

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. 平成 30～令和 2 年度総合研究報告書

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. 平成 30～令和 2 年度分担研究総合報告書

(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……………	12		
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 0157 の分子疫学的解析…………… 20

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	

(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…………… 39

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
	尾島 拓也	札幌市保健福祉局衛生研究所
	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
	武差 愛美	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
	熊谷 優子	秋田県健康環境センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	檜尾 拓子	秋田県健康環境センター
	藤森亜紀子	岩手県環境保健研究センター
	山下 裕紀	岩手県環境保健研究センター

田中 静佳	山形県衛生研究所
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
木村 葉子	宮城県保健環境センター
山田 香織	仙台市衛生研究所
大下 美穂	仙台市衛生研究所
菊地 理慧	福島県衛生研究所
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
青木 順子	新潟県保健環境科学研究所
山本 一成	新潟市衛生環境研究所
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..... 46

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	山城 彩花	茨城県衛生研究所
	石川加奈子	茨城県衛生研究所
	水越 文徳	栃木県保健環境センター
	江原 栞	栃木県保健環境センター
	河合 優子	群馬県衛生環境研究所
	大場 浩美	群馬県衛生環境研究所
	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
	横山 栄二	千葉県衛生研究所
	榎本 啓吾	千葉県衛生研究所
	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
	井川由樹子	長野県環境保全研究所
	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
	尾畑 浩魅	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

原田 幸子 東京都健康安全研究センター
 平井 昭彦 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（地方衛生研究所及び衛生試験所）による
 腸管出血性大腸菌分子疫学解析法の精度管理及び分子疫学手法活用に関する研究…………… 54

研究分担者	松本 昌門	愛知県衛生研究所
	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
	木村恵梨子	石川県保健環境センター
	塩本 高之	石川県保健環境センター
	岩崎 理美	福井県衛生環境研究センター
	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
	山本 新也	豊橋市保健所衛生試験所
	石黒亜基子	豊橋市保健所衛生試験所
	中根 千鶴	岡崎市総合検査センター
	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…………… 74

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
	河野 智美	滋賀県衛生科学センター
	大石 剛史	京都府保健環境研究所
	小仲 兼次	京都府保健環境研究所
	武田 直樹	京都府保健環境研究所

浅井 紀夫	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
村山隆太郎	尼崎市衛生研究所
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
田邊 純子	奈良県保健研究センター
佐伯美由紀	奈良県保健研究センター
吉田 孝子	奈良県保健研究センター
西山 貴士	和歌山市衛生研究所
池端 孝清	和歌山市衛生研究所
中岡加陽子	和歌山県環境衛生研究センター
寺杣 文男	和歌山県環境衛生研究センター
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

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..... 83

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	田中 大和	鳥取県衛生環境研究所
	山根 拓也	鳥取県衛生環境研究所
	福間 藍子	島根県保健環境科学研究所
	小谷麻祐子	島根県保健環境科学研究所
	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
	檀上 博子	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
	佐藤香緒里	広島市衛生研究所
	栗林 智早	広島市衛生研究所
	山本美和子	広島市衛生研究所

坂本 綾	広島市衛生研究所
上田久仁子	広島市衛生研究所
山木戸 聡	広島市衛生研究所
尾羽根紀子	山口県環境保健センター
大塚 仁	山口県環境保健センター
野村 恭晴	山口県環境保健センター
篠原 礼	徳島県立保健製薬環境センター
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
木村千鶴子	愛媛県立衛生環境研究所
阿部 祐樹	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
潮 のどか	高知県衛生環境研究所
河合 央博	岡山県環境保健センター
森本 晃司	岡山県環境保健センター
仲 敦史	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

(VII) 九州ブロック

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) — 96

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
	大羽 広宣	北九州市保健環境研究所
	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
	緒方美奈子	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
	成松 浩志	大分県衛生環境研究センター
	溝腰 朗人	大分県衛生環境研究センター
	松本 一俊	熊本県保健環境科学研究所
	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
阿蘇品早苗	熊本市環境総合センター
吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所
宮原 聖奈	宮崎県衛生環境研究所
中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター
上村 晃秀	鹿児島県環境保健センター
高良 武俊	沖縄県衛生環境研究所
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
江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
中山 志幸	福岡県保健環境研究所
重村 洋明	福岡県保健環境研究所
大石 明	福岡県保健環境研究所
片宗 千春	福岡県保健環境研究所

3. 研究成果の刊行に関する一覧表（平成 30～令和 2 年度）…………… 110

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
平成 30—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）
松本昌門、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
2018-2020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 749 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 4819 株、026 1624 株、0111 338 株、0103 516 株、0121 298 株、0145 158 株、0165 12 株、091 109 株、計 7874 株を解析し、それぞれ、1824、576、189、140、105、52、12、90 の型が同定された。シンプソンの多様性指数 (SDI) は 0.923-1.00 であった。5 機関以上で検出された広域 MLVA コンプレックスもしくは MLVA 型は 3 年間で 87 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「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」に基づき地研から送付された MLVA データの解析を行い、3 年間で 32 機関からデータを受け、1636 株に型名を付与した。これらの送付データ並びに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されたが、平成 30 年度当時、MLVA 導入は過渡期にあり、ブロック内の MLVA 実施の地衛研は 12 施設のうち 3 施設であった。ブロック内の地衛研の MLVA 導入に寄与すべく、平成 30 年度、令和元年度に MLVA 解析に必須のフラグメント解析用ソフトウェア

GeneMapper の操作に重点を置いた「腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会」を開催した。令和 2 年 12 月現在、ブロック内地衛研では、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。また、標記研修会では、PFGE、IPPS も含めた EHEC 解析データの運用方法や MLVA 実施に伴う疑問などについて情報共有を図っており、令和元年度には、トラブルシューティング集として「EHEC MLVA フラグメント解析判定事例集」を作成した。令和 2 年度については、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、新型コロナウイルス感染症に配慮して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。

導入した分子疫学解析 MLVA について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令和元年度から実施している。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言われている。増幅効率のよい PCR 試薬キットにより、多くの地衛研で判定に苦慮する「低いピーク」が改善されたと報告があり、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、安定した条件のひとつとして検討されると考えられた。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要なことから、腸管出血性大腸菌 0157 共通菌株を用いた分子疫学解析法の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。PFGE、ISPS および MLVA について実施した結果、

すべての施設で良好な結果であった。

この3年間に11施設すべてでMLVAによる行政検査が実施可能となり、必要に応じて他の自治体間との情報共有と散发事例に対応してきたことがアンケート調査で明らかとなった。その一方で、現状ではMLVAは0157、026、0111の3血清型の解析方法であることから、これまで実施してきたPFGEによる精度管理も引き続き必要であるという意見がすべての施設から挙げられた。

3年間に東京都で検査を実施した腸管出血性大腸菌1131株の血清型において、0157が733株(64.8%)と最多で、次いで026が118株(10.4%)、0121が75株(6.6%)であった。MLVAが実施可能な主要3血清型の割合は76.7%(868株)で、今後0121および0103においてもMLVAが可能となれば、全体の約90%において効率的な情報の共有化が可能となると思われる。

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方11施設(地衛研、及び衛生試験所、以下各地研)において、EHECの分子疫学解析法の精度管理を実施した。平成30年度にはEHECのみならず全ての食中毒菌に適用可能で、最も汎用性に優れているPFGEの精度管理を、令和元年度には迅速・簡便な方法として各地衛研で汎用されているISPS)の精度管理を、令和2年度にはEHEC3血清型(0157、026、0111)に対する分子疫学解析法であるMLVA法についての精度管理を実施した。MLVA法の精度管理のみ、11施設のうち既にMLVA法が実施可能な8施設に対して実施した。また、令和2年度には愛知県内の中核市3市に対して、実習を交えたMLVA初期導入研修を実施した。愛知県内東海・北陸ブロックで分子疫

学手法を用いて解析した事例の報告を行った。

1) 平成30年度

1-1) PFGE 精度管理

11施設から送付された0145、0121計3株のPFGE泳動図について解析を行った結果、その相同性は菌株1は96.8%、菌株2は96.5%、菌株3は97.8%であった。過去に研究班活動として行ったPFGE精度管理では3年間の研究期間のうち特に1年目ではその相同性は低く80%を下回ることも多々あった。5年以上の間PFGE精度管理を行っておらず、かつ研究期間の1年目であることを考えると、今回は優れた結果が得られている。これは当研究班のこれまでの活動によるものと考えられるが、各施設で発生した食中毒事例の分子疫学解析にPFGEを使用していることも大きな要因であると思われる。

1-2) 分子疫学手法を用いて解析した事例の報告

平成30年度は2事例の報告があった。ひとつは腸管出血性大腸菌0157(VT1VT2)による事例で当該施設がMLVAによる遺伝子型別を実施した事例であった。もうひとつは腸管毒素原性大腸菌025による食中毒事例であった。地方衛生研究所でPFGEを実施し、解析結果を県内関係自治体に報告した。特に後者では東海・北陸ブロック内で連携して分子疫学解析を実施した好例となったと思われる。

2) 令和元年度

2-1) ISPS 精度管理

1st set: 検体No1では3施設が1-2と1-3の間のエキストラバンドを1-3と判定していた。また、1施設は1-14と1-15の間のエ

キストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。2nd set : 検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 に関しても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設で概ね良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認をおこなうことが重要である。

2-2) 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

118 株の 0157 は 106 MLVA 型に、42 株の 026 は 37 MLVA 型に型別することができた。

2-3) 東海・北陸ブロックで分子疫学解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *Escherichia albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てにおいて 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた。

3) 令和 2 年度

3-1) 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レポ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 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。

3-2) 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。

3-3) 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、分離株全てにおいて 95%程度の相同性があった。

5. 近畿ブロック

EHEC の分子疫学解析法の 1 つである MLVA の地衛研への導入促進を目的として、以下の①～④の研究を実施した。①回帰分析を利用した MLVA の新規レポート数決定法(新規解析法)を開発した。本方法は、従来法よりも汎用性が高く、従来法と同等以上の精度でレポート数を決定できると考えられた。②近畿ブロック内の地衛研を対象とした技術研修会を開催するとともに、MLVA 実施時に躓きやすいポイント等をまとめた Q&A を作成し、近畿ブロックの地衛研に配布した。

③検査結果の信頼性確保を目的とした MLVA 精度管理を実施した。その結果、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。④MLVA 検査体制が整備されるまでの期間は、近畿 IS データベースを運用し、流行株の解析情報を近畿ブロック内の地衛研で共有した。データベース登録施設数が年々減少したこと等を考慮して、令和 2 年度に近畿 IS データベースの更新を停止した。EHEC の遺伝子型別法は MLVA に統一される予定であるが、その技術レベルには施設間で差があった。疫学解析精度の確保・向上のために、今後も継続して MLVA の精度管理を実施して技術レベルの底上げを図る必要がある。

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・解析を行うことが有用である。地方衛生研究所(地衛研)が実施した分離菌株の分子疫学解析結果を用いて各自治体保健衛生部局が適正に解析等を行うには、地衛研における分離菌株の分子疫学解析手法の技術維持や解析精度・解析能力の向上による精度管理体制の強化が必要不可欠である。そこで、中四国ブロック内の施設を対象に、EHEC 0157 菌株を用いた ISPS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。その結果、一部の施設を除いて、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では技術の習熟、改善及び工夫が必要と思われた。また、MLVA については、導入する地衛研は増加傾向にあり、更に全国的な普及が予想される。MLVA を導入する施設に対して、技術研修及び本

研究成果に基づく MLVA 導入に係る技術的支援並びに導入後の継続的な精度管理の実施が、中四国ブロックにおける検査精度管理体制の強化のためには必要と考えられた。

平成 30 年度から令和 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、厚生労働省健康局結核感染症課及び厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課から平成 30 年 6 月 29 日に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」に基づいた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 型や同一の IS コードの EHEC 菌株による感染事例が複数の自治体で確認されたが、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を原因とする食中毒は認められなかった。

3 年間にわたる本研究により、菌株解析を行う中四国ブロックの地衛研の解析技術の向上を図ることができたものとする。更には、IS-printing System、PFGE 法、MLVA 法による EHEC 分子疫学解析手法の精度管理実施により、サーベイランス技術水準の向上に貢献したものとする。

7. 九州ブロック

九州ブロックでは、①ISPS による IS 型別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、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 型別のデータベースへの登録数は令和 2 年 2 月 10 日現在で 2,157 件であり、毎年 200 件前後の登録で推移していたが、近年、減少傾

向にある。これは ISPS 型別のデータベースを活用する地衛研が減少していると考えられることから、その運用について見直す必要があると考えられる。九州ブロックで平成 30 から令和 2 年度に収集された EHEC は 1,182 株であった。その O 群の内訳は、O157 が 540 株と最も多く、O26 が 275 株、O111 が 78 株、O103 が 77 株、O121 が 75 株の順であった。例年収集される EHEC の O 群血清型に大きな変化は認められなかった。平成 30 年度から令和 2 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例は 38 事例であった。発生場所は、保育所など従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。精度管理は PFGE、ISPS 及び MLVA について実施した。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。

8. 感染研における研究—2

集団感染事例の調査における全ゲノム配列 (whole genome sequence : WGS) 解析の適応性評価と MLVA のゲノムレベルでの評価を目的に、WGS 解析環境の構築、および 2013 年から 2020 年に国内で分離された EHEC O157 を対象とした WGS 解析を行った。WGS 解析の結果、疫学関連のある株間では 4 か所以内の SNP のみが認められた。この数を基準として MLVA を評価すると、同一 MLVA 型では SNP 解析とほぼ同一の型別能があったのに対して、1-3 か所以上の座位が異なる MLVA 型の株では、遺伝的に遠い株が含まれることが分かった。また、DNA 複製時のエラーを除去修復す

る蛋白質をコードする *mutS* に欠失がある場合は、SNP 数が過大に現れるために解析には注意を要することが確認された。以上の結果から、O157 の集団感染の検知能では、WGS と MLVA との間に大きな差は認められなかったものの、疫学関連が未知の菌株間など詳細な解析の際には、WGS がより高い型別能を有するため有用であることが明らかとなった。国内 O157 の網羅的 WGS 解析からは、解析した国内集団感染事例由来株の clade は 2, 3, 7, および 8 が大部分を占めた。このうち clade 7 においては、亜系統 (subclade) ごとに重症化率が異なっていたため、病原性の違いが示唆された。上記の解析結果をもとに、2019 年に報告された 2 件の国内集団感染事例について WGS 解析をおこなったところ、いずれの事例においても事例内での SNP は 5 か所以内となっていた。また、2020 年に菌株が多数分離された MLVA コМПレックス 3 件を詳細に解析したところ、そのうちの 1 種のコМП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。毎年 70 前後の地衛研から回答を得た。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 3 年間で延べ

63 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。

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。

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。毎年多くの広域株が検出された。中には広域食中毒事例に関する株も含まれた。こうした事例対応に病原体情報が活用された。

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（O157、O26、O111 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ン的に機能するには、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。各ブロックにおいても主たるデータベースを ISPS から MLVA に移行する検討が進められている。

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の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：2017 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 39 巻、81-82、2018 年 5 月
2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について。獣医公衆衛生研究、第 20 巻、6-11、2018 年
3. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2018 年に分離された腸管出血性大腸菌の MLVA 法による解析。IASR、第 40 巻、81-82、2019 年 5 月
4. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析 (MLVA 法) について。食品衛生学雑誌、第 60 号第 1 巻、J-7-8、2019 年 2 月。
5. 泉谷秀昌：広域散発事例探知に向けた取り組み。日本食品微生物学会雑誌、第 36 巻第 1 号、10-12、2019 年。
6. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌～分子疫学解析を利用した病原体サーベイランス。感染制御と予防衛生、第 3 巻第 2 号、75-80、2019 年。
7. 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
8. 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.
9. Lee K, Izumiya H, Iyoda S,

Ohnishi M. Effective surveillance using multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. Appl Environ Microbiol. 2019 Sep 1;85(17).
10.

2) 学会発表等

1. 泉谷秀昌：広域散発事例探知に向けた取り組み。第39回日本食品微生物学会学術総会、2018年9月、大阪府大阪市。

2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌 O157、O26、O111 株の MLVA 解析について。平成 30 年度 地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2018 年 10 月、東京都。

3. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：腸管出血性大腸菌分離株の分子疫学解析状況について、2018 年。第 22 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018 年 11 月、東京都。

4. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学。日本防菌防黴学会第 45 回年次大会、2018 年 11 月、東京都。

5. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA について。平成 30 年度関東甲信静ブロック地域専門家会議、2018 年 12 月、埼玉県。

6. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA 解析。平成 30 年度 希少感染症診断技術研修会、2019 年 2 月、東京都

7. 泉谷秀昌：基礎から分かる MLVA について。平成 30 年度 杉並区「食品衛生監視員研修会」、2019 年 2 月、東京都

8. 李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西

真：WGS 解析による MLVA の評価と効率的腸管出血性大腸菌 O157 サーベイランス手法の確立。第 92 回日本細菌学会総会、2019 年 4 月、北海道札幌市

9. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について。衛生微生物技術協議会第 40 回研究会、2019 年 7 月、熊本県熊本市。

11. 泉谷秀昌：MLVA 法の概要について。令和元年度特別区専門研修「検査技術」、2019 年 9 月、東京都。

12. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌 O157、O26、O111 株の MLVA 解析について。令和元年度 地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2019 年 11 月、東京都。

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

14. 小西典子、原田幸子、尾畑浩魅、河村真保、鈴木淳、貞升健志：2017 年に東京都で発生した Diffuse outbreak と分子疫学解析。第 39 回 食品部生物学会、2018 年 9 月、大阪府

15. 原田幸子、小西典子、尾畑浩魅、河村真保、鈴木康規、鈴木淳、貞升健志：2017 年に発生した腸管出血性大腸菌による散発事例由来株の SNP 解析。第 31 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2019 年 2 月、千葉市

16. 佐藤孝志、松下明子、塚本展子、砂押克彦、福島浩一、倉園貴至：埼玉県で分離された腸管出血性大腸菌の解析に

- ついて—MLVA 法を中心に—。第 31 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2019 年 2 月、千葉市
17. 小西典子、原田幸子、尾畑浩魅、河村真保、山梨敬子、小野明日香、齊木大、前田雅子、赤瀬悟、門間千枝、畠山薫、鈴木淳、貞升健志：2018 年に東京都で分離された腸管出血性大腸菌の特徴と食中毒事例。第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2019 年 11 月、松山市
 18. 小西典子、河村真保、尾畑浩魅、山梨敬子、小野明日香、原田幸子、齊木大、前田雅子、赤瀬悟、門間千枝、畠山薫、鈴木淳、貞升健志：東京都内で発生した腸管出血性大腸菌 O121 による食中毒事例とその検査法。第 31 回日本臨床微生物学会総会学術集会、2020 年 2 月、金沢市
 19. 長岡宏美、大越魁、鈴木香菜、小川紋、水元嗣郎、森主博貴、神田隆、岩佐浩行、山田裕貴、中嶋郁子、岩佐裕子、久川祐稔：Diffuse outbreak が疑われた VT 産生 O145 による胃腸炎事例。第 32 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会、2020 年 2 月さいたま市
 20. 若林友騎、原田哲也、河合高生、高橋佑介、梅川奈央、泉谷秀昌、川津健太郎：単回帰分析を用いた EHEC MLVA のリピート数決定法の検討。第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2019 年 11 月 愛媛県
 21. 若林友騎、高橋佑介、梅川奈央、原田哲也、河原隆二、余野木伸哉、河合高生、川津健太郎：EHEC MLVA 検査体制の確立と大阪府内分離株の解析。令和元年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会、2019 年 11 月和歌山県
 22. 中山志幸、重村洋明、カール由起、江藤良樹、濱崎光宏、世良暢之：福岡県における愛玩動物の *Capnocytophaga* 属菌の保有状況調査。第 71 回日本細菌学会九州支部総会、2018 年 9 月福岡県
 23. 濱崎光宏：病原体検査における精度管理について。第 45 回九州衛生環境技術協議会特別講演、2019 年 10 月長崎県
 24. 杉岡由美子、濱崎光宏、吉田弘：九州ブロック内における遺伝子解析装置に関する技術管理研修について。第 78 回日本公衆衛生学会総会、2019 年 10 月高知県
 25. 濱崎光宏、杉岡由美子、近藤芳樹、吉田弘、調恒明：「検査プロセスの改善（KAIZEN）に向けたワークショップ」の開催について。第 33 回公衆衛生情報研究協議会総会・研究会、2020 年 1 月埼玉県
- 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

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」

平成 30-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 2018-2020 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 749 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 4819 株、026 1624 株、0111 338 株、0103 516 株、0121 298 株、0145 158 株、0165 12 株、091 109 株、計 7874 株を解析し、それぞれ、1824、576、189、140、105、52、12、90 の型が同定された。シンプソンの多様性指数 (SDI) は 0.923-1.00 であった。5 機関以上で検出された広域 MLVA コンプレックスもしくは MLVA 型は 3 年間で 87 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「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」に基づき地研から送付された MLVA データの解析を行い、3 年間で 32 機関からデータを受け、1636 株に型名を付与した。これらの送付データ並びに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因菌の一つである。EHEC 感染症は 3 類感染症に含まれ、毎年 3-4 千名の感染者が発生している。これらの中には複数の自治体を

またいで流行する株、広域株も存在し、その感染源を突き止めることは EHEC 感染症の制御に重要である。また広域株に限らず、個々の事例対応においても感染者から分離された菌株を比較し、その類縁性を明らかにしていくことは必須である。

EHEC 流行菌型の解析、すなわち分子疫学

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

平成30年6月29日に厚生労働省から発出された事務連絡「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2018-2020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

2018-2020年分離株について、2021年2月24日現在の結果を示す。

1. PFGE

749株を解析した（MLVA対象株を除く）。菌株数が多かった血清群は05（8%）、0115（7%）、08（7%）、0113（6%）、0146（5%）、0128（4%）であった。5機関以上に跨る広域株は検出されなかった。2019年に0113及びOUT/0gGp5による、10株以上からなるクラスターがそれぞれ1件検出された。得られた病原体情報をBioNumericsデータベースに登録した。

2. MLVA

7874株を解析した。

各血清群における解析株数、検出された型数、Simpson's Diversity Index（SDI）は以下の通りであった：0157 4819株／1824型／0.998、026 1624株／576型／0.990、0111 338株／189型／0.986、0103 516株／140型／0.944、0121 298株／105型／0.964、0145 158株／52型／0.923、0165 12株／12型／1.00、091 109株／90型／0.996。2株以上を含むMLVA型の各年の検出頻度

は、2018 年が型数で 34%、株数で 74% ; 2019 年が同じく 33%、72% ; 2020 年が同じく 35%、72%であった。2 株以上を含む MLVA 型において、その構成株数の中央値はいずれの年も 3 であった。

主要 3 血清群について、各年に多く検出された型は表 1 に示すとおりであった。

3. 広域株 (5 機関以上で検出された) 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。表 2 に主要血清型において検出された広域 MLVA コンプレックスを、表 3 に同コンプレックスに含まれなかった広域 MLVA 型を示す。(コンプレックス解析は年度ごとに行っているため、以下の結果は年度当時のものである。)

平成 30 年度 : 広域 MLVA コンプレックスは 31 種類 (861 株)、広域 MLVA 型は 6 種類 (58 株) 検出された。集団事例を含む広域株としては、18c002、18c034、18c035 (いずれも 0157 VT1+VT2) があった。

令和 1 年度 : 広域 MLVA コンプレックスは 14 種類 (368 株)、広域 MLVA 型は 14 種類 (132 株) 検出された。集団事例を含む広域株としては 18m0541 (0157 VT1+VT2)、19c201 (026 VT2)、19c058 (0157 VT2) があった。

令和 2 年度 : 広域 MLVA コンプレックスは 13 種類 (291 株)、広域 MLVA 型は 9 種類 (89 株) 検出された。集団事例を含む広域株としては 20c022 (0157 VT1+VT2)、20c041 (0157 VT2) があった。

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 2018-2020 年の間に 32 機関から MLVA データの送付があり、1636 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 1636 株のうち、1016 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

2014 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、集団事例、家族内事例における病原体情報の一致もしくは類似が認められ、本法の事例解析における有

用性が示された。

2株以上検出された MLVA 型はいずれの年も全型の 35%前後であった。これは菌株数にして解析株の 70%以上に相当した。これは、その病原体情報から、大多数の株が互いに何らかの関連性を有する可能性を示唆している。

MLVA の結果は広域株の探知にもつながった。5 地研以上から検出された MLVA コンプレックス/MLVA 型は 3 年間で 87 種類であった。広域株には集団事例関連株も含まれた。

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 型を付与するという新規システムである。本システムにより、より迅速に MLVA 型が付与され、情報共有に生かされることが期待される。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：2017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39巻、81-82、2018年5月

2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について。獣医公衆衛生研究、第20巻、6-11、2018年

