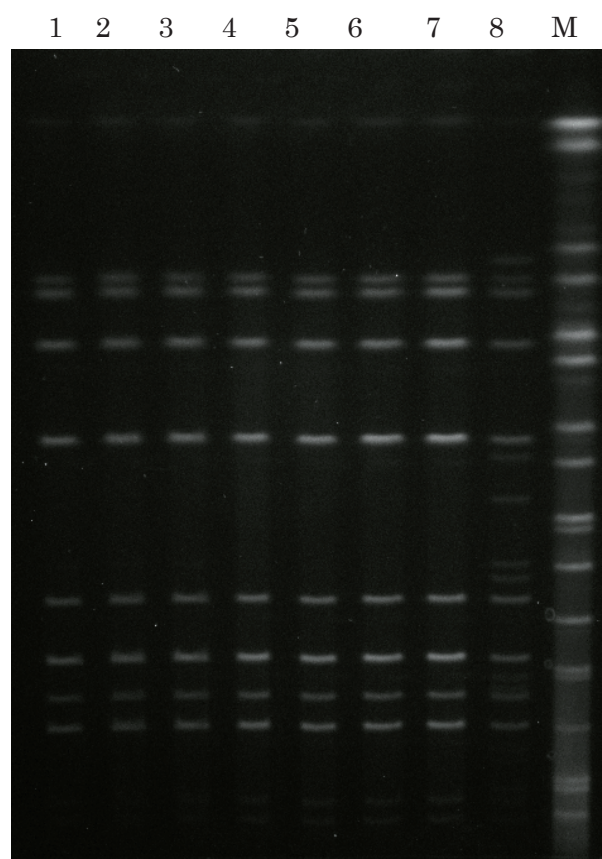


図 1 ウエルシュ菌の PFGE 写真

レーン 1. 老人保健施設入所者 A

レーン 2. 老人保健施設入所者 B

レーン 3. 老人保健施設スタッフ A

レーン 4. 老人保健施設スタッフ B

レーン 5. グループホーム入所者

レーン 6. 慰問団体スタッフ

レーン 7. 検食（車海老旨煮）

レーン 8. 検食（紅茶鴨ジャンボ博多巻）

M. サイズマーカー *S. Braenderup* H9812

研究成果の刊行に関する一覧表 （令和２年度）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, Ohnishi M.	Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Scheme for Non-O157 Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i> : Focus on Serogroups O103, O121, O145, O165, and O91.	Jpn J Infect Dis	73	481-490	2020
泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真	2019年に分離された腸管出血性大腸菌の MLVA 法による解析	IASR	41	71-72	2020
李謙一、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真	2019年に報告された腸管出血性大腸菌集団感染事例の全ゲノム配列解析	IASR	41	70-71	2020

令和3年4月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究2. 研究課題名 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3. 研究者名 (所属部・職名) 細菌第一部・室長(氏名・フリガナ) 泉谷秀昌・イズミヤヒデマサ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年4月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 研究課題名 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
- 研究者名 (所属部・職名) 細菌第一部・第一室長
(氏名・フリガナ) 伊豫田 淳 (イヨダ スナオ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 岩手県環境保健研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 田村 輝彦

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部・職名) 保健科学部 主任専門研究員
(氏名・フリガナ) 岩瀬香織・イワブチカオリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

- (※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
- (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由:これまで当該例が無く必要なかったため)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
- ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 愛知県衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 榊原 徹

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部・職名) 生物学部細菌研究室・主任
(氏名・フリガナ) 山田和弘・ヤマダカズヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

- (※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
- (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
- ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 福岡県保健環境研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 香月 進

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究

2. 研究課題名 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

3. 研究者名 (所属部・職名) 保健科学部病理細菌課・課長

(氏名・フリガナ) 濱崎光宏・ハマサキミツヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

令和3年3月17日

機関名 岡山県環境保健センター

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 望月 靖

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反の管理について
は以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究

2. 研究課題名 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

3. 研究者名 (所属部・職名) 保健科学部・部長(細菌科長)

(氏名・フリガナ) 狩屋英明・カリヤヒデアキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 予算・人員の削減により未策定)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



令和3年3月17日

厚生労働大臣 殿

機関名 東京都健康安全研究センター

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 吉村 和

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反の管理について
は以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究

2. 研究課題名 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

3. 研究者名 (所属部・職名) 微生物部食品微生物研究科 科長

(氏名・フリガナ) 鈴木 淳・スズキ ジュン

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年3月25日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 奥野 良信

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究

2. 研究課題名 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

3. 研究者名 (所属部局・職名) 微生物部 細菌課・主幹研究員

(氏名・フリガナ) 河合 高生・カワイ タカオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。