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

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

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

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

7. 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

8. 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

1. 泉谷秀昌：広域散発事例探知に向けた取り組み。第39回日本食品微生物学会学術総会、2018年9月、大阪府大阪市。
2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 株の MLVA 解析について。平成30年度地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2018年10月、東京都。
3. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：腸管出血性大腸菌分離株の分子疫学解析状況について、2018年。第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018年11月、東京都。
4. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学。日本防菌防黴学会第45回年次大会、2018年11月、東京都。
5. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA について。平成30年度関東甲信静ブロック地域専門家会議、2018年12月、埼玉県。
6. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA 解析。平成30年度 希少感染症診断技術研修会、2019年2月、東京都
7. 泉谷秀昌：基礎から分かる MLVA について。平成30年度 杉並区「食品衛生監視員研修会」、2019年2月、東京都
8. 李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真：WGS 解析による MLVA の評価と効率的腸管出血性大腸菌 0157 サーベイランス手法の確立。第92回日本細菌学会総会、2019年4月、北海道札幌市
9. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について。衛生微生物技術協議会第40回研究会、2019年7月、熊本県熊本市。
泉谷秀昌：MLVA 法の概要について。令和元

年度特別区専門研修「検査技術」、2019年9月、東京都。

10. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 株の MLVA 解析について。令和元年度地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2019年11月、東京都。
11. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2018年における腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析。第40回日本食品微生物学会学術総会、2019年11月、東京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

表 1. 主要 3 血清群検出数上位の MLVA 型と検出株数 (2018-2020 年)

2018		2019		2020	
18m0241	58	19m2033	45	19m0513	64
18m0126	56	19m2103	37	20m2053	47
17m2165	49	19m0046	35	18m0040	28
15m0436	44	19m0080	34	20m0368	27
16m2062	39	16m0103	32	20m2094	25
18m0192	39	19m0169	32	20m0105	24
13m2040	38	19m0488	25	20m0245	24
18m2062	33	19m3035	24	20m0243	21
18m0196	32	19m0112	23	20m0306	20
16m0039	30	18m0249	22	15m2189	19
		18m0541	22	18m0450	19
				20m0148	19
				20m0186	19

表 2. 広域コンプレックス (2018-2020)

2018			2019			2020年		
コンプレックス	株数	機関	コンプレックス	株数	機関	コンプレックス	株数	機関
18c016	66	29	19c058	60	27	20c030	66	24
18c035	44	27	19c010	38	20	20c022	31	13
18c010	32	18	19c030	32	16	20c041	29	13
18c041	27	17	19c026	24	15	20c019	26	13
18c002	45	15	19c028	34	13	20c023	22	13
18c034	59	14	19c033	17	12	20c028	27	11
18c012	36	12	19c051	13	12	20c010	27	10
18c022	19	12	19c024	17	9	20c026	11	9
18c036	18	11	19c027	16	9	20c036	13	7
18c031	61	9	19c025	12	8	20c020	14	6
18c028	18	9	19c201	47	7	20c034	12	6
18c025	14	9	19c011	32	7	20c045	8	6
18c008	14	9	19c053	14	5	20c003	5	5
18c029	29	8	19c302	12	5			
18c202	28	8						
18c024	20	8						
18c006	16	8						
18c017	15	8						
18c026	13	8						
18c042	10	7						
18c050	9	7						
18c205	89	6						
18c021	18	6						
18c019	15	6						
18c215	40	5						
18c063	33	5						
18c214	30	5						
18c057	17	5						
18c220	12	5						
18c023	8	5						
18c001	6	5						

表 3. 広域 MLVA 型 (2018-2020 年) (上記コンプレックスに含まれるものは除く)

2018			2019			2020		
型	株数	機関	型	株数	機関	型	株数	機関
17m0109	17	9	18m0541	22	13	16m0093	12	10
17m0121	9	6	13m2132	19	8	20m2052	13	6
18m0139	11	5	18m0448	10	7	20m0032	12	6
18m0222	8	5	16m0093	10	6	20m0176	10	6
16m0317	7	5	19m0287	6	6	17m0435	9	6
18m0209	6	5	19m0317	6	6	20m0197	9	6
			19m0128	6	6	20m3009	9	5
			18m0127	6	6	20m0169	9	5
			18m0025	10	5	20m0060	6	5
			18m0442	10	5			
			15m2113	10	5			
			19m0358	6	5			
			19m0152	6	5			
			13m0662	5	5			

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

集団感染調査における全ゲノム配列 (whole genome sequence : WGS) 解析の適応性評価と MLVA のゲノムレベルでの評価を目的に、WGS 解析環境の構築、および 2013 年から 2020 年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 を対象とした WGS 解析を行った。WGS 解析の結果、疫学関連のある株間では 4 か所以内の SNP のみが認められた。この数を基準として MLVA を評価すると、同一 MLVA 型では SNP 解析とはほぼ同一の型別能があったのに対して、1-3 か所以上の座位が異なる MLVA 型の株では、遺伝的に遠い株が含まれることが分かった。また、DNA 複製時のエラーを除去修復する蛋白質をコードする *mutS* に欠失がある場合は、SNP 数が過大に現れるために解析には注意を要することが確認された。以上の結果から、O157 の集団感染の検知能では、WGS と MLVA との間に大きな差は認められなかったものの、疫学関連が未知の菌株間など詳細な解析の際には、WGS がより高い型別能を有するため有用であることが明らかとなった。国内 O157 の網羅的 WGS 解析からは、解析した国内集団感染事例由来株の clade は 2, 3, 7、および 8 が大部分を占めた。このうち clade 7 においては、亜系統 (subclade) ごとに重症化率が異なっていたため、病原性の違いが示唆された。上記の解析結果をもとに、2019 年に報告された 2 件の国内集団感染事例について WGS 解析をおこなったところ、いずれの事例においても事例内での SNP は 5 か所以内となっていた。また、2020 年に菌株が多数分離された MLVA コンプレックス 3 件を詳細に解析したところ、そのうちの 1 種のコンプレックス (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、multilocus 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。そこで、全国サーベイランスで得られた O157 菌株を対象に WGS 解析手法の確立を行った。確立した手法を用いて、まず、主要な集団感染事例の解析を行い、従来法である MLVA との比較を行うとともに、全国サーベイランスへの適応性を評価した。次に、2013 年から 2018 年に分離された主要な MLVA 型 (主に集団感染事例) および 2020 年に分離された MLVA 型 (散发事例株を含む) について、WGS 解析を行い、MLVA と WGS との関係性をより網羅的に究明するとともに、流行型と系統の関連性について解析した。さらに、2019 年および 2020 年に多数の感染者が認められた 5 種の事例について、WGS 解析を行い、実際の集団感染調査への WGS 解析の有効性を評価した。

B. 研究方法

1. WGS 解析手法の確立および評価

2013 年から 2017 年に、大規模な集団感染で分離された MLVA 型および類似型の計 225 株の EHEC O157 株を用いた (表 1)。これらの菌株には、集団感染で得られた代表的な MLVA 型 (index type) およびそれらと 1-3 か所の MLVA 座位が異なる類似型 (single-, double-および triple-locus variants : SLV、DLV および TLV) が含まれる。

各菌株について、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) および Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina) を用いた DNA 抽出および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、MiSeq (illumina) に

よってペアエンドシーケンシング (300-mer×2) を行った。得られたショートリードは、SPAdes や BLAST+ を利用した in-house pipeline によって、*de novo* アセンブルおよび病原性遺伝子等の検出を行った。また、Varscan などを用いた系統解析パイプラインを利用し、single nucleotide polymorphism (SNP) を抽出し、MLVA 型別との比較を行った。

2. 国内分離 O157 菌株の網羅的 WGS 解析

2013 年から 2018 年に国内で分離された O157 計 319 株、および 2020 年に分離された計 202 株の WGS を新たに解読した。これらの菌株は、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) 等の重症例由来株や大規模集団感染事例由来株を中心に選んだ。2020 年分離株については、1 月から 8 月に分離された散发事例由来株も含めた。各菌株について、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行い、Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina) 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、HiSeq (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 と合わせて解析を行った。まず、spades や BLAST+ を利用した in-house pipeline によって、*de novo* アセンブルおよび病原性遺伝子等の検出を行った。次に、系統解析パイプラインを利用し、SNP を抽出し、MLVA 型別との比較を行った。

3. 国内感染事例株の解析

2019 年に全国的に発生した集団感染事例

(事例 A および B、表 2) および 2020 年に多数の菌株が分離された MLVA コンプレックス (20c006、20c020、および 20c022) について上記の方法と同様に WGS 解析を行い、国内株との比較等を行った。

C. 研究結果

1. WGS 解析手法の確立および評価

1.1. *in silico* 型別結果

感染研・細菌第一部で確立されたパイプラインを用いることで、ショートリードの生データから 1 株あたり約 20 分でドラフトゲノムの作製や MLST 等の各種型別を行うことができた。型別の結果、同一集団感染由来株であっても一部の菌株で抗生物質耐性遺伝子の検出や病原プラスミドの脱落が認められた。

1.2. 除去修復遺伝子 (*mutS*) 欠失による SNP への影響

これまでの研究によって、DNA 複製時のエラーを除去修復する蛋白質をコードする遺伝子 (*mutS*) 領域の欠損が数%の株で認められている。*mutS* の欠失や変異は塩基置換速度を速めることが知られている。そこで、全株のドラフトゲノムにおける *mutS* 周辺領域の塩基配列を精査したところ、5 株 (2.2%) で 2-28 kbp の領域が欠失していた (図 1)。これらの株のうち、4 株は疫学関連のある他の菌株が存在したため、それら菌株間の SNP を集計し、median joining tree を作製した (図 2)。この結果、いずれの事例においても、*mutS* 保有株間の SNP は 1-2 か所であったのに対し、*mutS* 欠失株においては 7-15 か所の SNP が存在した。この結果から、*mutS* 欠失株においては同遺伝子保有株に比べて SNP 蓄積速度が速いことが示唆

された。このため、詳細な SNP 解析においては *mutS* 欠失株を除いて行った。

1.3. 疫学関連のある株間での SNP 数の集計結果

疫学関連のある株として、原因食品が共通である場合、同一施設内での集団感染である場合、または同一家族からの分離の場合と定義し、*mutS* 欠失株 5 株を除いた 220 株のうち、疫学関連のある株間での SNP を集計した。その結果、疫学関連のある株間ではすべて 4 か所以内の SNP のみ存在することが判明した。

1.4. MLVA 型別にみた SNP 数の集計結果

mutS 欠失株 5 株を除いた 220 株について、MLVA 型の差異別に SNP を集計したところ、MLVA が同一および SLV の場合、中央値はいずれも 1 か所の SNP であり、大部分 (98.5%) の株間で 10 か所以内の SNP であった (図 3)。DLV および TLV では中央値はそれぞれ 5 及び 30 となり、SNP のばらつきも大きくなっていった。

MLVA グループごとに SNP を集計したところ、大部分の株は代表的な MLVA タイプ (index type) と 5 か所以内の SNP を示すクラスターを形成した。それぞれの MLVA グループでは 2-5 件の疫学関連事例が存在したが、いずれのグループにおいても全ての事例が同一クラスターとなり、相互に関連することが示された (表 1)。さらに多数の散発事例由来株との関連性が認められ、同一の原因由来であることが疑われた。一方で、それぞれのグループで次のような 6 か所以上の SNP を示す株が存在した：グループ G1、TLV の 6 株；グループ G2、SLV の 4 株および TLV の 2 株；グループ G3、なし；グループ G4、DLV の 2 株および TLV

の1株。

2. 国内株の網羅的 WGS 解析

2.1. 国内 EHEC O157 494 株の WGS 解析

計 494 株の O157 の SNP を抽出し、系統解析を行った結果、7 種の clade が認められ、それぞれ次のような株数 (割合) であった: clade 1, 1 株 (0.2%); clade 2, 137 株 (27.8%); clade 3, 169 株 (34.3%); clade 4/5, 2 株 (0.4%); clade 6, 1 株 (0.2%); clade 7, 62 株 (12.6%); clade 8, 119 株 (24.1%)。重症者 (HUS または血便) の割合を算出したところ、clade 間での差異が認められた (表 3)。clade 2 および 3 では 95% 以上が同一の *stx* 型 (*stx1a 2a*) であったが、clade 7 および 8 では多様性が認められたため、*stx* 型毎に重症化率を算出した。その結果、clade 7 (*stx1a* のみ, *stx2a* のみ, *stx2c* のみ, *stx1a 2c* の両方をそれぞれ保有する 4 つのタイプに分かれる; 表 2) では *stx* 型ごとに重症化率が大きく異なり、*stx2a* 保有株、*stx1a 2c* 同時保有株で重症化率が高い傾向であった。Clade 8 では *stx* 型との関連性は見られなかった。

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

国内で 2020 年までに分離された EHEC O157 計 1,146 株の比較結果を図 4 に示す。本解析では散発事例 (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、網羅的に MLVA と SNP 解析の比較を行った。MLVA の差異別に見た SNP の平均値は、同一型、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。

3. 国内感染事例株の解析

3.1. 2019 年集団感染事例の解析

これまでに確立した WGS 解析パイプラインを利用し、2019 年に発生した 2 件の集団感染事例の解析を行った (表 2)。事例 A は、全国的にチェーン展開する飲食店で食中毒として認定された事例であり、食中毒事例以外にも同一 MLVA 型の株が関東以西の全国で分離されていた。これまでサーベイランスで集められた株からは 3 座位違い以内の近縁型は見つかっていなかった。そのため、本 MLVA 型 (18m0541) の 13 株について WGS を解読し、clade 等の *in silico* 解析および国内株との SNP 解析を行った。その結果、同 MLVA 型は *stx1a, 2c* を保有する clade 7 であった。SNP 解析の結果、既存の WGS 解読株との間に近縁な株は見つからず、最も系統的に近い株とは 160 か所以上の SNP が存在した。一方、同一 MLVA 型内では最大 4 か所の SNP が存在した (図 5)。事例 B は、食中毒と認定されなかったものの、飲食店との関連性が疑われる事例で、5 種の MLVA 型からなる MLVA コンプレックスを形成していた (表 2)。そこで、5 種の MLVA 型を含む 23 株について WGS を解読し、事例 A と同様の解析を行った。その結果、供試菌株はいずれも clade 8 に属し、*stx2a, 2c* を保有していた。最も近縁な株とは 40 か所以上の SNP が存在した。同一コンプレックス内での SNP は 0-5 か所であり、同一のクローンであると考えられた。(図 6)

3.2. 2020 年度事例の解析

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 (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。

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 7)。

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 8) (近縁株で再解析を行ったために 10 か所以上の SNP が抽出されている)。

コンプレックス 20c022 は、16m0039 を主な MLVA 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 9)。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 が 5 座位異なる株が含まれていた。

D. 考察

WGS を用いた EHEC 調査の既報では、同一集団事例内では 4-7 か所以内の SNP であることが報告されており、本研究結果と一致した。このことから、O157 ではおおよそ 10 か所以内の SNP の違いであれば、同一の感染源が疑われることが示唆された。ただし、解析方法やサンプルサイズ等によって SNP の数は変動する可能性があり、疫学情報とも併せて判断することが重要であると考えられた。

また、SNP 解析を行う際には *mutS* の有無を確認することが重要であることが判明した。今回用いた株では *mutS* 内の非同義塩基置換や、MutS と協同して除去修復を行う MutL および MutH 遺伝子の変異は認められなかったが、これらの変異についても確認が必要であると考えられる。

MLVA 型別に SNP 数を集計した結果から、一部の例外を除き、同一型および SLV である際にはゲノムレベルでも 10 か所以内の SNP に収まり、遺伝的に非常に近縁であることが明らかとなった。DLV および TLV については、遺伝的に近縁な株と遠縁な株とが混在することが判明した。多数の SNP が

認められたのは、いずれも疫学関連が未知の株間であった。このように、SLV、DLV および TLV のような類似 MLVA 型であっても疫学関連が未知の株間では、WGS 解析によってサーベイランスの精度を向上させる可能性がある。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。

系統解析の結果からは、国内流行株の主な clade は 2, 3, 7, および 8 であることが示された。これは、過去の報告 (Iyoda ら *Open Forum Infect Dis.* 2014 Sep;1(2):ofu061.) と一致している。Clade 7 内には 4 種類の *stx* 型が存在し、clade 内亜系統と関連していた。このうち、clade 7 は比較的病原性が低いとされているが、本解析では clade 7 内の亜系統によって病原性が異なる可能性が示唆された。今後は、亜系統間の病原性の差異を明らかにする必要がある。

2019 年に発生した集団感染事例の解析では、いずれの事例でも同一型または同一コンプレックスの株は SNP 上も同一のクラスターを形成することが示された。先行研究から、疫学関連のある株間での SNP はおよそ 0-7 か所とされており、今回の事例でも供試菌株間の関連性は非常に高いと考えられる。

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、類似 MLVA であっても分離日が離れている株間では、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

本研究によって、WGS による SNP 解析がより高精度なサーベイランスに寄与することが明らかとなった。一方で、MLVA が同一の菌株ではごく少数の SNP のみが認められたことから、MLVA も高い型別能を有することが判明した。MLVA は迅速性や費用面では WGS より有利な点があり、両者を組み合わせた運用を行うことでサーベイランス全体の効率向上に寄与できると考えられた。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で、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

1. Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M.
Effective surveillance using multilocus
variable-number tandem-repeat analysis and
whole-genome sequencing for
enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157.
Appl Environ Microbiol. 2019 Sep 1;85(17).

2) 学会発表

1. 泉谷秀昌, 李 謙一, 石嶋 希, 伊豫田 淳,
大西 真; 腸管出血性大腸菌分離株の分子
疫学解析状況について 第22回腸管出血性
大腸菌感染症研究会、東京、2018年

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. 使用菌株数と MLVA 型

MLVA group	Index MLVA type	No. of epi-linked cases	No. of isolates			
			Same ^a	SLV	DLV	TLV
G1	13m0551	4	56	10	1	7
G2	15m0278	3	39	9	0	2
G3	16m0110	2	26	2	0	0
G4	17m0121	5	41	6	24	2

^aSame, same MLVA type as the index type; SLV, single locus variant; DLV, double locus variant; TLV, triple locus variant

表 2. 使用菌株

事例	ID	疫学情報	MLVA型
事例A			
	A01	散発	18m0541
	A02	散発	18m0541
	A03	散発	18m0541
	A04	散発	18m0541
	A05	なし	18m0541
	A06	散発	18m0541
	A07	店舗A	18m0541
	A08	店舗A	18m0541
	A09	店舗A	18m0541
	A10	散発	18m0541
	A11	散発	18m0541
	A12	散発	18m0541
	A13	店舗A	18m0541
事例B			
	B01	店舗B	19m0506
	B02	店舗B	19m0506
	B03	店舗B	19m0488
	B04	店舗B	19m0487
	B05	店舗B	19m0488
	B06	店舗B	19m0487
	B07	店舗B	19m0506
	B08	店舗B	19m0488
	B09	店舗B	19m0508
	B10	店舗B	19m0509
	B11	食品	19m0488
	B12	店舗B	19m0487
	B13	店舗B	19m0506
	B14	店舗B	19m0506
	B15	店舗B	19m0487
	B16	散発	19m0488
	B17	店舗B	19m0487
	B18	店舗B	19m0487
	B19	散発	19m0487
	B20	散発	19m0487
	B21	散発	19m0508
	B22	散発	19m0488
	B23	散発	19m0506

表 3. 解析菌株の clade および stx 型と重症化率の関連性

Clade	stx type	株数	BD_HUS	
			株数	%
1		1	1	100
2		137	78	56.9
3		171	108	63.2
4/5		2	0	0
6		1	1	100
7		62	27	43.5
	1a2c	21	13	61.9
	2a	14	8	57.1
	2c	26	5	19.2
	1a	1	1	100
8		115	80	69.6
	2a	68	44	64.7
	2c	32	22	68.8
	1a2c	1	0	0
	2a,2c	18	14	77.8

BD: Bloody diarrhea

HUS: Hemolytic uremic syndrome

図 1. *mutS* 周辺領域の欠失状況

矢印は遺伝子の方向、番号は菌株番号を示す。矢印の白抜き部分は該当領域の欠失を示す。

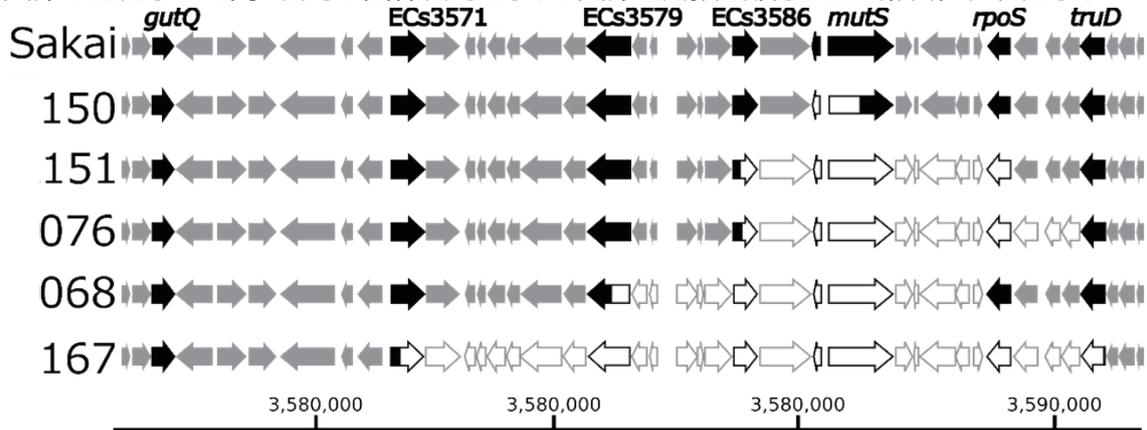


図 2. *mutS* 欠失株および関連株の SNP による median joining tree

A、B および C の図はそれぞれ別の事例を示す。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。

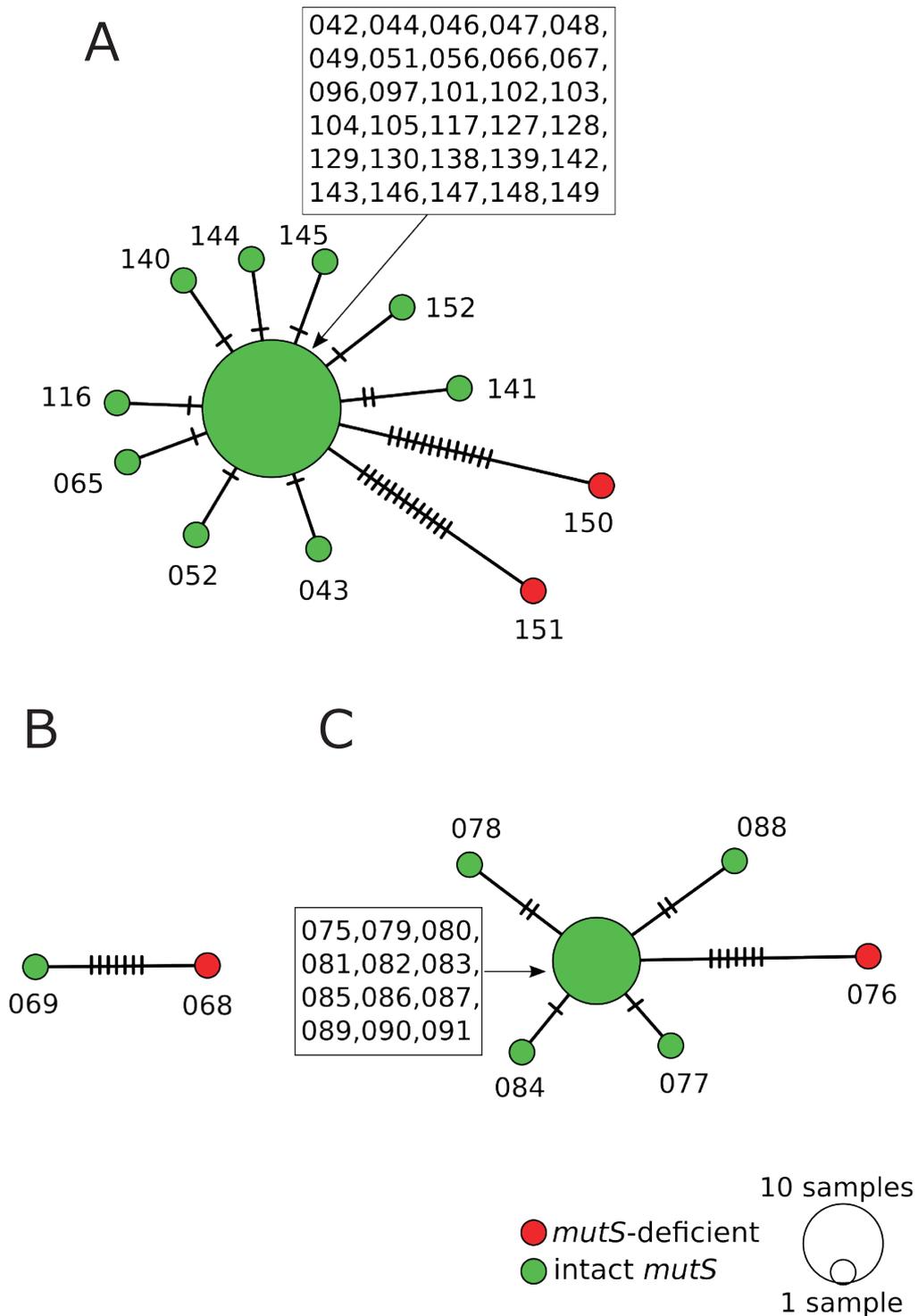


図 3. MLVA 型別の SNP を集計した箱ひげ図

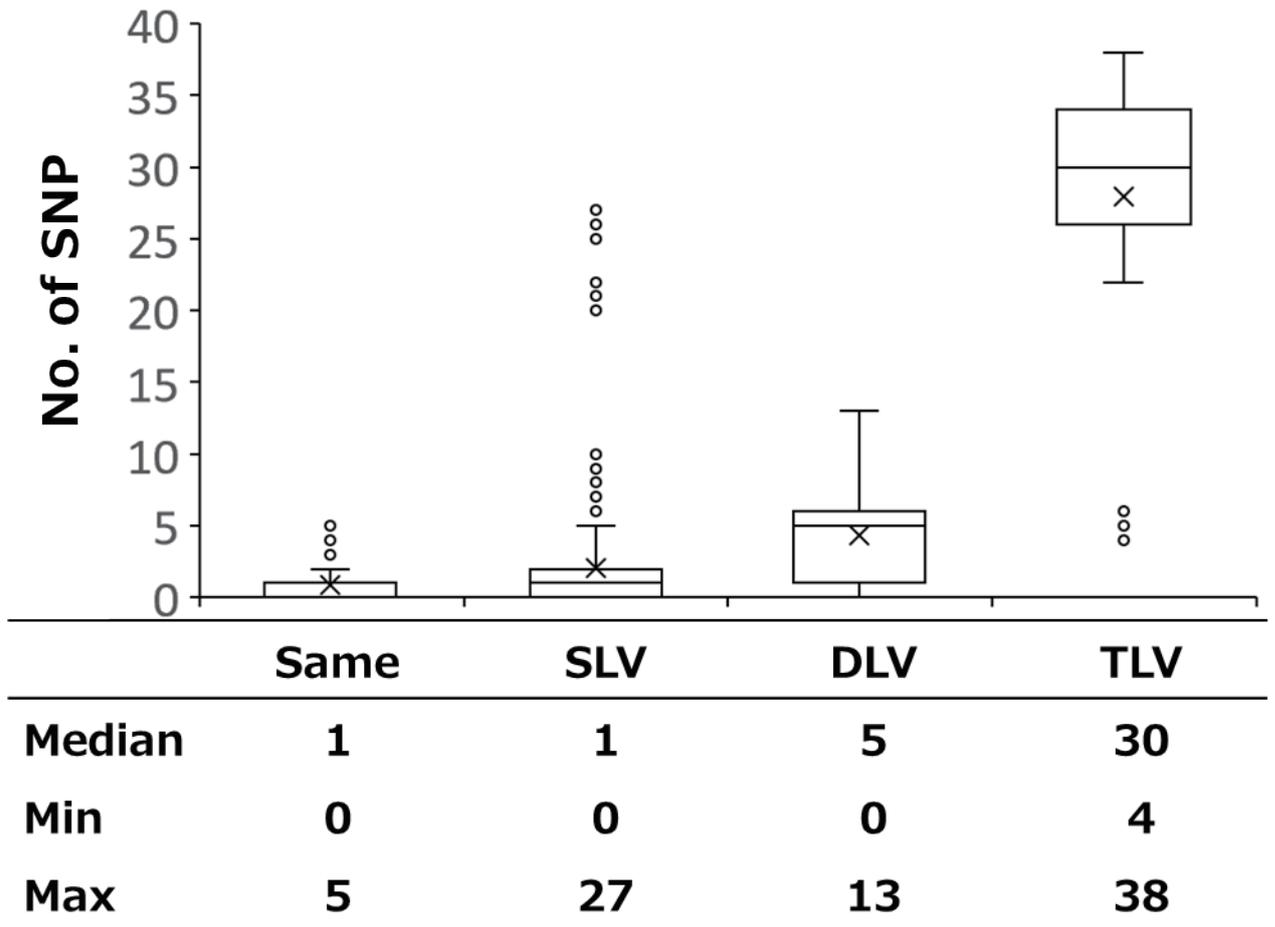


図 4. MLVA と SNP の関連性

Locus variant (LV) ごとの SNP 数を箱ひげ図で示す。

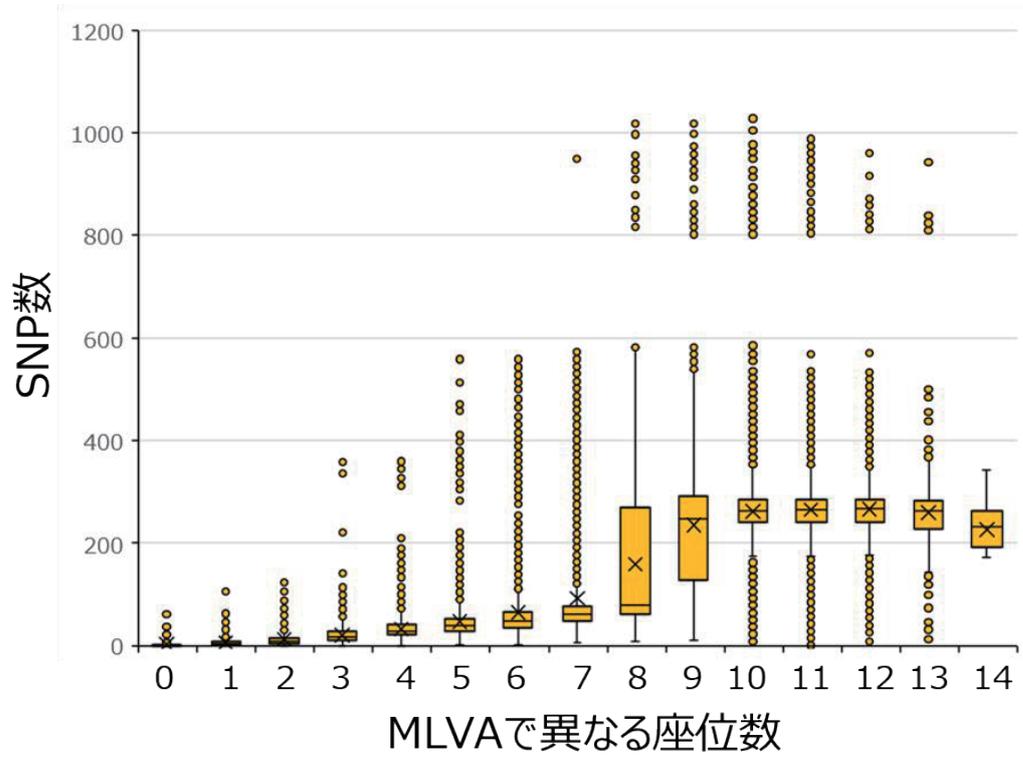


図 5. 事例 A における供試菌株の median joining tree

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、分離元の自治体を示す。

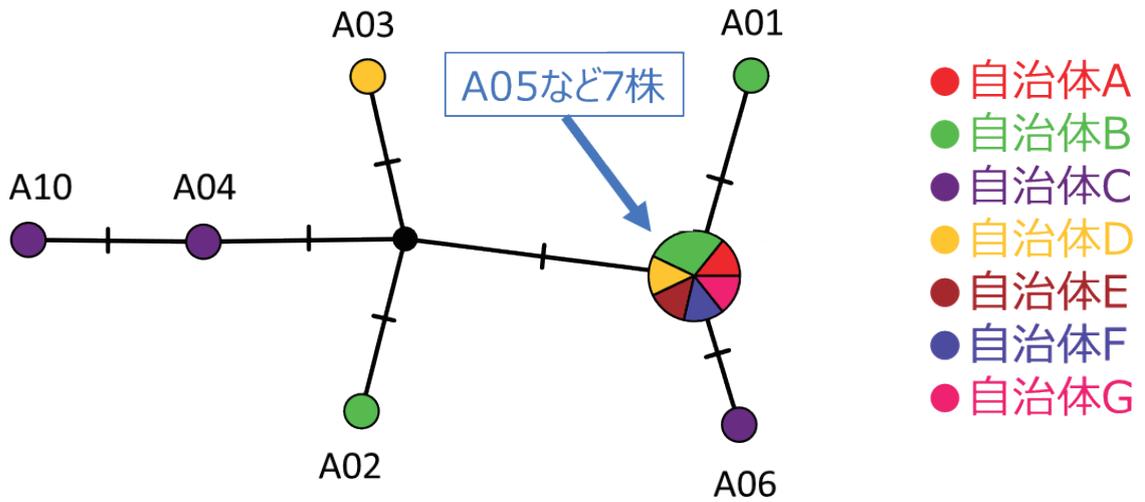


図 6. 事例 B における供試菌株の median joining tree

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、由来（左図）および MLVA 型（右図）を示す。

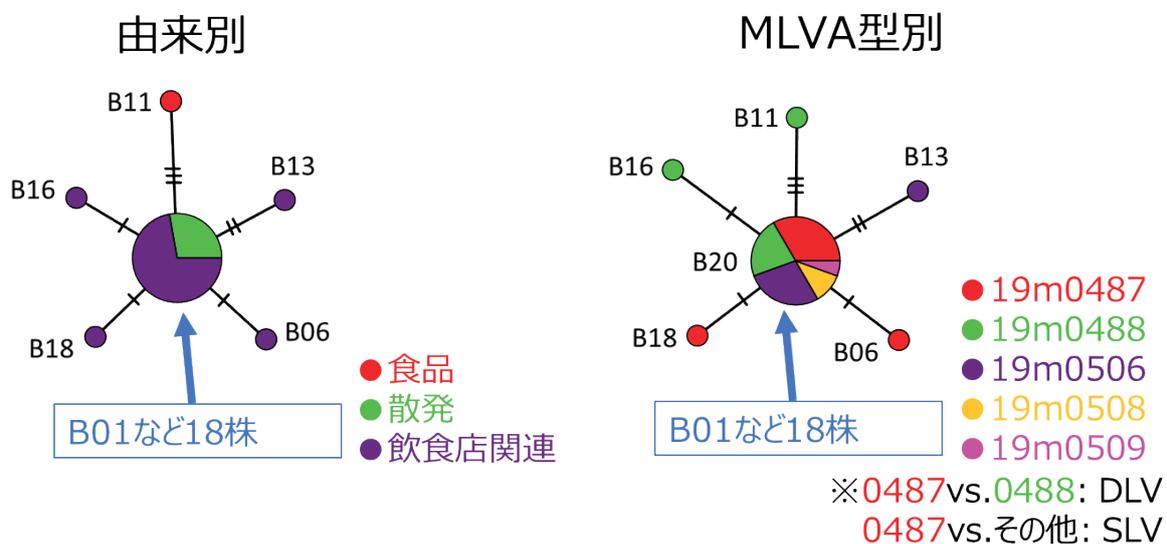


図 7. 20c006 における供試菌株の median joining tree

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。

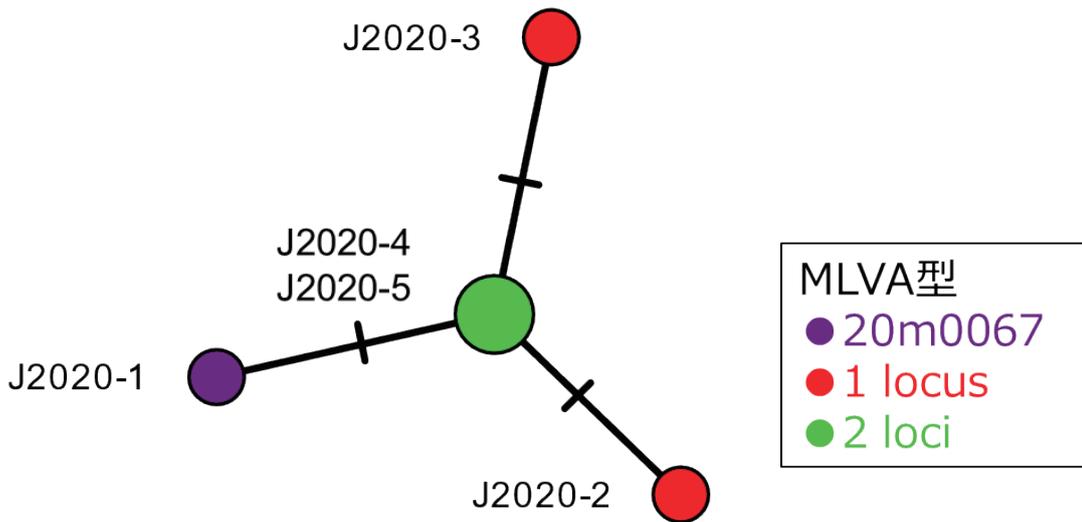


図 8. 20c020 における供試菌株の median joining tree

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。

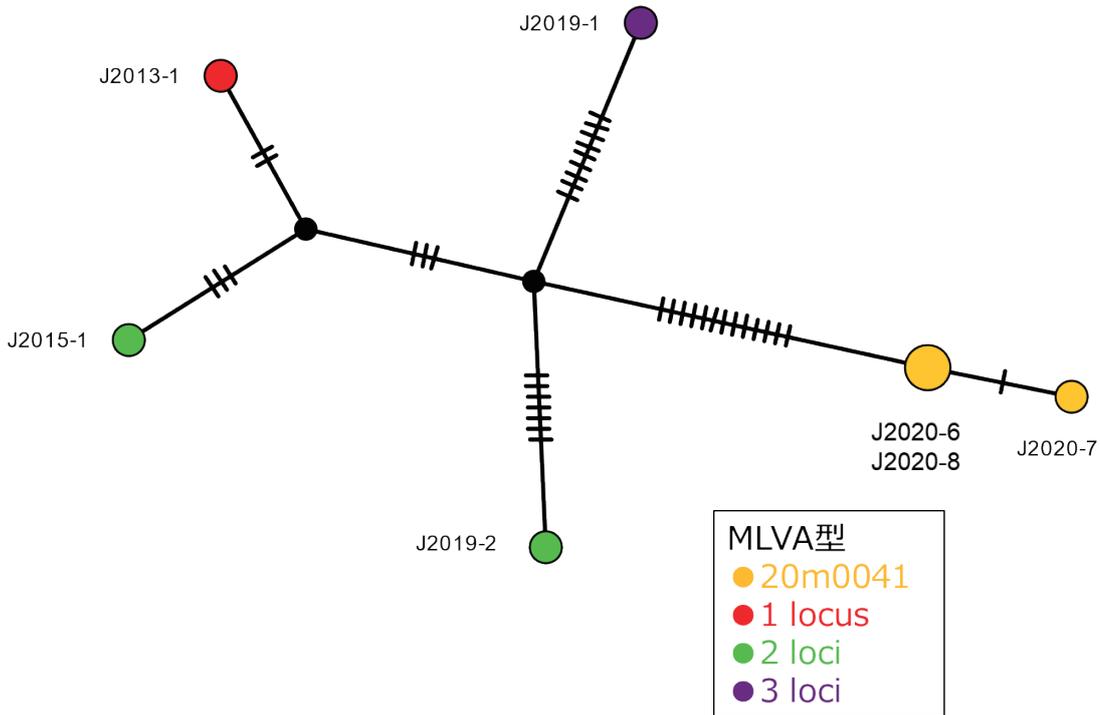
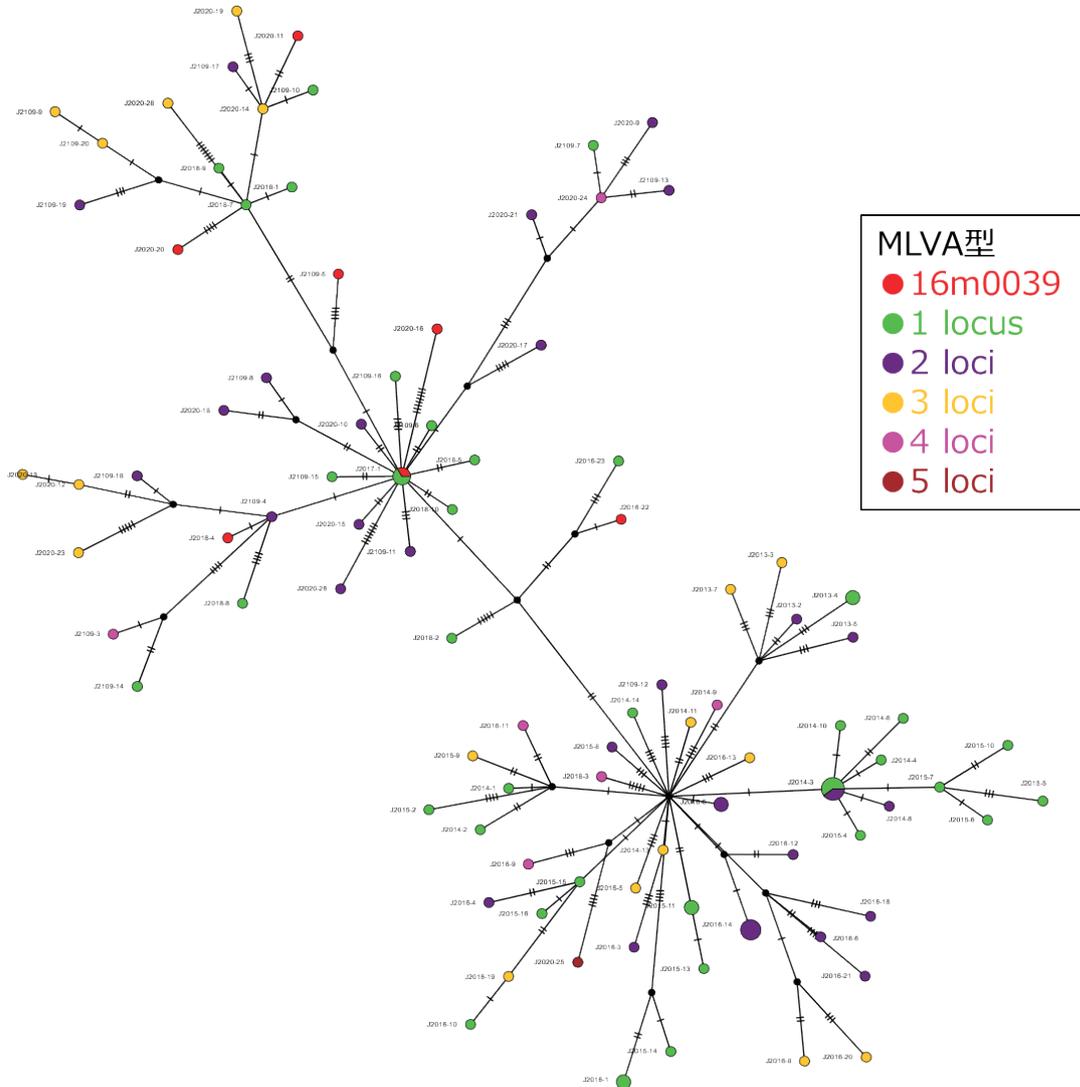


図 9. 20c022 における供試菌株の median joining tree

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）

平成 30 年度～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、小川恵子、三津橋和也	北海道立衛生研究所
	尾島拓也、石黒真琴	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上剛志、高橋洋平	青森県環境保健センター
	武差愛美、橋本恭奈	青森県環境保健センター
	熊谷優子、今野貴之、樫尾拓子	秋田県健康環境センター
	藤森亜紀子、山下裕紀	岩手県環境保健研究センター
	田中静佳、瀬戸順次	山形県衛生研究所
	山口友美、山谷聡子、木村葉子	宮城県保健環境センター
	山田香織、大下美穂	仙台市衛生研究所
	菊地理慧、賀澤 優	福島県衛生研究所
	木村有紀、青木順子	新潟県保健環境科学研究所
	山本一成 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されたが、平成 30 年度当時、MLVA 導入は過渡期にあり、ブロック内の MLVA 実施の地方衛生研究所（以降、地衛研）は 12 施設のうち 3 施設であった。ブロック内の地衛研の MLVA 導入に寄与すべく、平成 30 年度、令和元年度に MLVA 解析に必須のフラグメント解析用ソフトウェア GeneMapper の操作に重点を置いた「腸管出血性大腸菌（以降、EHEC）MLVA 技術研修会」を開催した。令和 2 年 12 月現在、ブロック内地衛研では、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。また、標記研修会では、PFGE、IP-PS も含めた EHEC 解析データの運用方法や MLVA 実施に伴う疑問などについて情報共有を図っており、令和元年度には、トラブルシューティング集として「EHEC MLVA フラグメント解析判定事例集」を作成した。令和 2 年度については、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、新型コロナウイルス感染症に配慮して地全協（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。

導入した分子疫学解析 MLVA について結果の信頼性を確保するため、ブロック内に

において精度管理を令和元年度から実施している。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、多くの地衛研で判定に苦慮する「低いピーク」が改善されたと報告があり、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、安定した条件のひとつとして検討されると考えられた。

A. 研究目的

平成 30 年 6 月 29 日付けで厚生労働省から発出された事務連絡により、地衛研による EHEC の分子疫学解析法は MLVA 法に統一化する方向性が示されたが、平成 30 年当時、ブロック内の 12 機関において、実施しているのは 3 機関、実施を予定しているのは 5 機関であった。MLVA 導入にはシークエンサーが必要であるほか、「フラグメント解析ソフト GeneMapper」の習得が必要であることから、GeneMapper で解析作業ができることを目標とした、MLVA 技術研修会を開催した。併せて、ブロック内の EHEC 担当者の連携を深め、情報を共有するため、事例報告及び検査法についての情報提供等を行った。

また、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。

B 研究方法

平成 30 年度-----

1. 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会の開催

平成 30 年 11 月 15 日、16 日の 2 日間、岩手県環境保健研究センターで、8 地衛研 10 名が参加して行われた

1) ライフテクノロジーズジャパンの講

師による「GeneMapper」の講義とパソコン実習

2) 国立感染症研究所 泉谷先生の講演

3) 9 地衛研から「MLVA 法検査状況及び MLVA 法を含む分子疫学解析結果の運用状況について」情報提供

令和元年度-----

1. MLVA の精度管理の実施

7 施設が参加。試料は、岩手県内で 2018 年～2019 年に分離した EHEC4 菌株の DNA 抽出液（抽出キット使用、濃度は $1\text{ng}/\mu\text{L}$ ①O157VT1VT2、②O157VT2、③O26VT1、④O111VT1）を参加希望の施設に送付した。各施設で実施している方法で MLVA を実施し、各 17 遺伝子座の繰り返し配列数を報告することとした。各施設の結果を感染研の結果と比較することで解析した。

MLVA に使用する試薬や機器、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。

2. 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会の開催

令和 2 年 1 月 16、17 日の 2 日間、岩手県環境保健研究センターで、10 地衛研 11 名が参加して行われた。

1) ライフテクノロジーズジャパン

の講師による、GeneMapper を用いた MLVA データ解析の講義とパソコン上での実習を行った。

- 2) 感染研 泉谷先生の講演
- 3) 精度管理の結果の報告
- 4) 事例発表

O157VT2 による広域事例において、原因食品と推定されたシマチョウの検査を実施した新潟市衛生環境研究所 と仙台市衛生研究所から事例発表があった。

MLVA を実施し、判定に苦慮する 6 事例を経験した北海道立衛生研究所から報告があった。

令和 2 年度-----

1. MLVA の精度管理の実施

7 施設が参加。試料は、岩手県内で 2020 年に分離された EHEC4 菌株の DNA 抽出液（抽出キット使用、濃度は 6~11ng/ μ L①O157VT1VT2、②O157VT2、③O26VT1、④O111VT1）を参加希望の施設に宅配で送付した。なお、参加しない MLVA 導入予定の 2 地衛研にも確認用の試料として送付した。精度管理の検査方法は、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。各施設の結果を感染研の結果と比較することで解析した。

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。

2. 第 1 回 EHEC 担当者 Web 研修会の開催

令和 2 年 12 月 2 日、全地協 Webex 会議室において 9 地衛研 14 名が参加して行われた。

- 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（別紙 1）
- 2) 北海道立衛生研究所からの報告で、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

3. 第 2 回 EHEC 担当者 Web 研修会の開催

令和 3 年 1 月 28 日、全地協 Webex 会議室において 11 地衛研 18 名参加して行われた。

- 1) 感染研 泉谷先生の講演
- 2) 事例発表
岩手県環境保健研究センターから、散発発生した O103VT1 による EHEC 感染症について、北海道立衛生研究所から、 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事例発表があった。
- 3) アンケート結果報告
仙台市において、EHEC 増菌培地の VT 遺伝子スクリーニング PCR で VT1(+)/VT2(-)であったが、分離された菌株は VT1(+)/VT2(+)という事例があり、増菌培養液の DNA 抽出法やプライマーについて検討したが、簡単

に安価にできる解決策がなく、DNA抽出法等についてアンケートを実施しており、事例の説明とアンケートの結果報告を行ったものである。

C. 研究結果

1. 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修

平成 30 年度及び令和元年に開催した。講師はライフテクノロジーズジャパンテクニカルサポートに依頼した。実際に GeneMapper がダウンロードされた PC を使い、Panel.txt 及び

Bin.txt ファイルをインポートし

AnalysisMethod を作成し、フラグメントデータを使って実際に解析してみるとという一連の作業について実習した。これから導入する地衛研においては、GeneMapper による解析ができるようになる機会に、実際に解析している地衛研においては、トラブルシューティングについて研修できる機会となった。

2. MLVA 精度管理

1) 平成元年度の結果

試料①O157VT1VT2 については 7 施設が感染研の結果と一致した。試料②O157VT2 の遺伝子座 O157-34 で、試料③O26VT1 と④O111VT1 の遺伝子座 O157-34 と遺伝子座 O157-9 で、ピーク検出閾値以下 (100 と設定) であったため「-2 (ピークなし)」とし、感染研の結果と一致しない施設が 1 か所あった。

2) 令和 2 年度の結果

試料①O157VT1VT2、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 との回答で、6 施設は「-2 (ピーク無)」と報告が異なっていた。感染研の結果は、「-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。

いずれについても、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。

3. 地衛研からの情報提供・事例発表等

研修会等を通じて、事例や MLVA 等 EHEC 全般に係る問題点や課題について情報共有が図られた。さらに、ブロック内で、PCR 試薬の検討を行った。EHEC MLVA フラグメント解析に係るトラブルシューティング集 (別紙 2) を作成したり、問題解決のための連携が図られた。

D. 考察

MLVA 精度管理は、2 年実施し、ほとんどの施設で感染研と一致する結果となったが、検出されるべきピークが「低いピーク」であったため「-2」とした例と、ピークの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例があり、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。

令和元年度の 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情報提供が感染研からあり、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令和 2 年度の第 1 回 Web 研修会で報告があった。仙台市衛生研究所からも、3つの試薬を比較し、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。このことから、増幅効率の高い PCR 試薬 (Thermo Platinum Multiplex PCR kit) が検討されていくと考えられた。

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、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。

なお、菌株解析の結果、解析データから検出された 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。広域発生事例の早期検出のため、菌株が地衛研に収集されるまでの時間の短縮が必要と考えられる。検査機関 (検査センターや医療機関) 向けに情報提供するパンフレット等を考えていきたい。

また、ブロック内では導入予定も含めて 9 施設で MLVA 解析が可能となって

いる。今後は、MinimumSpanningTree などの系統樹作成などの研修会を開催したいと考えている。

F. 健康危険情報

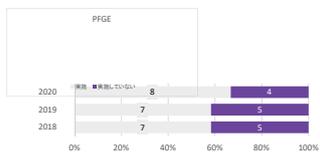
なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

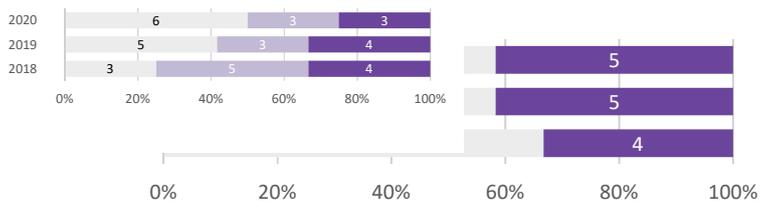
なし



法実施状況 2018-2020年



PFGE	2018年	2019年	2020年
実施	7	7	8
実施していない	5	5	4
IS-PS	2018年	2019年	2020年
実施	8	7	7
実施していない	4	5	5
MLVA	2018年	2019年	2020年
実施	3	5	6
導入予定	5	3	3
実施していない	4	4	3



		2018	2019	2020	回答数
PFGE	実施している	7	7	8	12
	全株	1	1	1	
	一部	6	6	7	
	実施していない	5	5	4	
IS-PS	実施している	8	7	6	12
	全株	2	1	1	
	一部	6	6	5	
	実施していない	4	5	5	
MLVA(O157,O26,O111)	実施している	3	5	6	12
	全株	2	5	6	
	一部	1	0	0	
	実施していない	9	7	6	
	運用に向け試験中、検討中、導入予定	5	3	3	

EHEC MLVA法 フラグメント解析 判定事例集

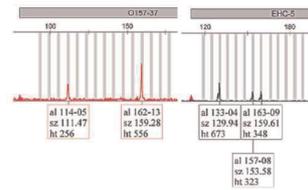
1領域に複数のピークがある

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xL

現象

➢1マーカ領域に2本以上のピークがある

<例>



対応

➢原則、最も高いピークを採用
左例: リピート数13, 右例: リピート数4
➢複数ピークがある旨を備考欄に記載

左例: ピーク2本あり (5/13), 13の方が高い

*同一株を試験しても、施設によってピークの高さが変わることがある (高さの比率はあまり変わらない)

*ピークの高さが同程度であった場合は、試験ごとにピークの高さが変化し、採用するピークが変わることがあるため、奇数回試験して採用回数が多い方を選択する

*複数のピークが出ることは、概ね O157-9, EHC-5, EHC-6, O157-37である

*PCRにおける増幅ターゲットが2カ所以上あることによるものと考えられる

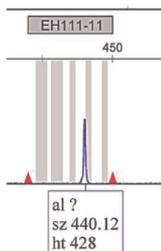
ピークがBinからずれている

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xL

現象

➢ピークがBinからずれて、アレル(al)が『?』になる

<例>



対応

➢一番近いBinを採用する

例: リピート数『4』, と採用する

➢BinとBinのちょうど中間にピークが存在する場合は、必要に応じてsingle PCRを実施する

*ポリマーやバッファ等の消耗品の劣化によって、泳動速度が変化しした可能性があるため、必要に応じて消耗品を交換すること

*リピート数が既知の株を試験して、同様なずれがあるかチェックする

*毎回同程度のずれが生じる際は、必要に応じてBinを調整すること

*EH157-12, EH111-11のピークは、ずれやすい傾向がある

*通常 Binを用いてリピート数を算出している施設が理論上の計算式で算出する場合には、既知の株で正しい値が出ることを確認すること

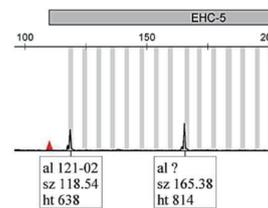
1領域に複数のピーク+Binからずれている

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xL

現象

➢1領域に複数のピークがあり、一部あるいはすべてのピークがBinからピークがずれてアレル(al)が『?』になる

<例>



対応

➢原則一番高いピークを採用
➢採用するピークがBinからずれている場合は、Binからずれたケースと同様に対応

例: リピート数10,

備考として「2本のピークあり(2/10), 10の方が高い, 10はBinからずれていた」

※内部用としての記載。

感染研に送付する際は「2, 10の2本のピークあり」でよいとのこと

他に比べて極端に低いピークがある

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xL

現象

➢他に比べてピークが著しく低い

<例>



対応

➢ピークが必ず出る領域が確認

99%以上の確率でピークが出る領域↓

EH111-11, EH111-8, EH157-12, EHC-1, EHC-2, O157-34, O157-25, O157-19

➢必ず出る領域であればPCR増幅が上手くいっていないか、PCR産物を希釈しすぎている

➢この場合、高さが100以下であっても採用可

*初期検討の段階で、一番高いピークが10000~20000程度に収まるような希釈倍率を検討すること

*EH111-8, O157-34, O157-9はピークが低い傾向

*ピークの高さは、ThermoのPlatinum Multiplex PCR kitで概ね改善する傾向がある (特にEH111-8)

マーカ外と思われるピークがある

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xL

現象

➢必ず出る領域にピークがなく、次の領域に2本ピークがある

<例>



対応

➢必ずピークが出る領域、複数ピークが出る領域を把握しておく

例:

EHC-2には、ピークが複数出ないため、2本のうちの1本はEHC-1のピークである

↓

2本のうち、EHC-2のBinからずれていて、かつそのサイズがEHC-1の最終Binのサイズにリピートサイズを足していったもの (Binの範囲を考慮した上で) になるのか確認する

↓

208 bp (EHC-1の最終Bin, リピート数23のサイズ)

+ 6 bp (リピートサイズ) x 5回 = 238(237.1~238.9)

⇒ リピート数28 (23+5)

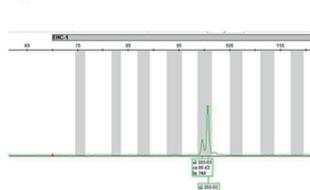
二つに割れたピークの対処法

事例報告日 2020/03/09
報告機関 岩手県
報告者 岩淵智樹
使用機器 ABI 3500xL

現象

➢二つに割れたピークがでる

<例>



対応

➢-A/+Aピークであるため、どちらも本物のピーク

*多くのDNAポリメラーゼの性質により、3'末端にアデニン(A)を付加する性質があるが、5'末端の配列に依存して、Aの付加効率が変化するため、-A/+Aピークが検出される。

【対処法】

*リバープライマーの5'末端側に、Tail配列(7塩基:配列非公開)を付加したプライマーを使用→Aの付加を誘導し、+Aの断片を増幅

*蛍光プライマー購入時にTail配列プライマーを購入しなければならない

*その場合、感染研のBinとPanelは修正しなければならない

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

平成 30～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	山城彩花、石川加奈子
	栃木県保健環境センター	水越文徳、江原 栞
	群馬県衛生環境研究所	河合優子、大場浩美、中野剛志
	埼玉県衛生研究所	佐藤孝志
	千葉県衛生研究所	横山栄二、榎本啓吾、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	井川由樹子、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、尾畑浩魅、齋木 大 原田幸子、平井昭彦

研究要旨

異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要なことから、腸管出血性大腸菌 O157 共通菌株を用いた分子疫学解析法の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。PFGE 法、IS 法および MLVA 法について実施した結果、すべての施設で良好な結果であった。

この 3 年間に 11 施設すべてで MLVA による行政検査が実施可能となり、必要に応じて他の自治体間との情報共有と散発事例に対応してきたことがアンケート調査で明らかとなった。その一方で、現状では MLVA は O157、O26、O111 の 3 血清型の解析方法であることから、これまで実施してきた PFGE による精度管理も引き続き必要であるという意見がすべての施設から挙げられた。

3 年間に東京都で検査を実施した腸管出血性大腸菌 1131 株の血清型において、O157 が 733 株（64.8%）と最多で、次いで O26 が 118 株（10.4%）、O121 が 75 株（6.6%）であった。MLVA が実施可能な主要 3 血清型の割合は 76.7%（868 株）で、今後 O121 および O103 においても MLVA が可能となれば、全体の約 90%において効率的な情報の共有化が可能となると思われた。

A. 研究目的

食品媒介感染症が発生した際に最も重要なことは、感染源・感染経路の早期解明と感染拡大防止である。腸管出血性大腸菌（EHEC）やサルモネラによる食中毒では、散発的集団発生が問題となる可能性があることから、早期解明は重要である。感染経路や原因食材・食品を特定するためには、患者や調理従事者、食材・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。EHEC の解析には、パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法、IS-printing System（IS）法や multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法等が用いられている。

複数の自治体で患者が発生した場合や、他自治体で実施した検査で食品等から菌が分離された場合などは、各地方衛生研究所で分離株の解析を実施し、その検査結果を相互に比較して関連性を判定する必要がある。異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要である。また近年は地衛研の職員も、異動により部署が変わることが多くあることから、技術水準を一定以上に保つ取組みが必要とされている。このことから、各地衛研の技術向上と技術水準を一定以上に保つことを目的として、共通菌株を用いた定期的な精度管理調査を実施した。

さらに、分子疫学解析を用いた病原体解析の現状と今後の方向性についての検討資料とすることを目的に、解析事例について情報収集すると共に、MLVA の実施状況や MLVA を実施する上での問題点についてアンケート調査を行った。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株を関東ブロックの 11 施設に送付し、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の精度管理を行った。なお、いずれの方法の精度管理も、各施設における検査の実情を考慮し、各検査法について希望参加型とした。

1) 供試菌株

平成 30 年度および令和元年度は、東京都内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 を 4 株用い、さらに令和 2 年度では O26 を 1 株追加した。また、3 年間で精度管理に供試した 4 株の O157 は同一のものを使用し、特に MLVA の検査手技の定着を確認できるようにした。

2) PFGE 法

国立感染症研究所のプロトコールに従って PFGE 法を行い、撮影した写真をファイル化しメール添付で送付後、目視で比較することにより解析を行った。

3) IS 法

キット付属のプロトコールに従って IS 法を行い、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、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。

2. 分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査

PFGE 法、IS 法および MLVA 法の実施状況について、関東ブロック内の研究協力施設へアンケートを行った。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 反応を行う上でのマスターミックスの種類、PCR 産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。

3. 集団事例、散発事例など、分離された菌株を対象に分子疫学解析を実施した事例についての情報収集

関東ブロック内の研究協力施設で経験した分子疫学解析が活用された事例について、情報収集を行った。また、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。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理結果

1) PFGE 法

関東ブロック 9～11 施設で、共通菌株について PFGE 解析を実施し、PFGE 画像ファイルを用いて各施設の比較を行った。0157 の 4 株に関しては、一部では低分子量のバンドが若干不鮮明な施設が認められたが、いずれの施設ともバンドの分離は良好であった。しかしながら、3 年目に実施した 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 1）。

2) IS 法

IS 法の解析を実施した結果、1st primer set では菌株 No.1 および 3 において分子量の大きい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（2020 年）であった。また菌株 No.2 の 2 番目と 3 番目のバンドの間にあるエキストラバンドおよび 14 番目と 15 番目の間に存在するエキストラバンドの報告があった施設はそれぞれ 8 施設および 7 施設であった。特徴的なエキストラバンドを報告していなかった施設が数施設あったが、3 年間ともいずれも良好な結果であった。

また、2nd primer set では、1, 2 年目ではいくつかのエキストラバンドが確認された施設が複数存在したが、3 年目ではすべての施設で結果が一致し、手技の定着が確認できた（写真 2）。

3) MLVA 法

関東ブロック 9～10 施設が MLVA の精度管理を実施した。No.1 の菌株に関しては、3 年間ともすべての施設で結果が一致した。No.2 及び 3 の菌株は、1, 2 年目は 17 領域中 1 領域だけ異なっていた施設が各年 1 施設で認められたが、3 年目にはすべての施設で一致した結果が得られた。その一方で、菌株 No.4 では、17 領域中 1 領域の違いが 4～5 施設で認められたが、概ね一致した成績が得られた。また、最終年に実施した O26 については、全ての施設で一致した結果が得られた（表 1）。

各施設で得られたピークの高さと PCR 産物の希釈倍数を報告してもらい比較した結果、いずれの菌株でも高いピークは 30,000 以上を示す施設がある一方、低いピークでは 100 程度であった。この様に判定する際のピークの高さには施設間で違いが認めら

れた。

2. 分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査

関東ブロック 11 施設を対象に、各年、遺伝子解析法実施状況に関するアンケート調査を実施した。

PFGE 解析および IS 法に関しては、従来から実施していたこともあり、当初、11 施設中 8~10 施設で実施していたが、MLVA 導入が進むにつれて、IS 法の実施施設が減少していることが明らかとなった。

MLVA 法においては、当初、11 施設中 9 施設で実施されており、実施 9 施設中 6 施設では全数の解析を行っていたが、年々、全数の解析を実施する施設が増加していることが明らかとなり、これまで以上に MLVA の精度管理の必要性が求められる結果となった (図 1)。MLVA 法における 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、コロニーダイレクトが 1 施設であった。また、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、施設間でさまざまであった。

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、最多が成績書を作成し報告との回答が 7 施設から得られ、電話連絡に留めている施設が 2 施設であった。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) があつた場合に報告との回答が 1 施設から得られた。

3 血清群以外は PFGE を実施していることや技術継承や結果判定における精度管理が必要であること、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。

3. 集団事例、散発事例など、分離された菌株を対象に分子疫学解析を実施した事例についての情報収集結果

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

3 年間に東京都で検査を実施した腸管出血性大腸菌 1131 株の血清型は、最多は O157 が 733 株 (64.8%)、次いで O26 が 118 株 (10.4%)、O121 が 75 株 (6.6%) であつた (表 2)。うち 2018 年に食中毒と断定されたのは O157 が 6 事例、O121 が 1 事例、2019 年では、O157 が 4 事例、O103 が 1 事例、2020 年は O157 が 1 事例と 3 年間で 13 事例であつた。また、OUT (血清型別不能) であつたものが、2018 年は 17 株 (3.6%)、2019 年は 24 株 (6.8%)、2020 年は 28 株 (9.2%) と年々増加する傾向が認められた。

MLVA が有効に活用されたものとして、2018 年に発生した O157 (VT1&2 産生) では都内ホテル A のbuffet利用者 194 名の

集団食中毒において MLVA 型が 18m0192 と確定された事例があったが、その後、同一 MLVA 型が他のホテル従業員からも検出された。このホテル従業員は、ホテル A のbuffetを利用していなかったことから、両施設で使用されていた食材が原因と推定され MLVA により原因究明が容易になった事例を経験した。

その一方で、MLVA だけではなく、PFGE 等の他の解析方法も活用し、有用な疫学情報となった事例として、2019 年に焼肉店利用者 60 名から O157 が検出される事例が発生した。O157 検出者は少なくとも 27 自治体から報告され、散発的集団発生が疑われた。関東ブロックの 6 地方衛生研究所でも患者が確認されていることから、該当施設で IS 法および PFGE 法を実施し比較を行った。東京都は患者 3 名由来株と食品 1 検体から分離された 16 株を供試した。6 地研から検出された 28 株の疫学解析結果から PFGE および IS 法の結果は全て一致したが、MLVA 型が 1~2 領域異なっていた。聞き取り調査等の結果も併せて同一クローン由来株であると推定されたが、MLVA 法は PFGE 法や IS 法に比べて多様性を示しやすい傾向があることから、必要に応じて PFGE 法、IS 法と併せることでの確かな判断が可能となった事例も認められた。

2) 他の自治体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

2018 年に腸管出血性大腸菌による横浜市管内の食中毒の調査において、MLVA 型が一致もしくは 1 遺伝子座違いであった場合に、行動や症状等の他の疫学情報と併せて食中毒の判断を行ったものが 3 事例あった。いずれも EHEC O157 (VT1&2 産生) が原因菌であった。

2019 年には千葉県における腸管出血性大腸菌による集団食中毒事例において、O 群不明である株に対し、PFGE 解析を行い、集団食中毒事例のクラスターに分類できた事例を経験した。搬入された菌株は、36 株が O103 (VT1) で、3 株は O 群不明株であった。高校生由来株を含めて PFGE 解析を行った結果、O 群不明株も含めて同じクラスターに分類された。また、2019 年に茨城県の飲食店 A で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例で疫学解析が活用された。飲食店 A で喫食歴のある 7 名と喫食歴の無い 1 名について MLVA を行ったところ、喫食歴有りの 7 株がすべて一致した。

D. 考察

平成 30 年度から令和 2 年度の 3 年間で、研究協力施設 11 施設のうち担当者の変更があったものは 5 施設あり、このうち 2 施設は毎年担当者の変更があった。近年は地研の職員も、異動により部署が変わることが多くあり、技術レベルを一定以上に保つための取り組みが必要と考えられた。特に病原体の分子疫学解析では、異なる検査施設での結果を比較し、判定する必要も出てくることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることは重要といえる。3 年間の共通菌株を用いた精度管理において、年々、手技の定着がなされていることが明らかとなり、定期的な精度管理の実施により各自自治体間で安定した情報共有が可能となると思われた。また、今後の課題として、広域散発を早期に探知するためのネットワークの構築や PFGE 法の細かい部分も含めた操作手順の統一化を図ること、さらには次世代シーケンサーに関する最近分野での解析への利用方法の検討も求められる。

東京都の場合、3年間で MLVA が実施可能な主要 3 血清型の割合は 76.7% (868 株) で、今後 O121 および O103 においても MLVA が可能となれば、全体の約 90%において効率的な情報の共有化が可能となると考えられた。

E. 結論

共通菌株を用いた精度管理により、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の検査・解析レベルが一定以上であることが判明した。

アンケート調査の結果、MLVA を行政活用した事例を各施設で経験していることが判明し、年々、実施施設数が増加していることが判明した。また、検出頻度が少ない血清型の腸管出血性大腸菌に関しては、従来通り PFGE を用いる必要のあることから、MLVA だけでなく PFGE の精度管理も継続していく必要があるといえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 小西典子, 原田幸子, 尾畑浩魅, 河村真保, 鈴木淳, 貞升健志: 2017年に東京都で発生した Diffuse outbreak と分子疫学解析、第 39 回 食品部生物学会、平成 30 年 9 月、大阪府
- 2) 原田幸子, 小西典子, 尾畑浩魅, 河村真保, 鈴木康規, 鈴木淳, 貞升健志: 2017年に発生した腸管出血性大腸菌による散発事例由来株の SNP 解析、第 31 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、平成 31 年 2 月、千葉市
- 3) 佐藤孝志, 松下明子, 塚本展子, 砂押

克彦, 福島浩一, 倉園貴至: 埼玉県で分離された腸管出血性大腸菌の解析について—MLVA 法を中心に—、第 31 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、平成 31 年 2 月、千葉市

- 4) 小西典子, 原田幸子, 尾畑浩魅, 河村真保, 山梨敬子, 小野明日香, 齊木大, 前田雅子, 赤瀬悟, 門間千枝, 畠山薫, 鈴木淳, 貞升健志: 2018年に東京都で分離された腸管出血性大腸菌の特徴と食中毒事例、第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、令和元年 11 月、松山市
- 5) 小西典子, 河村真保, 尾畑浩魅, 山梨敬子, 小野明日香, 原田幸子, 齊木大, 前田雅子, 赤瀬悟, 門間千枝, 畠山薫, 鈴木淳, 貞升健志: 東京都内で発生した腸管出血性大腸菌 O121 による食中毒事例とその検査法、第 31 回日本臨床微生物学会総会学術集会、令和 2 年 2 月、金沢市
- 6) 長岡宏美, 大越魁, 鈴木香菜, 小川紋, 水元嗣郎, 森主博貴, 神田隆, 岩佐浩行, 山田裕貴, 中嶋郁子, 岩佐裕子, 久川祐稔: Diffuse outbreak が疑われた VT 産生 O145 による胃腸炎事例、第 32 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会、令和 2 年 2 月さいたま市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 共通菌株のMLVA成績

No.	血清型	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	O157	2	1	6	11	5	11	9	13	4	4	7	9	6
2	O157	2	1	4	5	5	18	10	9	2	12	7	4	7
3	O157	2	1	6	11	5	11	9	12	4	4	7	9	6
4	O157	2	1	4	5	4	9	12	17	5	8	6	7	3*
5	O26	2	1	2	8	15	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2

*複数にピークあり (3or7or15)

図1. EHECを対象とした分子疫学解析実施施設数 (関東ブロック)

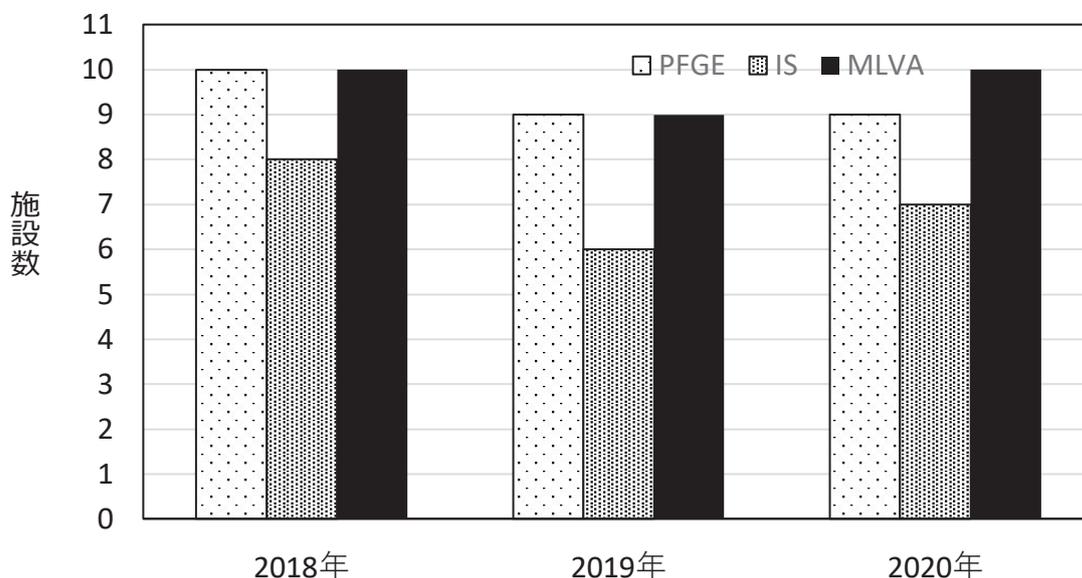


表2. 東京都で分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌 (2018年~2020年)

血清群	菌株数	(%)	血清群	菌株数	(%)
O157	733	(64.8)	O8	3	(0.3)
O26	118	(10.4)	O55	2	(0.2)
O121	75	(6.6)	O78	2	(0.2)
OUT	69	(6.1)	O124	1	(0.1)
O103	45	(4.0)	O125	1	(0.1)
O111	35	(3.1)	O63	1	(0.1)
O91	12	(1.1)	O15	1	(0.1)
O145	12	(1.1)	O112	1	(0.1)
O128	9	(0.8)	O152	1	(0.1)
O146	5	(0.4)			
O115	5	(0.4)	合計	1131	

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による腸管出血性大腸菌分子疫学解析法の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 松本昌門、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
木村恵梨子、塩本高之 石川県保健環境センター
岩崎理美、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
山本新也、石黒亜基子 豊橋市保健所衛生試験所
中根千鶴、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

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所（地衛研）、及び衛生試験所、以下各地研）において、腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学解析法の精度管理を実施した。平成 30 年度には EHEC のみならず全ての食中毒菌に適用可能で、最も汎用性に優れている pulsed-field gel electrophoresis（PFGE）法の精度管理を、令和元年度には迅速・簡便な方法として各地衛研で汎用されている IS-printing system（IS-PS）の精度管理を、令和 2 年度には EHEC 3 血清型（0157、026、0111）に対する分子疫学解析法である Multiple-Locus Variable numbers tandem repeats analysis（MLVA）法についての精度管理を実施した。MLVA 法の精度管理のみ、11 施設のうち既に MLVA 法が実施可能な 8 施設に対して実施した。また、令和 2 年度には愛知県内の中核市 3 市に対して、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施した。愛知県内東海・北陸ブロックで分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を行った。

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

11 施設から送付された 0145、0121 計 3 株の PFGE 泳動図について解析を行った結果、その相同性は菌株 1 は 96.8%、菌株 2 は 96.5%、菌株 3 は 97.8%であった。過去に研究班活動として行った PFGE 精度管理では 3 年間の研究期間のうち特に 1 年目ではその相同性は低く 80%を下回ることも多々あった。5 年以上の間 PFGE 精度管理を行っておらず、かつ研究期間の 1 年目であることを考えると、今回は優れた結果が得られている。これは当研究班のこれまでの活動によるものと考えられるが、各施設で発生した食中毒事例の分子疫学解析に PFGE を使用していることも大きな要因であると思われる。

2. 分子疫学手法を用いて解析した事例の報告

今年度は 2 事例の報告があった。ひとつは腸管出血性大腸菌 0157（VT1VT2）による事例で当該施設が MLVA による遺伝子型別を実施した事例であった。もうひとつは腸管毒素原性大腸菌 025 による食中毒事例であった。地方衛生研究所で PFGE を実施し、解析結果を県内関係自治体に報告した。特に後者では東海・北陸ブロック内で連携して分子疫学解析を実施した好例となったと思われる。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

1st set : 検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。2nd set : 検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 に関しても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設で概ね良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認をおこなうことが重要である。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

118 株の 0157 は 106 MLVA 型に、42 株の 026 は 37 MLVA 型に型別することができた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *Escherichia albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てにおいて 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた。

令和 2 年度

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ポ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クエンサーの違いや 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、分離株全てにおいて 95%程度の相同性があった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）は死亡に至ることもある腸管感染細菌として、公衆衛生上対策を必要とする主要な病原体の一つである。EHEC はいわゆる食中毒の原因菌であると共に、食品を介した diffuse outbreak 例も報告されている。diffuse outbreak は散発事例に紛れることが多く、発見が困難であるため、対策には迅速な分子疫学解析と、情報共有が重要となる。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。その結果、EHEC による集団事例発生時には各自治体が迅速かつ正確に PFGE 及び IS-PS を実施し、その結果を食品衛生行政に還元することが可能となった。

PFGE 法は手技が煩雑で実施に時間がかかるが、EHEC のみならず全ての食中毒菌に適用可能で、最も汎用性に優れている分子疫学解析法である。IS-PS は PCR 型別法であることから、迅速・簡便な方法として各地衛研で汎用されているが、0157 のみにしか使用できない。また 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 repeat Analysis；MLVA）に統一することとなり、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のため、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、平成 30 年度には最も汎用性に優れている PFGE の精度管理を、令和元年度には迅速・簡便な PCR 型別法である IS-PS の精度管理を、令和 2 年度には EHEC 3 血清型（0157、026、0111）に対する分子疫学解析法である MLVA 法に

ついての精度管理を実施し、東海・北陸ブロックの検査精度の保持・向上を目的とした。

また、令和元年度には愛知県衛生研究所（愛知衛研）で実施した EHEC 保存株（0157 及び 026）の MLVA 解析の結果報告を、令和 2 年度には 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。さらに、平成 30 年度から令和 2 年度の各年度において、東海・北陸ブロックにおいて分子疫学手法を用いて解析した事例の報告も行った。

B. 研究方法

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

愛知衛研から 11 施設に EHEC 3 株（菌株 1,2：腸管出血性大腸菌 0145 2 株、菌株 3：0121 1 株）また、必要な施設には分子量マーカーとして *S. Braenderup* H9812 も配布した。タイムスケジュールは平成 30 年 9 月、分与願及び菌株送付のためのパソパック、ジュラルミンケースの事前送付を各施設に依頼した。平成 30 年 10 月、菌株を各施設に送付した。平成 30 年 12 月、各施設から泳動図の送付及び分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を愛知衛研に行った。当所では PFGE 泳動図の解析を実施した。また、分離菌株についての研究を行い、患者情報は利用しなかった。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

愛知衛研から 11 施設（地衛研 8 カ所、愛知県内中核市保健所及び衛生試験所 3 カ所）に 3 件の腸管出血性大腸菌 0157 抽出 DNA と試薬（IS-PS（東洋紡社））を配布した。タイムスケジュールは令和元年 11 月に抽出 DNA と試薬の配布、12 月に結果提出とし、当所で IS-PS 泳動図の解析を実施した。配布 DNA のエキストラバンドは検体 No1 では 2 本（1-2 と 1-3 の間と 1-14 と 1-15 の間）、検体 No2, 3 はエキストラバンド 1 本（1-14 と 1-15 の間）（図 1 及び図 2 参照）である。分離菌株についての研究を行い、患者情報は利用しなかった。

令和 2 年度

1. MLVA 法精度管理

愛知衛研から 7 施設（地衛研 4 カ所、愛知県内中核市保健所及び衛生試験所 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（O111 1 検体、O157 2 検体及び O26 1 検体）、リピート数既知 EHEC 抽出 DNA（0.5ng/ μ L）3 検体（O157 2 検体及び O26 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 導入研修を愛知衛研にて開催した。研修は愛知衛研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

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

菌株 1（O145）の解析結果は、9 施設の泳動図が相同性 100%であった。残り 1 施設との相同性は 96.8%であった（図 3）。相同性 100%とならなかった 1 施設は図 3 の○で囲んだ低分子量の領域で 9 施設はバンドが 2 本認識できたが、1 本のみしか認識できなかった。

菌株 2（O145）では、複数の施設を含むクラスターが 2 つ認められた（図 4）。1 つは 7 施設

の泳動図を含むクラスターでもうひとつは 2 施設が含まれるクラスターであった。これら 2 つのクラスターの相同性は 97.4%であった。また、残り 2 つの施設はクラスターを形成せず、互いの相同性は 97.3%であった。さらにこれら 2 施設と 2 つのクラスターとの相同性は 96.5%であった。相同性に影響したバンドは○で囲んだ 2 つの低分子量領域で 7 施設がクラスターを形成した泳動図ではそれぞれ 2 本のバンドが認識できるが、残り 4 施設ではいずれかの○の領域でバンドが 1 本のみであった。

菌株 3（O121）の解析結果では 8 施設の泳動図は相同性 100%でクラスターを形成し、残り 3 施設も相同性 100%でクラスターを形成していた（図 5）。また、互いのクラスターの相同性は 97.8%であった。相同性に影響したと思われる領域は○で囲んだ低分子量領域で施設によってバンドが 3 本から 4 本認識された。

過去に研究班活動として行った PFGE 精度管理では 3 年間の研究期間のうち特に 1 年目ではその相同性は低く 80%を下回ることも多々あった。今回、5 年以上の間 PFGE 精度管理を行っておらず、かつ研究期間の 1 年目であることを考えると、今回の結果は優れた結果であると言える。これは当研究班のこれまでの活動によるものと考えられるが、各施設で発生した食中毒事例の分子疫学解析に PFGE を使用していることも大きな要因であると考えられる。

2. 分子疫学手法を用いて解析した事例の報告

事例 1：平成 30 年 7 月食中毒として届出された腸管出血性大腸菌 O157(VT1VT2)による事例。当該施設が MLVA による遺伝子型別を実施した。その結果、感染者 4 名の MLVA 型は全て一致し、同一感染源による集団感染事例と判断したが、感染源は不明であった。菌株を国立感染症研究所細菌第 1 部に送付し解析を依頼した。本事例の MLVA 型は 2018 年 10 月現在、他県において同一 MLVA 型の報告はなかった

事例 2：平成 30 年 8 月発生した腸管毒素原性大腸菌 O25 による食中毒事例。原因施設は仕出し弁当製造施設で有症者 150 名であった。食中毒として行政処分後、地衛研で PFGE を実施し、解析結果を県内関係自治体に報告した（図 6）。

東海・北陸ブロック内で連携して分子疫学解析を実施した好例となったと考えられた。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

・1st set

検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。

・2nd set

検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。具体的には 1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 に関しても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。具体的には 1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。

使用した電気泳動装置は Multina DNA1000、QIAxcel DNA Screening Kit (AM320) 及びミニゲルであった。ミニゲルを使用した施設は 3% NuSieveGTG Agarose を使用し泳動条件は 100V・70 分であった。

以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設で概ね良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認を行うことが重要である。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

愛知県衛生研究所において、保存株について MLVA 解析を実施した。その結果、0157 118 株は 106 MLVA 型に、026 42 株は 37 MLVA 型に型別された。

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 2 つの *Escherichia albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てが 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた (図 7) ま

た、2 つの食中毒事例を起こした *E. albertii* の PFGE 型が異なっていたことからその感染源が異なることが示唆された。

令和 2 年度

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、判定に苦慮すると思わ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 Dice™ 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スポート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 8)。その結果、分離株全てが 95%程度の相同性があった。

E. 結論

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

11 施設から送付された 0145、0121 計 3 株の PFGE 泳動図について解析を行った結果、その相同性は 96.8%、菌株 2 は 96.5%、菌株 3 は 97.8%であった。今回、5 年以上の間 PFGE 精度管理を行っておらず、かつ研究期間の 1 年目であることを考えると、今回の結果は優れた結果であった。

2. 分子疫学手法を用いて解析した事例の報告

今年度は 2 事例の報告があった。ひとつは腸管出血性大腸菌 0157(VT1VT2)による事例で当該施設が MLVA による遺伝子型別を実施した事例であった。もう 1 事例の腸管毒素原性大腸菌 025 による食中毒事例においては、地衛研で PFGE を実施し、解析結果を県内関係自治体に報告した。特に後者では東海・北陸ブロック内で連携して分子疫学解析を実施した好例となったと思われる。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

・1st set

検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。

・2nd set

検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 についても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。

以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設で概ね良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認を行うことが重要であると考えられた。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

愛知県衛生研究所において、保存株について MLVA 解析を実施した。その結果、0157 118 株は 106 MLVA 型に、026 42 株は 37 MLVA 型に型別された。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *E. albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てが 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた。

令和 2 年度

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ポ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

誌上発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

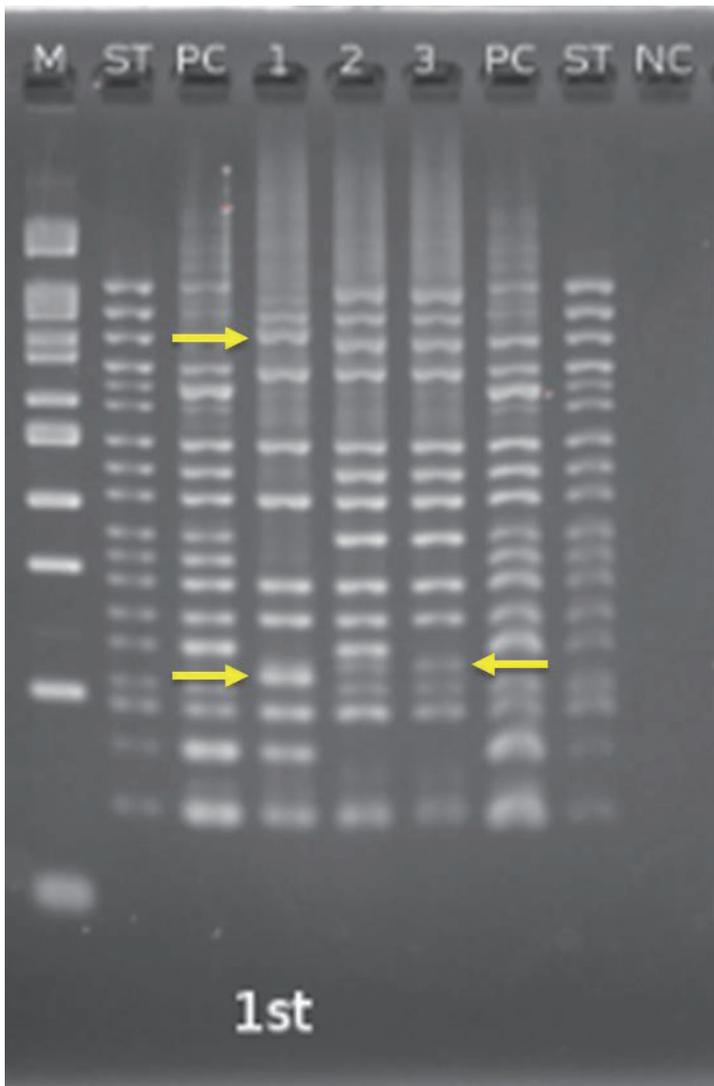


図1 配布株 IS パターン (1st set)

矢印：非特異バンド、M：分子量マーカー、ST：全バンドパターン、PC：陽性コントロール、1 から 3：検体

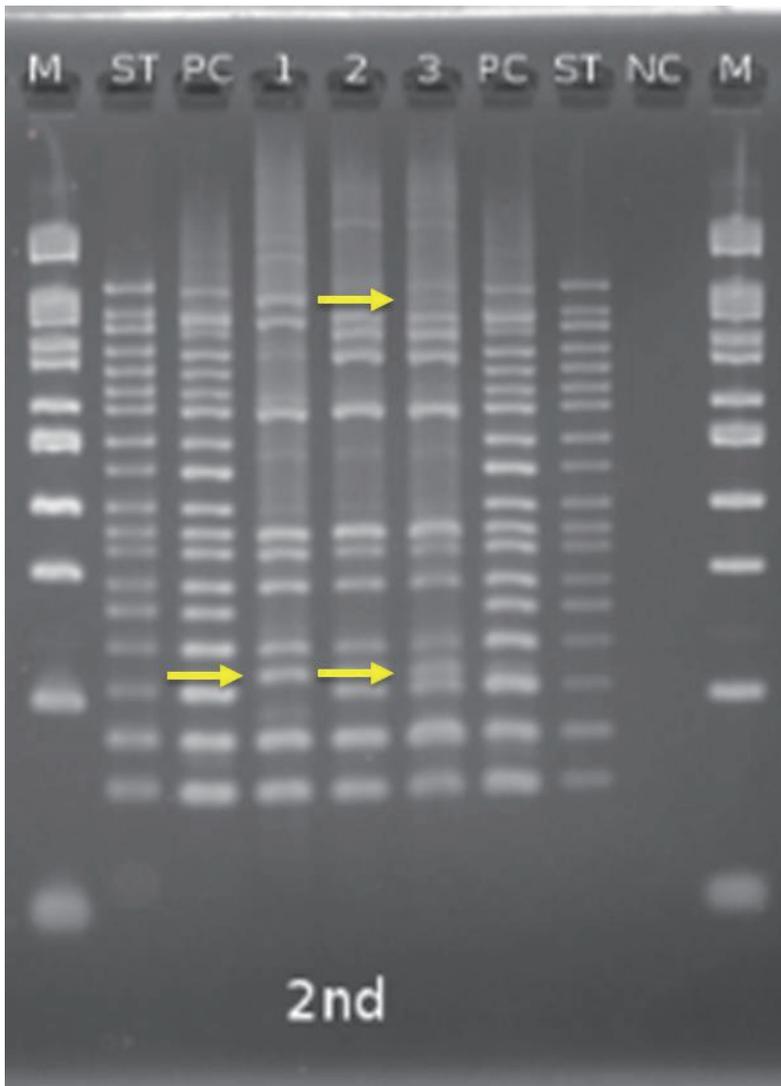


図2 配布株 IS パターン (2nd set)

矢印：非特異バンド、M：分子量マーカー、ST：全バンドパターン、PC：陽性コントロール、1 から 3：検体

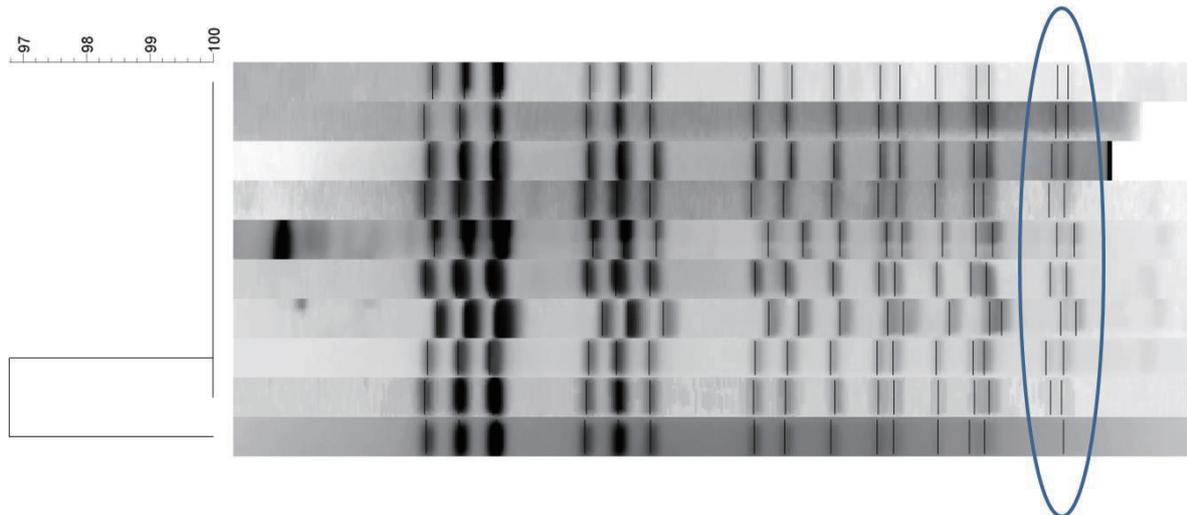


図 3 菌株 1 (0145) の系統樹解析

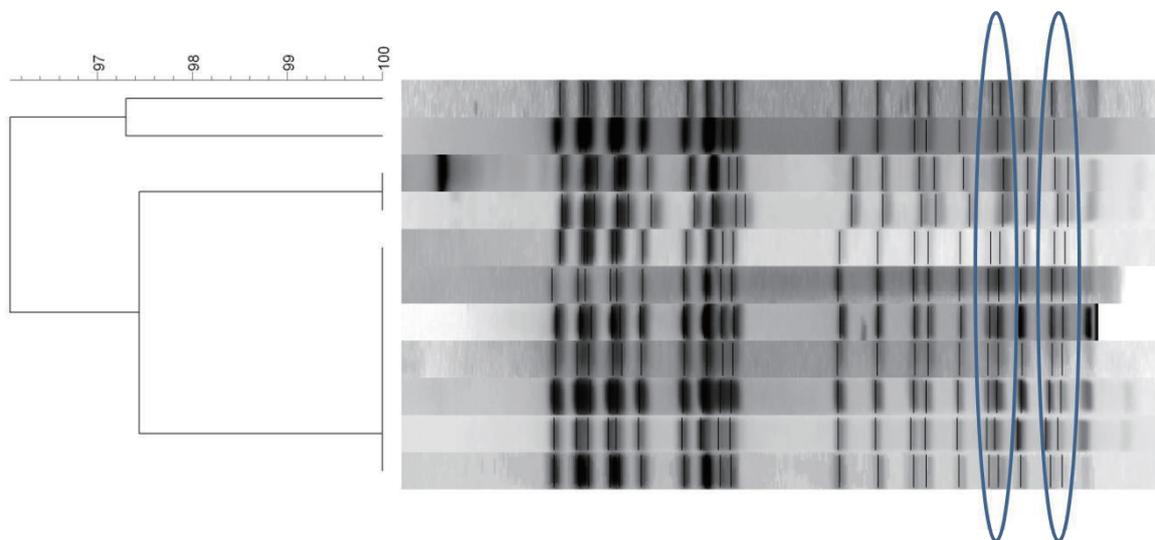


図 4 菌株 2 (0145) の系統樹解析

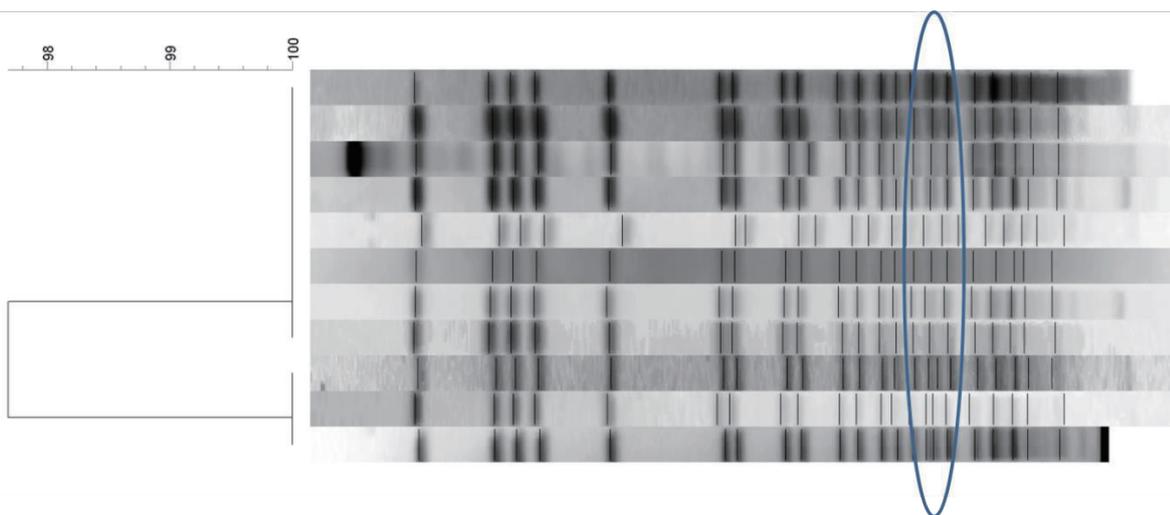


図 5 菌株 3 (0121) の系統樹解析

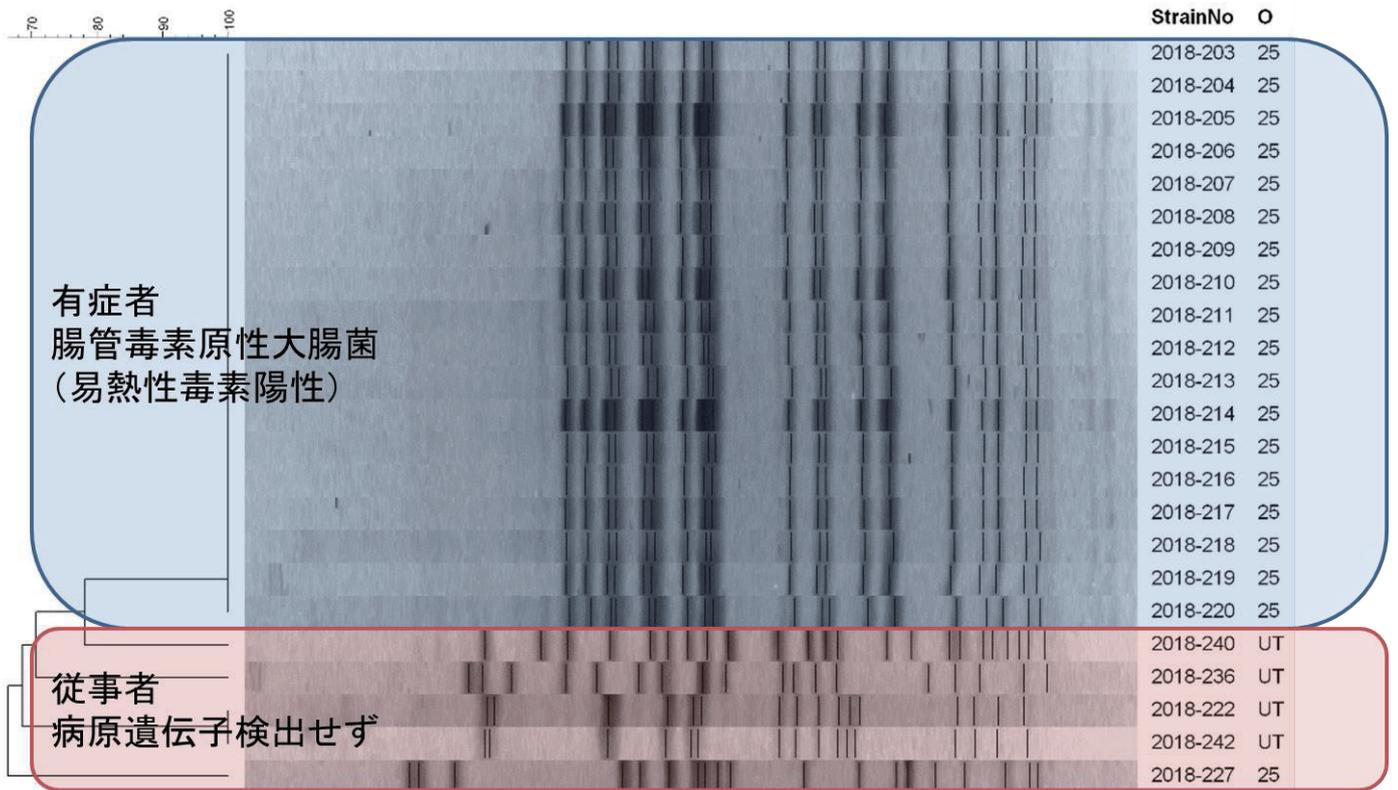


図6 腸管毒素原性大腸菌 O25 集団事例の PFGE 解析

大腸菌病原遺伝子は *invE* 遺伝子、*stx* 遺伝子、*estA1* 遺伝子、*estA2* 遺伝子、*elt* 遺伝子、*iae* 遺伝子、*aggR* 遺伝子、*afaD* 遺伝子、*astA* 遺伝子について探索を実施した。

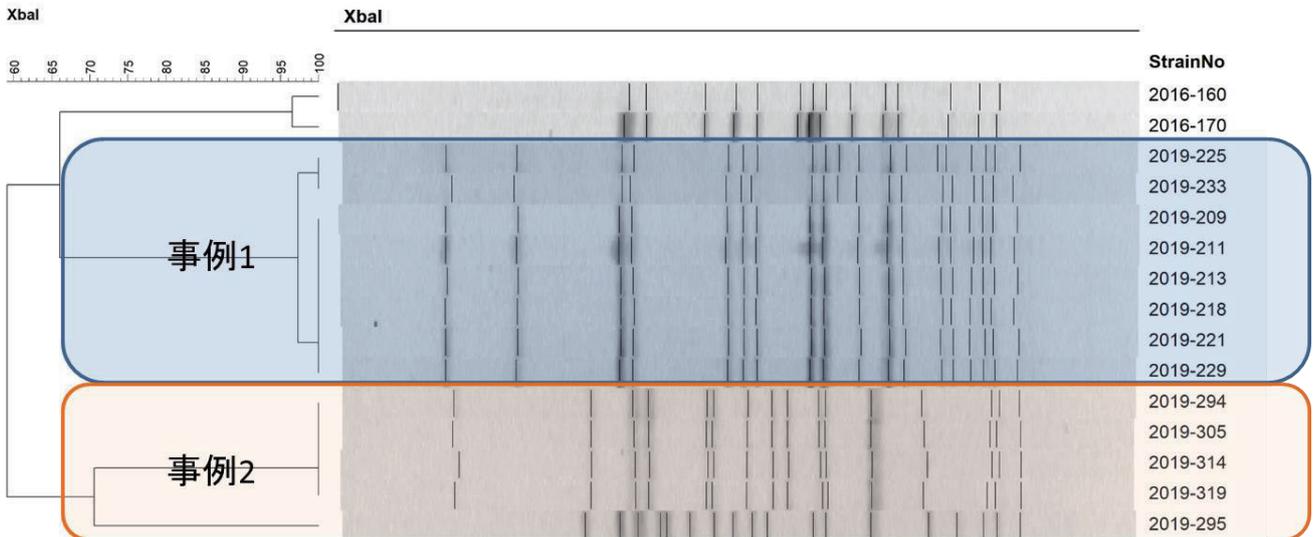


図7 *E. albertii* 集団事例の PFGE 解析

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 μL DW μL
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Height		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	1509.1	1503.3	2454.1	4911.4	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	18	9	15	5	3	7	6	7	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	1	13	2	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	24	9	10	3	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 h1	Allele 2	Height 2	Sample Name	Marker	Height
1	mix1_XXXXXXXX	O157-34	153-01	6999				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	XXXXXXXX	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	O157-9	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				

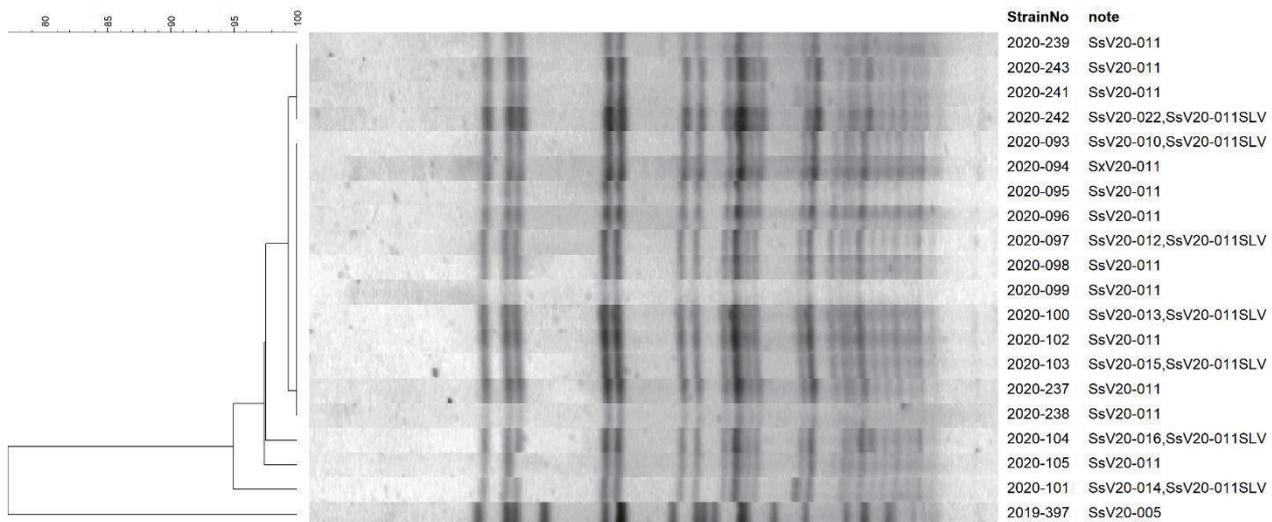
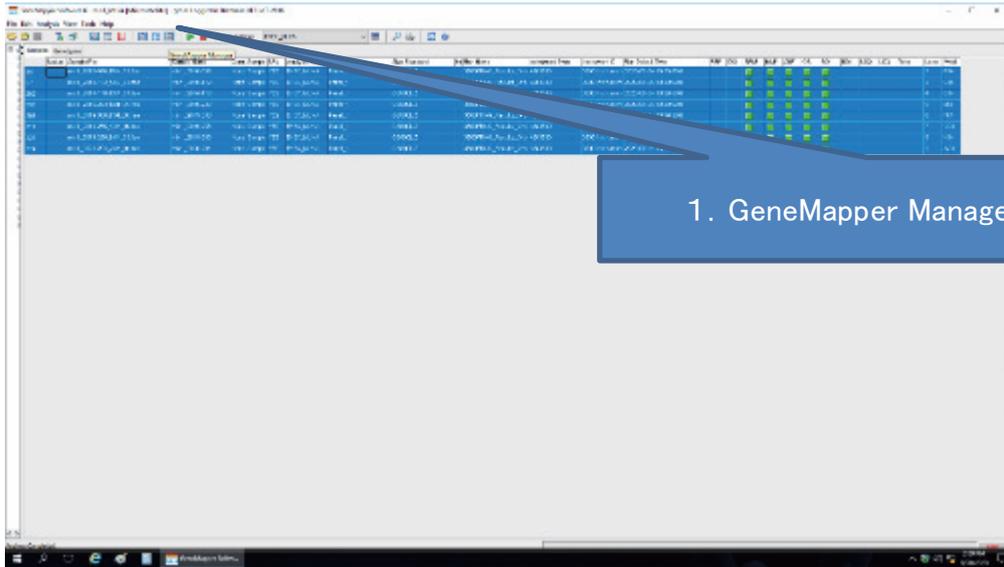


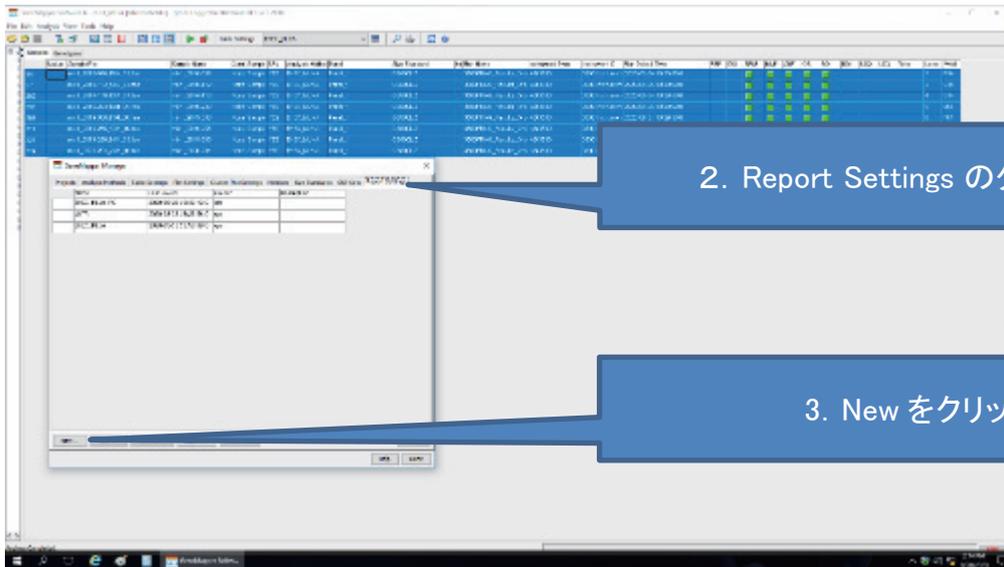
図8 *Shigella sonnei* の PFGE 図

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)

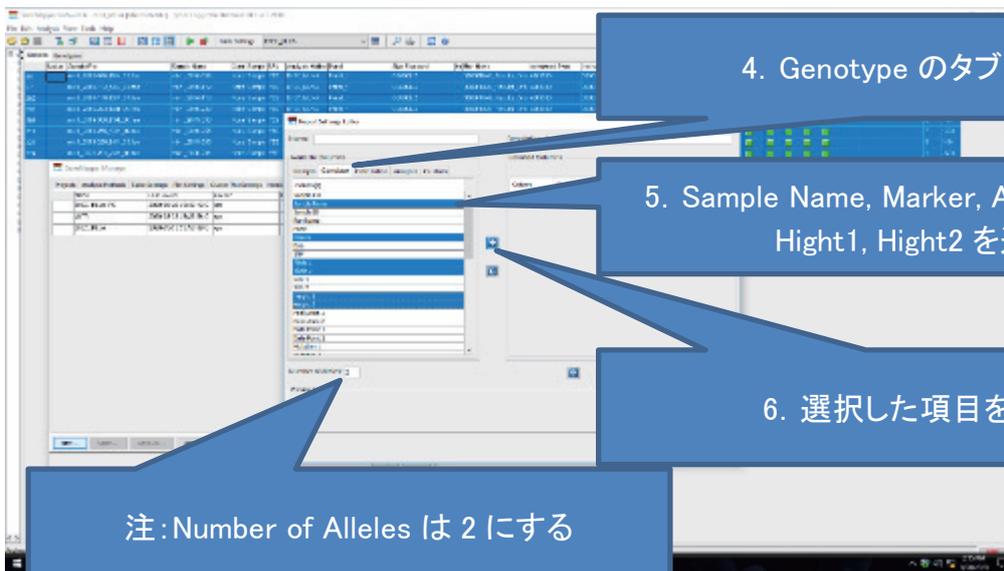


1. GeneMapper Manager をクリック



2. Report Settings のタブに移動

3. New をクリック

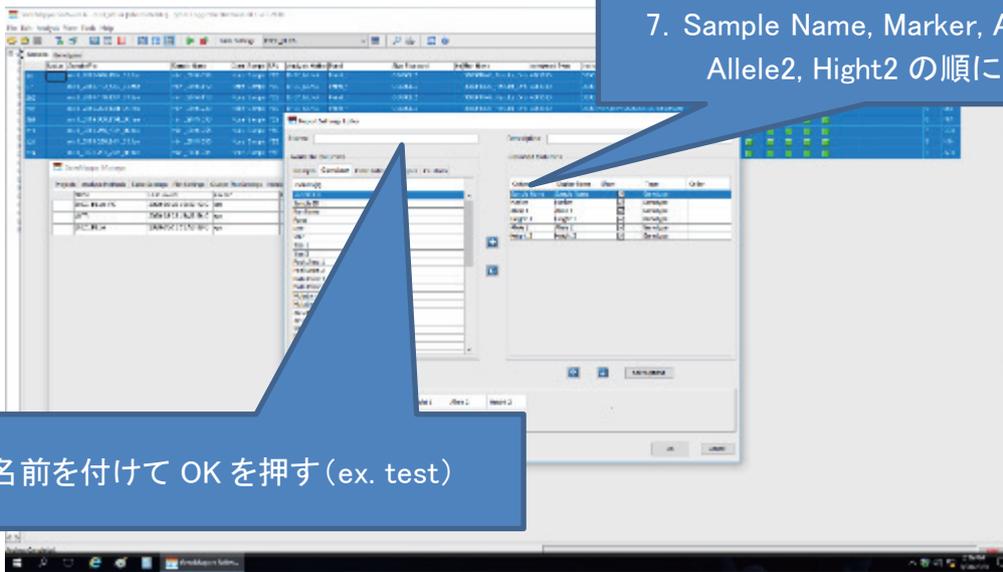


4. Genotype のタブに移動

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

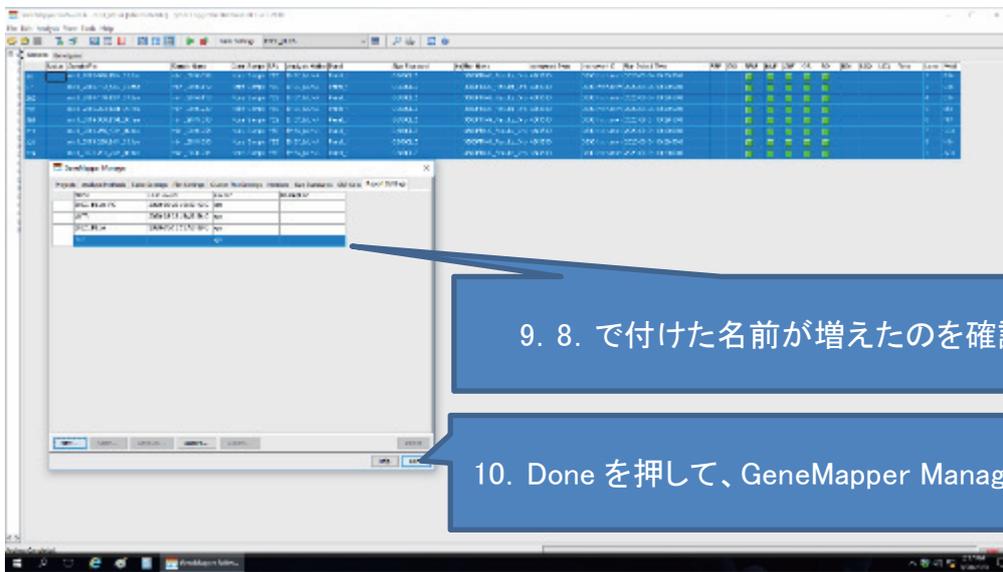
6. 選択した項目を移動

注: Number of Alleles は 2 にする



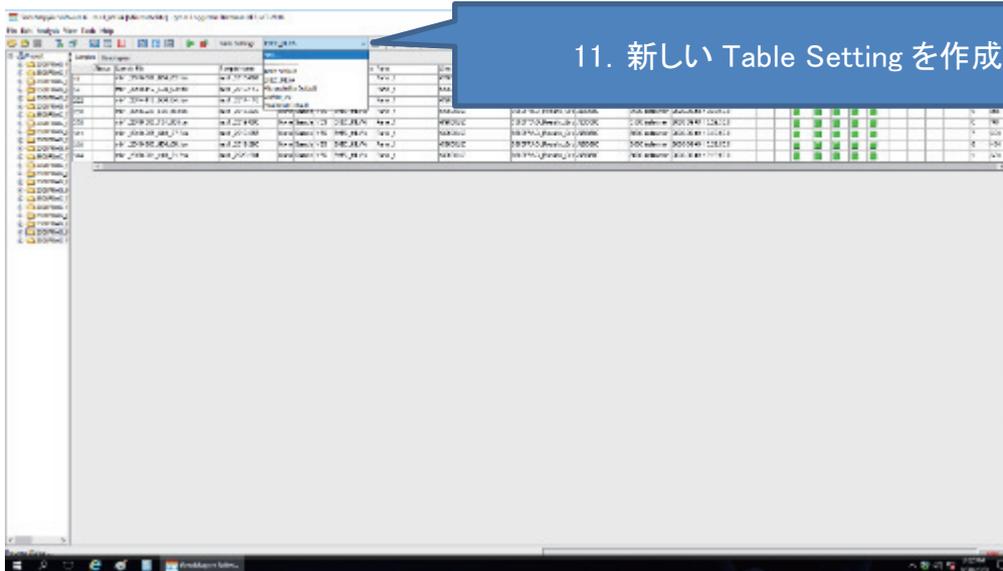
7. Sample Name, Marker, Allele1, Hight1, Allele2, Hight2 の順に並べ直す

8. 名前を付けて OK を押す(ex. test)

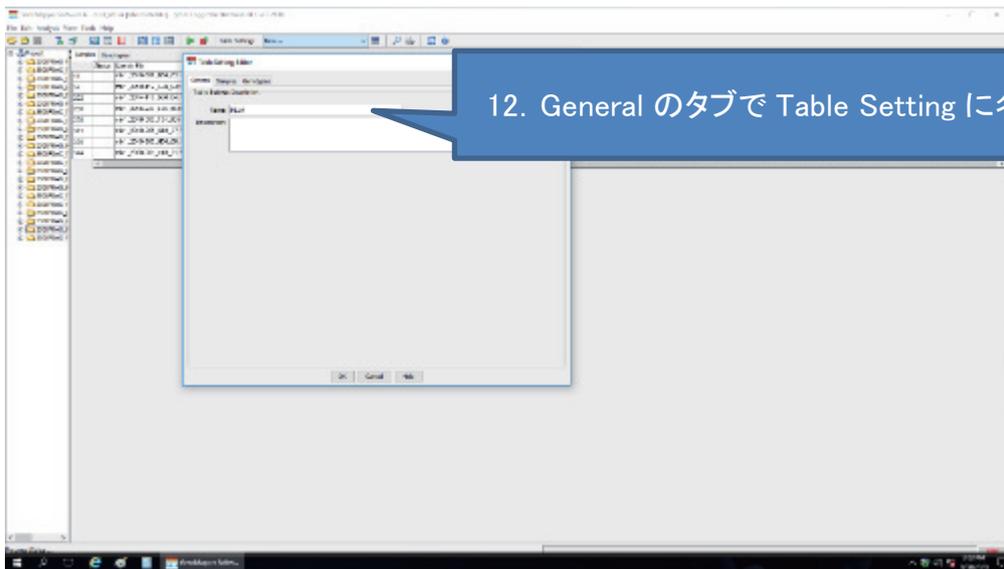


9. 8. で付けた名前が増えたのを確認

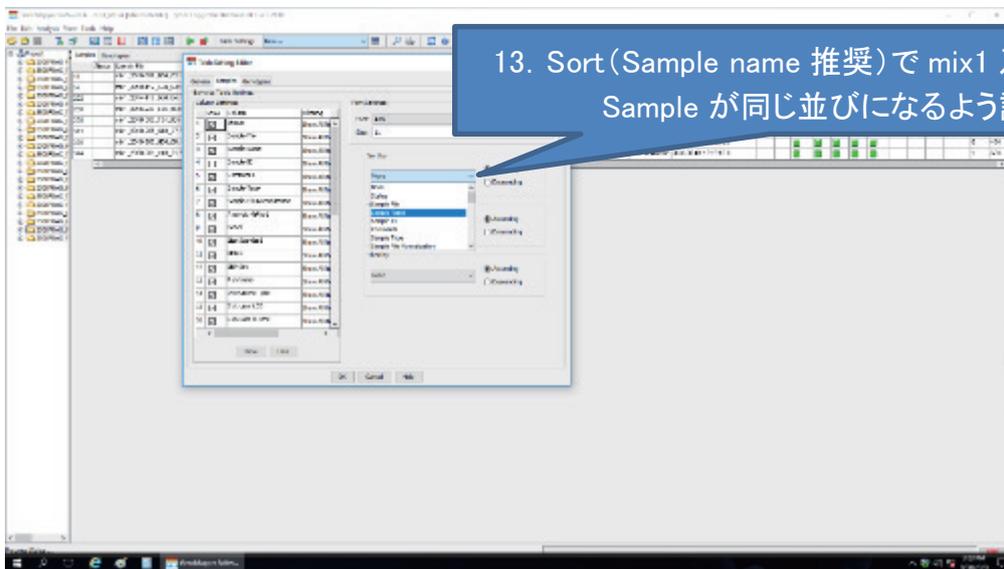
10. Done を押して、GeneMapper Manager を閉じる



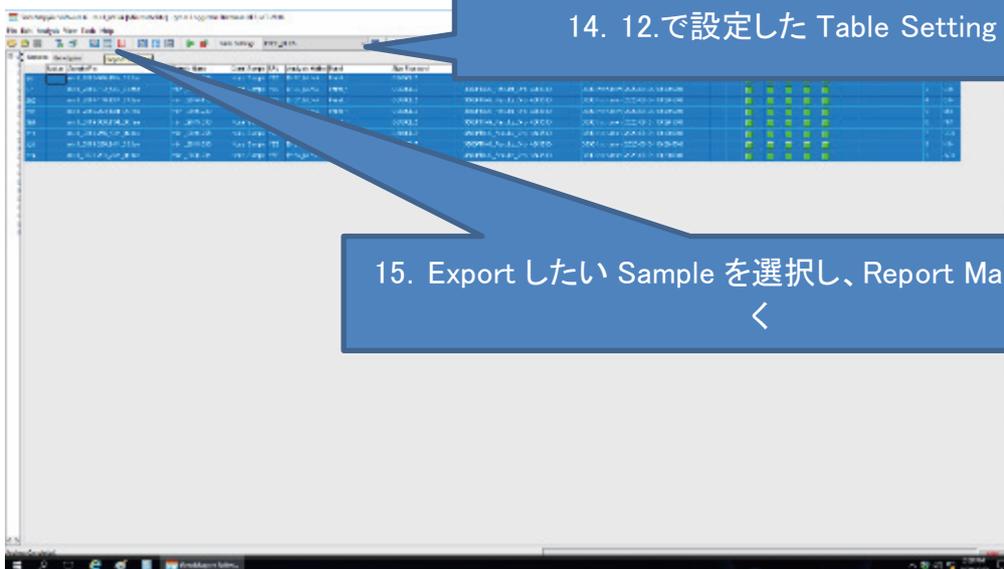
11. 新しい Table Setting を作成する



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

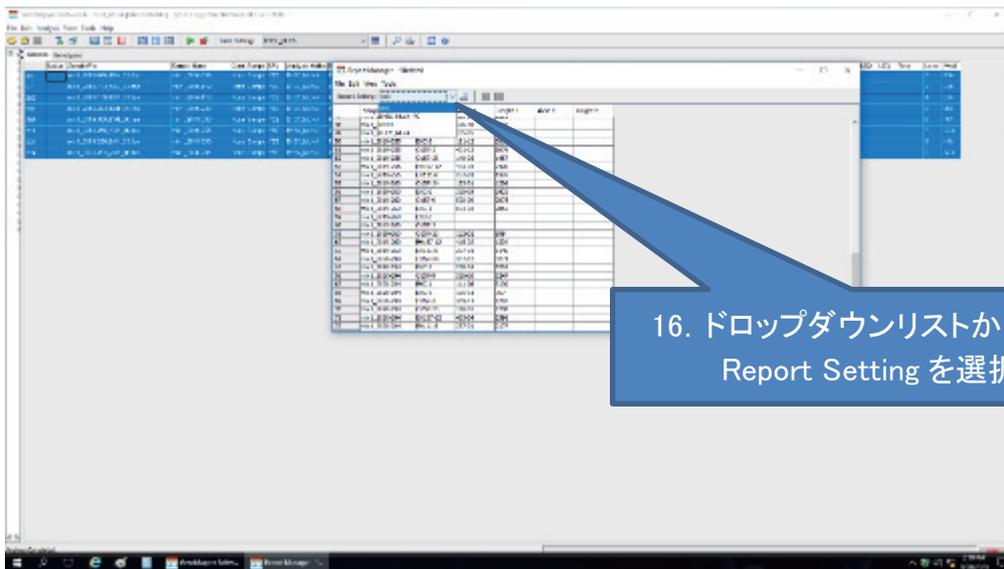


13. Sort (Sample name 推奨) で mix1 及び mix2 の Sample が同じ並びになるよう設定

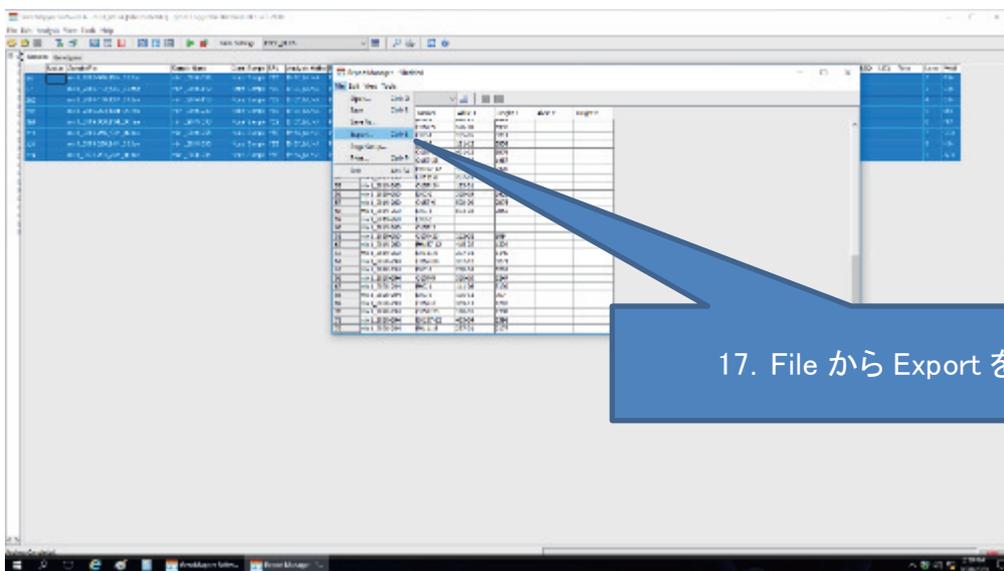


14. 12.で設定した Table Setting を選択

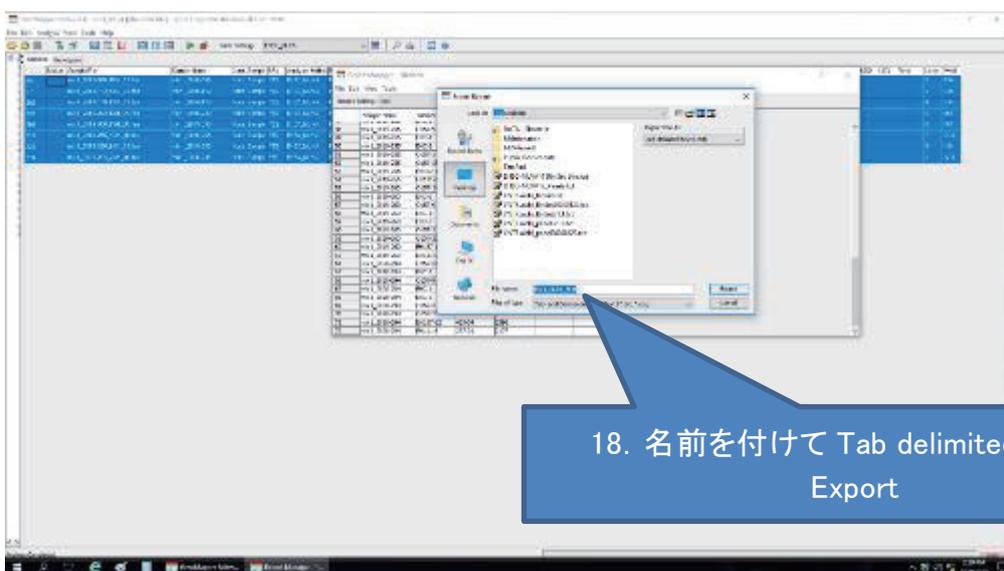
15. Export したい Sample を選択し、Report Manager を開く



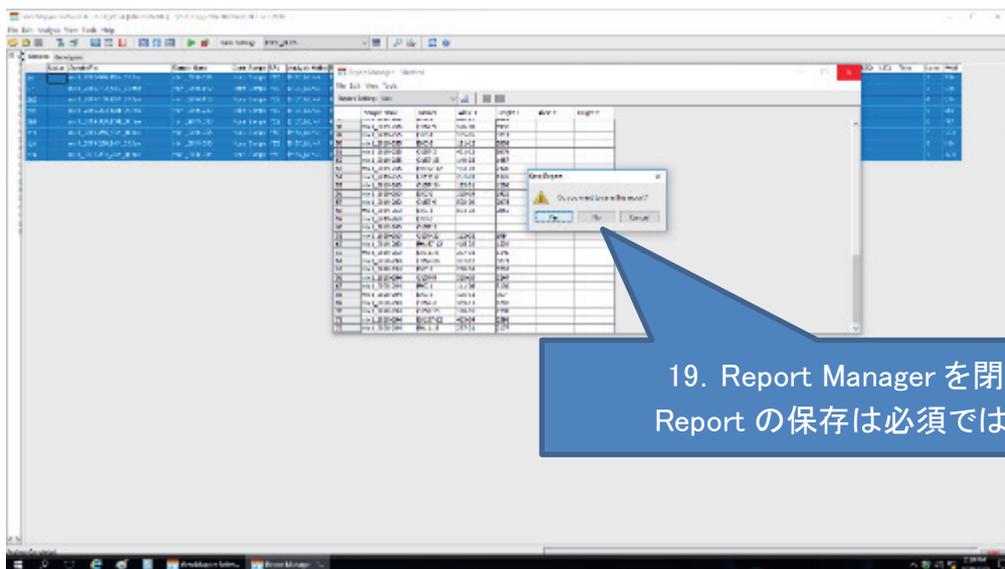
16. ドロップダウンリストから作成した Report Setting を選択する



17. File から Export を選択



18. 名前を付けて Tab delimited text で Export



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制作推進研究事業）

平成 30～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、河野智美 大石剛史、小仲兼次、武田直樹 浅井紀夫 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 村山隆太郎、平垣内雅規 平田翔子 福田弘美、岩崎直昭 田邊純子、佐伯美由紀、吉田孝子 西山貴士、池端孝清 中岡加陽子、寺杣文男、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）の分子疫学解析法の 1 つ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、以下の①～④の研究を実施した。①回帰分析を利用した MLVA の新規リピート数決定法（新規解析法）を開発した。本方法は、従来法よりも汎用性が高く、従来法と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。②近畿ブロック内の地衛研を対象とした技術研修会を開催するとともに、MLVA 実施時に躓きやすいポイント等をまとめた Q&A を作成し、近畿ブロックの地衛研に配布した。③検査結果の信頼性確保を目的とした MLVA 精度管理を実施した。その結果、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。④MLVA 検査体制が整備されるまでの期間は、近畿 IS データベースを運用し、流行株の解析情報を近畿ブロック内の地衛研で共有した。データベース登録施設数が年々減少したこと等を考慮して、令和 2 年度に近畿 IS データベースの更新を停止した。EHEC の遺伝子型別法は MLVA に統一される予定であ

るが、その技術レベルには施設間で差があった。疫学解析精度の確保・向上のために、今後も継続して MLVA の精度管理を実施して技術レベルの底上げを図る必要がある。

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。腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学解析では、IS-printing System (IS) 法、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法および反復配列多型解析法 (Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis ; MLVA) が主に使用されている。近畿ブロックの地方衛生研究所 (地衛研) ではこれまで、IS 法と PFGE 法を共通の遺伝子型別法と位置づけ、ブロック内で分離された EHEC 株の解析情報を共有してきた。一方で、平成 29 年 11 月 20 日付け健感発 1120 第 1 号及び薬生食監発 1120 第 1 号「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について」において、今後の対応として、遺伝子型別の検査について MLVA への統一化を図る旨が通知されており、EHEC の遺伝子型別法は MLVA に一本化される方針となった。

本研究では、地衛研における MLVA の導入・実施を支援するため、参照株 24 株の解析結果に基づいた回帰分析によっ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) を開発した。加えて、近畿ブロックの地衛研を対象とした技術研修会 (初期導入研修会) を開催するとともに、MLVA 実施時に躓きやすいポイントおよび悩みやすいポイントをまとめた MLVA に関

する Q&A を作成することで、地衛研における MLVA の導入推進、実施支援を行った。MLVA の検査体制を確立した地衛研に対しては、検査結果の信頼性確保のための精度管理を実施した。

さらに、近畿ブロックにおいて MLVA 検査体制が整備されるまでの期間、IS データベースの運用を継続し、ブロック内における流行株の解析情報を共有した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

新規解析法で回帰分析に使用する菌株 (参照株) および MLVA 精度管理に使用する菌株 (精度管理株) は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 (大安研) で保存している菌株を使用した。bin セットの評価および IS データベースの登録は、各協力施設で収集した菌株を使用した。

2. 新規解析法の開発とその評価

参照株 24 株の MLVA を実施し、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、各施設で測定した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 のオフセット値をその 99%予測区間幅もしくは ± 1.5 bp として bin セットを作成した。作成した bin セット（自作 bin セット）あるいは国立感染症研究所（感染研）から平成 30 年に配布された bin セット（感染研 bin セット）を解析ソフト（GeneMapper）にインポートし、各施設で収集した EHEC O157、O26、O111 について MLVA を実施し、表 1 の基準に従ってリピート数を決定した。

併せて、感染研に菌株を送付し、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て、施設毎に自作 bin セットあるいは感染研 bin セットで決定したリピート数との一致率を比較した。

3. MLVA 初期導入研修会の開催と MLVA に関する Q&A の作成

大安研の検査担当者 3 名を講師として MLVA 初期導入研修会を開催した。参加施設には、MLVA の準備状況に関する事前アンケートを実施した。また、研修会開催に合わせ、MLVA 解析ソフト GeneMapper を用いた解析マニュアルを作成し、参加者に配布した。

Q&A の作成では、協力地衛研から MLVA に関する疑問点等をメールで募集した。質問事項に対して回答を作成し、MLVA に関する Q&A として近畿ブロックの協力地衛研に配布した。

4. MLVA の精度管理

MLVA の精度管理に参加した協力地衛研

に、精度管理株（令和元年度は 5 株、令和 2 年度は 12 株）から抽出した DNA を送付した。各施設で所有する機器および試薬を使用して MLVA を実施し、遺伝子座ごとのリピート数を記入した判定表の提出を求めた。

5. 近畿 IS データベースの運用

施設ごとに、収集した EHEC O157 について IS 法を実施し、その結果を施設内データベースに登録した。更新した施設内データベースは研究分担者およびデータベース管理者に送信され、データベース管理者はそれらを元にレファレンスデータベースを更新し、最新版を研究協力者に電子メールで送信した。

C. 研究結果

1. 新規解析法の開発

初年度に開発した新規解析法は翌年度以降も改良を続け、毎年度、協力地衛研とともにその有用性を評価した。大安研における各年度の自作 bin セットの評価結果を表 2 に示す。いずれの年度においても、自作 bin セットで決定したリピート数は、標準リピート数と概ね一致した。bin セットのオフセット幅を ± 1.5 bp とすることで、回帰直線から外れたピークについてもリピート数を決定できることが明らかとなった（詳細は令和元年度分担報告書参照）。また、遺伝子座 EHC-6 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向上させることができた（詳細は令和 2 年度分担報告書参照）。新規解析法によるリピート数の決定精度は、改良を重ねるにつれて向

上し、令和2年度には、自作 bin セットを使用して決定した菌株のリポート数は、標準リポート数とすべて一致した（表2）。

2. 新規解析法の評価

研究協力地衛研（平成30年度は4施設、令和元年度と令和2年度は5施設）とともに、開発した新規解析法の評価を行った。感染研 bin セットを使用した場合、使用するシーケンサーの種類によってはリポート数の決定精度が低下したが、自作 bin セットを使用した場合、シーケンサーの種類にかかわらず、高い精度でリポート数を決定できた（詳細は令和元年度分担報告書参照）。令和2年度の改良で、新規解析法は、感染研 bin セットと比較して同等あるいは同等以上の精度でリポート数を決定することが可能となった（詳細は令和2年度分担報告書参照）。

3. MLVA 初期導入研修会の開催および Q&A の作成

MLVA 導入を検討している近畿ブロックの5地衛研を対象に、令和元年8月に大安研で MLVA 初期導入研修会を開催した。参加者から好評を得たが、解析ソフトの使用法に関する研修や解析結果の行政への提供方法に関する情報交換会の開催を望む意見があった。

令和2年度に情報交換会を計画したが、コロナ禍のために断念せざるを得なかった。そこで、MLVA に関する Q&A の作成に方針変更した。MLVA に関する疑問点等をメールで募集した結果、9施設から31項目の質問事項を得た。質問事項に対して回答を加

筆し、MLVA に関する Q&A としてまとめたうえで、協力地衛研に配布した（令和2年度分担報告書の別紙1参照）。

4. MLVA の精度管理

令和元年度は5施設が、令和2年度は10施設が精度管理に参加した。令和元年度は、参加したすべての施設が配布した5株すべてを正答した。令和2年度は施設ごとに正答数に差が認められた（表3）。この精度管理では、bin セットの範囲外にピークが出現する菌株の正答率が特に低いことが明らかとなった。また、特定の遺伝子座に複数ピークが検出される菌株の場合、結果の記載方法が異なるケースが認められ、令和元年度は1施設が、令和2年度は3施設が同時に検出される小ピークについて記載しなかった。

5. 近畿 IS データベースの運用

近畿 IS データベースには、平成30年度は9施設から142株が、令和元年度は8施設から164株が登録された。IS法を実施する施設数が減少したこと、EHEC の遺伝子型別法は将来的に MLVA に移行すると見込まれたことから、令和2年度に近畿 IS データベースの更新を停止した。

D. 考察

本研究では、MLVA の新規解析法の開発、技術研修会の開催と MLVA に関する Q&A の作成、並びに MLVA の精度管理を実施することで、地衛研における MLVA の導入・実施を支援した。その結果もあり、令和2年11月の時点で、近畿ブロックの地衛研のう

ち 10 施設が MLVA を実施していると回答した。平成 29 年の時点では MLVA を実施している施設は 1 施設もなく、近畿ブロック内の地衛研で MLVA は急速に普及した。MLVA の検査体制を確立していない施設が数施設残っているものの、近畿ブロック内において、MLVA による分子疫学解析体制の整備を一定程度支援できたと考えられた。

MLVA のレポート数決定法としては、他施設で作成した bin セットをインポートして使用方法がしばしば採用される。この方法は、MLVA を実施する機器の種類や施設環境によってはズレが生じ、正確にレポート数を決定できないことがあるため、場合によっては微調整が必要となる。一方、開発した新規解析法は、各施設で実施する環境に合わせて bin セットを作成するため、施設環境に影響を受けない汎用性の高い方法となった。令和 2 年度に実施した改良 bin セットの評価結果から、新規解析法は従来法と比較して同等あるいは同等以上の精度でレポート数を決定できることが示唆された。

MLVA の精度管理を令和元年度と令和 2 年度に実施した。令和元年度に参加した 5 施設は、令和 2 年度の精度管理でも比較的高い正答率を示した。一方、令和 2 年度に初めて精度管理に参加した施設は、複数株で誤答する傾向が認められた。この結果は、MLVA 検査体制を確立してからの年数、並びに精度管理に参加した回数が、検査精度に影響することを示唆している。検査結果の信頼性確保のためには、今後も継続した

精度管理の実施が必要であると考えられた。

平成 21 年から運用している近畿 IS データベースは、平成 24～28 年に最多の 12 施設からデータが登録された。しかし、その後は登録施設数が年々減少傾向にあった。MLVA の導入に伴い、IS 法を実施しない地衛研が増加したことが主な原因であると考えられた。今後も、EHEC の遺伝子型別法として、IS 法から MLVA へ移行する地衛研が増加すると予想されたため、近畿 IS データベースは、令和 2 年 4 月以降、更新を停止した。今後は、近畿 IS データベースに代わる MLVA 解析結果の情報共有体制について、検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

近畿ブロックにおける MLVA の導入・実施を支援するため、MLVA の新規解析法の開発、技術研修会の開催、Q&A の作成、精度管理を行った。近畿ブロックにおける MLVA 導入施設数は研究期間の前後で大幅に増加し、MLVA による分子疫学解析体制が整備された。精度管理の結果、施設ごとの MLVA 技術レベルに差があることが明らかになった。継続的な精度管理の実施による技術レベルの底上げが必要である。近畿 IS データベースは令和元年度を以て更新を停止した。遺伝子型別法の MLVA への移行に伴い、近畿ブロックにおける新たな情報共有体制の検討が必要である。

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

- 1) 若林友騎, 原田哲也, 河合高生, 高橋佑介, 梅川奈央, 泉谷秀昌, 川津健太郎: 単回帰分析を用いたEHEC MLVAのリピート数決定法の検討. 第23回腸管出血性大

腸菌感染症研究会 (2019年11月, 愛媛)

- 2) 若林友騎, 高橋佑介, 梅川奈央, 原田哲也, 河原隆二, 余野木伸哉, 河合高生, 川津健太郎: EHEC MLVA検査体制の確立と大阪府内分離株の解析. 令和元年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 (2019年11月, 和歌山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 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? 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2 大安研における自作 bin セット評価結果

	平成30年度 (評価株数：47)	令和元年度 (評価株数：51)	令和2年度 (評価株数：33)
自作binセットで決定したリポート数が 標準リポート数とすべて一致した株の割合 (%)	81	94	100
自作binセットで決定もしくは推定したリポート数が 標準リポート数とすべて一致した株の割合 (%)	89	96	100

表 3 年度ごとの MLVA 精度管理株数と各施設における正答数

	令和元年度 (精度管理株数：5株)	令和2年度 (精度管理株数：12株)
施設1	5	12
施設2	5	12
施設3	実施せず	7
施設4	実施せず	9
施設5	実施せず	11
施設6	5	11
施設7	実施せず	12
施設8	実施せず	10
施設9	5	12
施設10	5	11

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)

平成30年度～令和2年度 総合研究報告書(分担報告)

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	田中 大和	鳥取県衛生環境研究所
	山根 拓也	鳥取県衛生環境研究所
	福間 藍子	島根県保健環境科学研究所
	小谷 麻祐子	島根県保健環境科学研究所
	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
	檀上 博子	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
	佐藤 香緒里	広島市衛生研究所
	栗林 智早	広島市衛生研究所
	山本 美和子	広島市衛生研究所
	坂本 綾	広島市衛生研究所
	上田 久仁子	広島市衛生研究所
	山木戸 聡	広島市衛生研究所
	尾羽根 紀子	山口県環境保健センター
	大塚 仁	山口県環境保健センター
	野村 恭晴	山口県環境保健センター
	篠原 礼	徳島県立保健製薬環境センター
	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
	木村 千鶴子	愛媛県立衛生環境研究所
	阿部 祐樹	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
	潮 のどか	高知県衛生環境研究所
	河合 央博	岡山県環境保健センター

森本 晃司	岡山県環境保健センター
仲 敦史	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

研究要旨

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

平成 30 年度から令和 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、厚生労働省健康局結核感染症課及び厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課から平成 30 年 6 月 29 日に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」に基づいた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 型や同一の IS コードの EHEC 菌株による感染事例が複数の自治体で確認されたが、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を原因とする食中毒は認められなかった。

3 年間にわたる本研究により、菌株解析を行う中四国ブロックの地衛研の解析技術の向上を図ることができたものとする。更には、IS-printing System、PFGE 法、MLVA 法による EHEC 分子疫学解析手法の精度管理実施により、サーベイランス技術水準の向上に貢献したものとする。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域的な事例が発生した場合、事例や症例間の関連性を明らかにするためには、分離株の分子疫学解析

結果の比較・解析が有用であり、適切に解析を行うには、検査技術の維持と解析能力・解析精度の向上が不可欠かつ重要である。このため、中四国ブロックの地

方衛生研究所を対象に、各種解析手法の精度管理を実施した。STEC 株等のゲノム解析で汎用される IS-printing System (以下、IS-PS と言う)、パルスフィールド電気泳動法 (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) 0157 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

平成 30 年度から令和 2 年度の各年度に EHEC 0157 菌株 4 株を参加施設に配布し、IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。また、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、PFGE 法及び MLVA 法による解析結果を菌株情報とともに収集し、NESFD の全国の MLVA 情報も参照としながら、比較調査を行った。

IS-PS は、IS-printing System (Version2 : TOYOBO 製) を用いて、取扱説明書に従って実施した。本法の各プライマーにより増幅される産物は、プライマーセット (1st set 及び 2nd set primer) 毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット (Api) の同定コード化になって、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 (以下、IS コードという) し、解析を行った。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。MLVA 法は、実施可能な施設で、それぞれの施設のプロトコールにより実施した。

精度管理は、IS-PS は、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 法は各遺伝子座のリピート数及びダブルピーク時のピーク高を比較解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) 平成 30 年度の結果

IS-PS の精度管理は、10 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 1 に、泳動像は図 1、図 2 に示した。泳動像はいずれの施設もバンドが認識でき、概ね良好であった。IS コードは多くの施設が一致したが、2 施設 (F), (H) では 1st set primer の IS コードが他施設とは異なった。これは、施設 (F) では 1st set primer の菌株 1 の「1-01」、施設 (H) では菌株 2 及び菌株 3 の「1-03」の判定に違いが見られたことによるものであった。PFGE 法の精度管理は、10 施設が参加して実施し、このうち 8 施設でデンドログラム解析を実施した。泳動像は、鮮明さ (解像度) 等の影響もあるが、ほとんどの施設はおおむね良好な泳動像が得られた。一部でバンドが薄くなり判定が困難と考えられるところ (施設 (H)) があったが、バンドパターンを目視により確認し比較したところ、他施設のものと同じであった (図 3)。MLVA 法は 5 施設で実

施した。5施設全て0157株の17カ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2に示した。菌株1の「0157-9」ではリピート数9と標記した施設もあればリピート数9, 13と標記していた施設もあり、施設によって結果の記載が異なった。菌株2及び3の「0157-3」では、施設(E)がリピート数-2(増幅産物なし)であり、他施設とは異なる結果となった。その他の遺伝子座では、各施設でリピート数は一致した。

(2) 令和元年度の結果

IS-PSの精度管理は、9施設が参加して実施した。泳動像はいずれの施設もバンドが認識でき、概ね良好であった。ISコードは多くの施設が一致したが、1施設(H)では1st set primerのISコードが他施設とは異なった。これは、菌株3の「1-03」の判定に違いが見られたことによるものであった。PFGE法の精度管理は、8施設が参加して実施した。泳動像は、鮮明さ(解像度)等の影響もあるが、ほとんどの施設はおおむね良好な泳動像が得られた。一部の施設でバンドが薄くなり判定が困難と思われる場合もあったが、バンドパターンを目視により確認し、比較したところ、他施設のものとは一致していた。また、デンドログラム解析では、類似度の最大値は100%、最小値は65%であった。菌株1と4の類似度は、施設(K)を除いて100%一致していた。菌株2と3で類似度の順序が施設により異なっていた(表3)。MLVA法は9施設で実施した。9施設全て0157株の17カ所の遺伝子座についてリピート数を解析した。その結果を、表4に示した。施設Hでは各菌株の遺伝子座0157-3、0157-34、0157-9、0157-25、0157-17、0157-36、0157-37を共通とする複数の遺伝子座で他施設とは異なる結果

となった。施設Iでは菌株1と4の遺伝子座EH111-11Tでリピート数が判明していなかった。

(3) 令和2年度の結果

IS-PSの精度管理は、8施設が参加して実施した(表5)。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。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。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、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(表6)。MLVA法は9施設で実施した。9施設全て0157株の17カ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7に示した。施設Jでは各菌株の遺伝子座0157-3及び0157-36で他施設とはリピート数が1つずつ異なる結果となった。菌株3は解析領域EHC-5がリピート数8と9のダブルピークが出現する株を使用したが、どの施設もピークの高さに関して、正確にダブルピークを検出していた。

2. 中四国地域のEHEC感染事例発生状況と解析結果

(1) 平成30年度の結果

中四国ブロック内では同一汚染源による広域的な腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかったものの、同一のMLVA型及び同一のMLVAcomplexの株が、中四国ブロック内の複数の自治体で検出される事例も見られ、また、その同一株の検出等により中四国以外の自治体では食中毒として判断された事

例も複数例見られた。例えば、「18m0192、18c035」(MLVA 型、MLVAcomplex の順)の 0157 菌株が中四国ブロック内の 5 自治体で検出された事例があり、東京都内ホテルビュッフェレストラン食中毒関連株として確認された。また、同一 IS コードで同一 MLVAcomplex だが MLVA 型が違う例(接触者)、同一 IS コードだが MLVA 型が違う例も複数見られた。また、026 では同一 MLVA 型であっても PFGE で 6 バンドを超える差も見られた事例もあった。

(2) 令和元年度の結果

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

(3) 令和 2 年度の結果

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ブロックの複数の自治体で検出される事例も多く見られた。また、同一 IS コードだが MLVA 型が違う事例、同一 MLVA 型だが IS コードが違う事例も見られた。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。

D 考 察

平成 30 年度～令和 2 年度に、IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による EHEC 0157 株を用いた精度管理を実施した。その結果、多くの施設で解析結果は良好であったが、一部の施設では他施設と異なった結果となり、技術の習熟、改善及び工夫が必要と思われた。IS-PS では、多くの施設で適正に解析されていたが、一部の施設ではバンド位置の確認ミス等により結果判定を誤っていた。その防止のため、正規のバンドかエクストラバンドかのバンド判定が困難な場合は、必要に応じて再検査の実施、泳動距離が長いゲルを使用する等の工夫をしてバンドの位置確認を正確に行う必要がある。また、研究班が作成した「腸管出血性大腸菌 0157 IS-printing system エキストラバンド集」を参考とすることも重要である。PFGE 法では、ほとんどの施設でおおむね良好な泳動像が得られたが、一部の施設では、部分的にバンドが薄くなり判定が困難と思われる泳動像も見られた。PFGE 法はバンドの位置が解析結果に影響するため、明瞭なバンドが出現するよう、菌液濃度の調整やゲルブロックの操作手技等の継続的な技術習熟が必要と思われた。MLVA 法は、平成 30 年度は 5 施設、令和元年度及び令和 2 年度は 9 施設が実施し、年度を経

るごとに参加施設が増えた。これは、厚生労働省健康局結核感染症課及び厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課の平成30年6月29日の事務連絡「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」による影響等が考えられ、今後ますますMLVA法の利用度が高くなることが予想される。解析結果を共有するための注意点として、遺伝子座におけるダブルピークが出現した場合の記載方法については、事前にルールを明瞭に決めておくことが必要であると考え。特に、各ピークのリピート数やピークの高低等、状況を伝える詳細な結果報告に関するルールが望ましいと考える。また、Binの不適切な設定によって判定ミスの生じた施設も見られた。Binの見直しや設定は適宜継続的に行い、適切に解析できる体制を維持・整備しておくことが必要と考えられた。また、使用したプライマーがTailed Primerであるという認識の不足が、誤った結果に関連したと考えられる事例もあった。MLVA法を導入する施設が増加しており、更に全国的な普及が予想される。MLVA法を導入する施設に対して、技術研修及び本研究成果に基づくMLVA法導入に係る技術的支援並びに導入後の継続的な精度管理の実施が、中四国ブロックにおける検査精度管理体制の強化のためには必要と考えられた。

中四国ブロックで平成30年度から令和2年度に発生したEHEC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、NESFDの全国のMLVA情報も参考として、事例間の比較調査を行った。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、3年間を通じ

て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。同一のISコードであってもMLVA型が異なる事例やISコードが異なってもMLVA型が同じ事例、ISコードは異なるが同じMLVAcomplexの事例もあった。これはIS-PS法の鑑別能がMLVAよりも劣ることによるものと考えられる。026では同一MLVA型であってもPFGEで6バンドを超える差も見られた事例もあった。これらのことから、集団事例の探知や感染源の特定のためには、これらの解析手法による病原体の解析のみでは結論を出すには十分とは言えず、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. 平成30年度～令和2年度に、IS-PS、PFGE法及びMLVA法の精度管理を実施した。いずれの方法においても、概ね良好な結果が得られたが、一部の施設では結果が異なり、解析技術の習熟、改善及び工夫により検査精度の維持・向上の必要があると思われた。
2. 精度管理の実施により、検査精度向上に関する複数の問題点・改善点が明らかとなった。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継続的な精度管理を実施することが必要と考えられた。
3. 集団事例の探知や感染源の特定のためには、病原体の解析のみではなく、患者等の喫食調査・行動調査等の疫学調査結果も加味した総合的判断が重要と思われた。
4. 3年間にわたる本研究により、菌株解析を行う中四国ブロックの地衛研の解析技術の向上を図ることができた。また、IS-

printing System、PFGE 法、MLVA 法による EHEC 分子疫学解析手法の精度管理実施により、サーベイランス技術水準の向上に貢献したものとする。

F. 研究発表
なし。

表 1 EHEC O157 株の IS-PS による精度管理結果 (平成 30 年度)

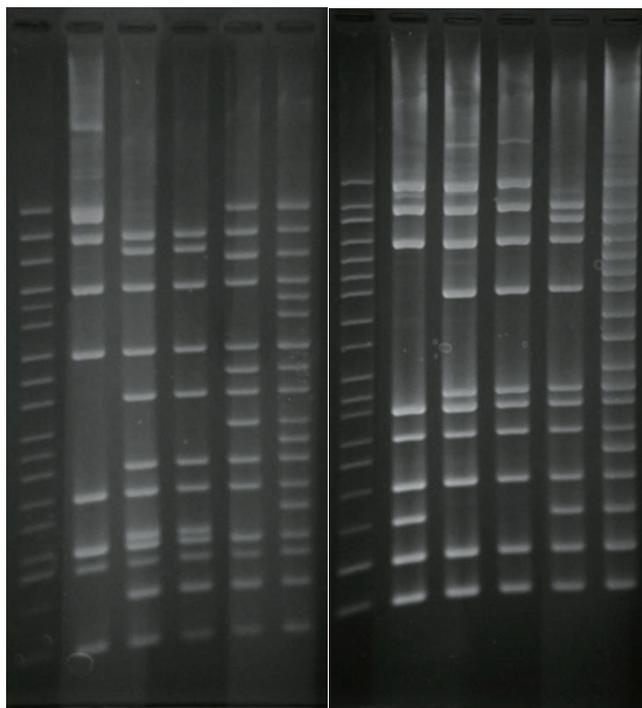
施設名	菌株1		菌株2		菌株3		菌株4	
	1st Primer set	2nd Primer set						
A	-	-	-	-	-	-	-	-
B	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
C	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
D	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
E	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
F	211055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
G	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
H	311055	310457	615457	311656	615457	311656	717557	611657
I	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
J	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657
K	311055	310457	215457	311656	215457	311656	717557	611657

図 1 IS-PS の泳動像の一例 (平成 30 年度)

施設 (F)

1st set

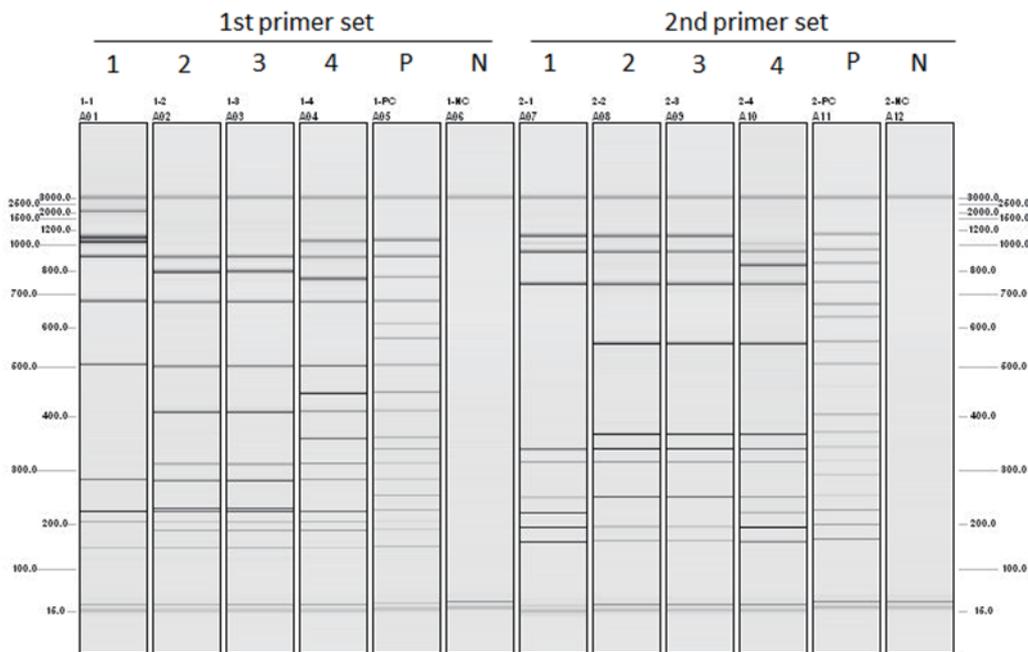
2nd set



1:STEC1
2:STEC2
3:STEC3
4:STEC4
PC:Positive control

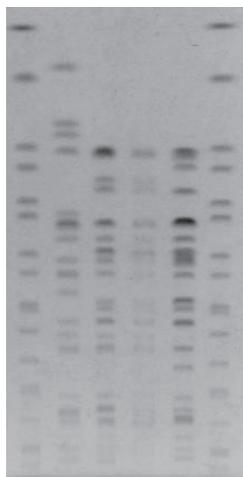
M 1 2 3 4 PC M 1 2 3 4 PC

図2 IS-PS の泳動像の一例 (平成 30 年度)
施設 (H)



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

図3 EHEC O157 株の PFGE 法による精度管理結果の一例 (平成 30 年度) : 施設 (H)
M 1 2 3 4 M



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

表2 EHEC O157株のMLVA法による精度管理結果(平成30年度)

菌株	施設名	遺伝子座															
		EH11-11T	EH11-14	EH11-8	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
1	C	2	-2	1	4	-2	9	7	-2	10	9	13	7	4	10	5	3
	E	2	-2	1	4	-2	9	7	-2	10	9	9	7	4	10	5	3
	F	2	-2	1	4	-2	9	7	-2	10	9	9:13	7	4	10	5	3
	G	2	-2	1	4	-2	9	7	-2	10	9	9:13	7	4	10	5	3
	J	2	-2	1	4	-2	9	7	-2	10	9	13	7	4	10	5	3
2	C	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
	E	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	10	9	2	13	7	4	6
	F	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
	G	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
	J	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
3	C	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
	E	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	10	9	2	13	7	4	6
	F	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
	G	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
	J	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	23	10	9	2	13	7	4	6
4	C	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	8	12	12	8	7	6	3	6
	E	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	8	12	12	8	7	6	3	6
	F	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	8	12	12	8	7	6	3	6
	G	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	8	12	12	8	7	6	3	6
	J	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	8	12	12	8	7	6	3	6

表3 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果デンドログラム解析（令和元年度）

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

= : 左右の菌株で100%一致
 - : 左右の菌株でグループ形成
 ⇒> : 矢印の方向へ類似度が低くなる

表4 EHEC O157株のMLVA法による精度管理結果（令和元年度）

菌株	施設名	遺伝子座																
		EH11-11T	EH11-14	EH11-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
1	A	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	B	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	C	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	E	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	F	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	G	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	H	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	10	11	6	6	6	1	6
	J	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
2	A	2	-2	1	4	-2	7	4	15	-2	10	12	12	5	6	6	8	6
	B	2	-2	1	4	-2	7	4	15	-2	10	12	12	5	6	6	8	6
	C	2	-2	1	4	-2	7	4	15	-2	10	12	12	5	6	6	8	6
	E	2	-2	1	4	-2	7	4	15	-2	10	12	12	5	6	6	8	6
	F	2	-2	1	4	-2	7	4	15	-2	10	12	12	5	6	6	8	6
	G	2	-2	1	4	-2	7	4	15	-2	10	12	12	5	6	6	8	6
	H	2	-2	1	4	-2	7	4	14	-2	9	10	10	4	5	6	6	5
	J	2	-2	1	4	-2	7	4	15	-2	10	12	12	5	6	6	8	6
3	A	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	22	10	10	2	11	6	4	6
	B	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	22	10	10	2	11	6	4	6
	C	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	22	10	10	2	11	6	4	6
	E	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	22	10	10	2	11	6	4	6
	F	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	22	10	10	2	11	6	4	6
	G	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	22	10	10	2	11	6	4	6
	H	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	21	8	8	1	10	6	2	5
	J	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	22	10	10	2	11	6	4	6
4	A	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	B	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	C	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	E	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	F	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	G	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7
	H	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	10	11	6	6	6	1	6
	J	3	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	13	7	7	6	3	7

表5 EHEC O157株のIS-PSによる精度管理結果（令和2年度）

施設名	菌株1		菌株2		菌株3		菌株4	
	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

表6 EHEC O157株のPFGE法による精度管理結果 デンドログラム解析(令和2年度)

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7 EHEC O157株のMLVA法による精度管理結果(令和2年度)

菌株	施設名	運 送 子 座																
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH28-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
STEC01	B	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	C	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
	G	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
	B	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
STEC02	C	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
	G	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
	B	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
	C	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7
STEC03	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
	G	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
	B	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	C	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
	STEC04	E	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7
F		2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7
G		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	10	12	10	5	7	6	7	7
K		2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	11	12	10	5	7	6	8	7
B		2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7

* リピート数「9」にもピークがあったが、「8」のピークが高い

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」

平成 30～令和 2 年度報告書

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
	大羽広宣	北九州市保健環境研究所
	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
	緒方美奈子	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
	成松浩志	大分県衛生環境研究センター
	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
	松本一俊	熊本県保健環境科学研究所
	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
	阿蘇品早苗	熊本市環境総合センター
	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
	宮原聖奈	宮崎県衛生環境研究所
	中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター
	上村晃秀	鹿児島県環境保健センター
	高良武俊	沖縄県衛生環境研究所
	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
	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
	中山志幸	福岡県保健環境研究所
	重村洋明	福岡県保健環境研究所
	大石明	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 型別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、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 型別のデータベースへの登録数は令和 2 年 2 月 10 日現在で 2,157 件であり、毎年 200 件前後の登録で推移していたが、近年、減少傾向にある。これは ISPS 型別のデータベースを活用する地方衛生研究所（以下「地衛研」という。）が減少していると考えられることから、その運用について見直す必要があると考えられる。九州ブロックで平成 30 から令和 2 年度に収集された EHEC は 1,182 株であった。その内訳は、0157 が 540 株と最も多く、腸管出血性大腸菌 026（以下「026」という。）が 275 株、腸管出血性大腸菌 0111（以下「0111」という。）が 78 株、腸管出血性大腸菌 0103（以下「0103」という。）が 77 株、腸管出血性大腸菌 0121（以下「0121」という。）が 75 株の順であった。例年収集される EHEC の O 群血清型に大きな変化は認められなかった。平成 30 年度から令和 2 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例は 38 事例であった。発生場所は、保育所など従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。精度管理はパルスフィールド・ゲル電気泳動（以下「PFGE」という。）、ISPS 及び Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis（以下「MLVA」という。）について実施した。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緊急事例発生時には、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。腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法として汎用されている PFGE 法は一般的な手法であり、全国の地衛研で実施されている。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。また、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。平成 29 年度に発生した 0157 を原因とする広域な感染事例を受け、事案の早期探知、関係部門間の連携及び情報の共有等を目的として分子疫学解析手法を MLVA に統一化されることになった（平成 30 年 2 月 8 日付け健感発 0208 第 1 号及

び薬生食監発 0208 第 1 号)。通知発出後、九州ブロックでも MLVA を導入する地衛研が増加している。

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 型別は、IS の分布に由来する 32 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. 6.1 (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

精度管理については、0157 4 株を参加地衛研に配布した (表 1)。平成 30 年度の精度管理項目は PFGE 及び ISPS を必須項目とした。令和元年度以降の精度管理項目は、PFGE を必須項目とし ISPS 及び MLVA につ

いては、選択項目とした。試験方法には、PFGE、ISPS 及び MLVA 共に各地衛研が通常行っている方法にて行った。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レポ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 型別データベースの運用

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)。ISPS 型別のデータベースを活用してい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、そ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. 九州ブロックでの EHEC 検出状況

九州ブロックの地衛研における EHEC の

0 群血清型別の検出状況について解析した。

九州ブロック 12 地衛研にて平成 30 年 4 月 1 日から令和 2 年 12 月 28 日までに 1182 株の EHEC 菌株が収集された (表 4)。EHEC の流行は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、0157、026、0111、0103 及び 0121 で全体の 8 割以上を占めている。毎年、EHEC は 300 株以上収集されており、毎年一定の流行があることを示していると考えられる。

C-3. EHEC による集団発生事例数

平成 30 年度から令和 2 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例はそれぞれ 8、13、17 事例であった (表 5.1~5.3)。発生場所は保育所など、従来から多発している施設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 は平成 30 年度の時点で導入しているのは 1 地衛研であったが、令和 2 年 11 月末の段階では 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)

平成 30 年度の PFGE の精度管理において、検体 1 と検体 2 は、同じ菌株なので関連性は一致しなければならないが、参加した 12 地衛研中 6 地衛研において、回答が

異なっていた (表 7.1)。

令和元年度の PFGE の精度管理において、問題に対する回答のうち、同じ菌株である検体 1 と検体 2 の関連性については、参加した 12 地衛研で一致した (表 7.2)。

令和 2 年度の PFGE の精度管理において、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 7.3)。

PFGE 法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に必要な標準的な手段である。その一方で、迅速性に優れず、画像による情報共有は①解析に手間がかかる、②解析を実施する担当者によって解析結果が異なるなどの難点がある。腸管出血性大腸菌 0157 の遺伝子型別には IS629 によるゲノム構造多型を利用した、遺伝子型別手法である ISPS が広く用いられている。この手法は、①迅速であること、②数値化が容易であることが最大の利点であり、九州ブロックでは、この利点を生かし、平成 22 年より共有データベースを用いたリアルタイムな情報共有を実施している。ISPS 遺伝子型別結果の共有においては、各施設において正確に数値化されていることが、データの信頼性を確保する上で非常に重要となる。そこで九州ブロックでは、検査技術の維持・向上と正確な数値化を行うためのトレーニングを目的とし、精度管理を実施している。ISPS では、標的領域に起きた挿入、または、欠失が原因で現れる「明瞭なエキストラバンド」が観察されることが知られている。これらのエキストラバンドを正しく判定できることが重要である。

平成 30 年度は、Set-1 の 1-02 と 1-03 の間にエキストラバンドが現れる株を選択した (図 4.1)。令和元年度はエキストラバンドがない株を使用した (図 4.2)。令和 2

年度は 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 4.3)。ISPS の精度管理の結果を表 8 に示す。エキストラバンドがない株を用いた令和元年度の精度管理においては、参加した全ての地衛研で誤判定は認められなかったが、エキストラバンドがある平成 30 年度及び令和 2 年度の精度管理においては誤判定が認められた(表 8)。

令和元年度から MLVA の精度管理を実施した。各年度の精度管理に使用した菌株の MLVA 型を表 9 に示す。令和元年度は 3 株が同じ MLVA 型を示すもの、令和 2 年度は全て異なる MLVA 型を示すものを用いた。精度管理の結果、一部の地衛研において、EHC-5、EHC-6、EHC-2、0157-34、0157-17 の各ローカスで誤判定が認められた(表 10)。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、研修や精度管理を実施し技術レベルの維持・向上に努める必要があると考えられる。

D. 結論

九州ブロックにおいて、EHEC は毎年 300 株以上収集されており、EHEC を原因とする集団発生事例も毎年確認されている。このことから、毎年、一定の流行があると考えられる。また、平成 29 年に惣菜チェーン店で発生した 0157 を原因とする分散型広域食中毒事件(ディフューズアウトブレイク)も発生していることから、今後もサーベランスを継続して行う必要がある。

九州ブロックにおける 0157 の IS 型別のデータベースへの登録数は、近年、減少傾向にある。これは、ISPS 型別データベースを活用している地衛研が減少していること、さらに、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ことが原因と考えられる。今後、ISPS のデータベースの運用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. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 中山志幸、重村洋明、カール由起、江藤良樹、濱崎光宏、世良暢之；福岡県における愛玩動物の *Capnocytophaga* 属菌の保有状況調査。第 71 回日本細菌学会九州支部総会(2018 年 9 月、福岡県)
- 2) 濱崎光宏；病原体検査における精度管理について。第 45 回九州衛生環境技術協議会特別講演(2019 年 10 月、長崎県)
- 3) 杉岡由美子、濱崎光宏、吉田弘；九州ブロック内における遺伝子解析装置に関する技術管理研修について。第 78 回日本公衆衛生学会総会(2019 年 10 月、高知県)
- 4) 濱崎光宏、杉岡由美子、近藤芳樹、吉田

弘、調恒明；「検査プロセスの改善
(KAIZEN)に向けたワークショップ」
の開催について. 第33回公衆衛
生情報研究協議会総会・研究会

(2020年1月, 埼玉県)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 精度管理に用いた菌株

年度	試料名	菌株名	血清型	毒素型	MLVA型 (感染研)
平成30年度	検体1	16E019	0157:H-	<i>stx</i> ₁	13m0242
	検体2	16E019	0157:H-	<i>stx</i> ₁	13m0242
	検体3	16E081	0157:H-	<i>stx</i> ₁	13m0242
	検体4	17EC039	0157:H7	<i>stx</i> ₁	17m0229
令和元年度	検体1	19EC021	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	18m0249
	検体2	19EC021	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	18m0249
	検体3	19EC022	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	18m0249
	検体4	19EC037	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	19m0278
令和2年度	検体1	19EC076	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	19m0534
	検体2	19EC077	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	19m0555
	検体3	19EC086	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	20m0034
	検体4	19EC031	0157:H7	<i>stx1+stx2</i>	16m0399

事例
管内の施設で腸管出血性大腸菌0157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0157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0157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 九州地区の地衛研における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 九州地区で登録数が多い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		

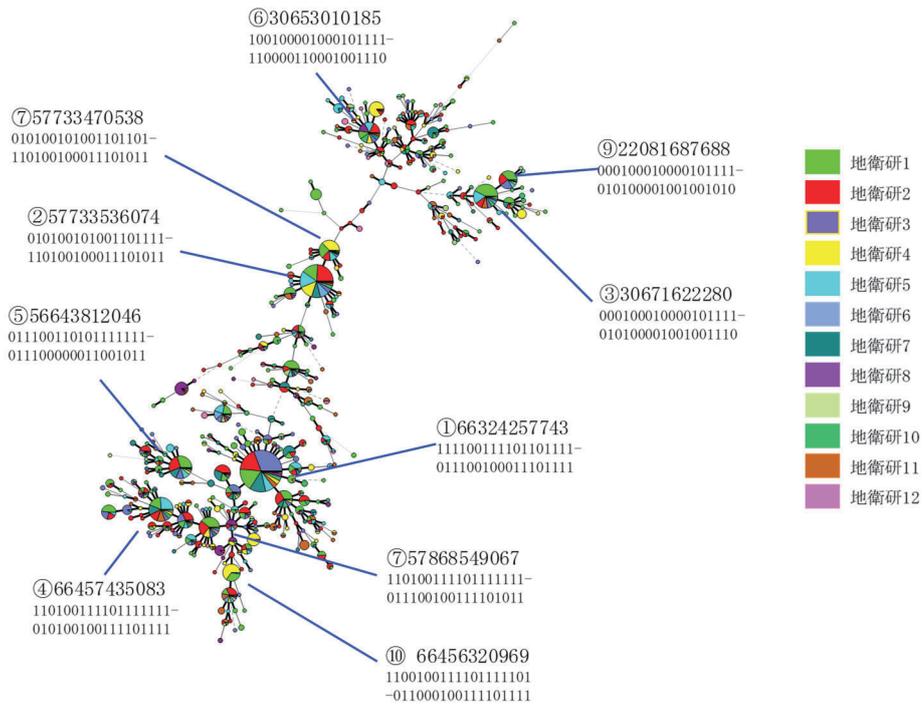


図2.1 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree (地衛研別)

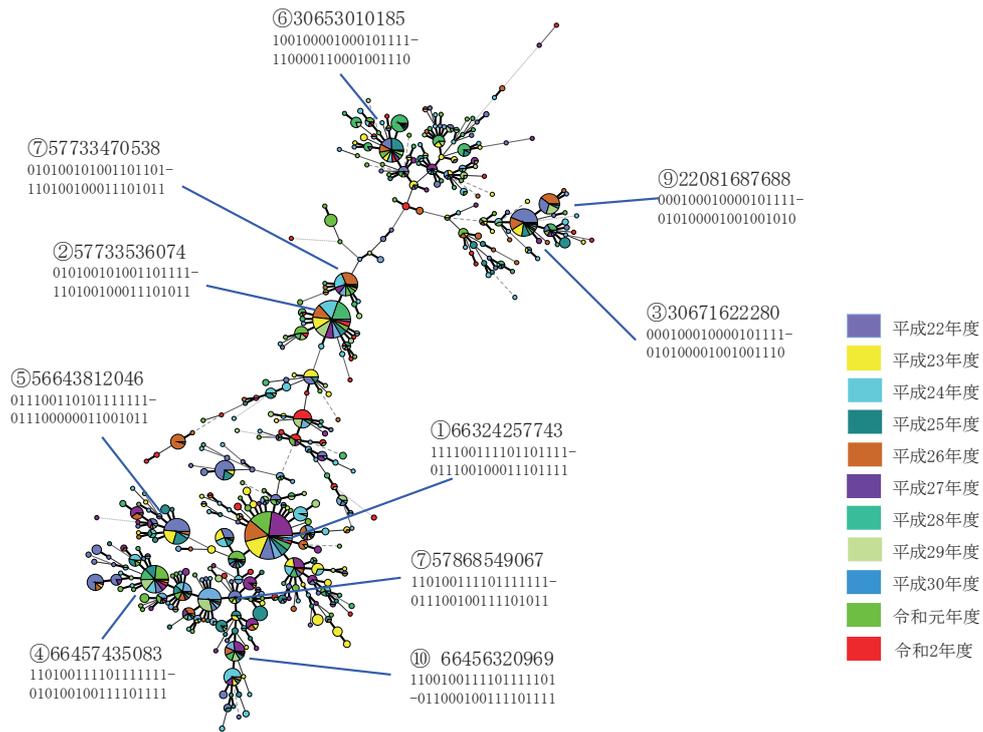


図2.2 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4 平成30年度から令和2年度にかけて九州ブロックの地衛研で収集されたEHECの主な血清型と株数

	O血清型別の分離菌株数													計
	0157	026	0111	0103	0121	091	0115	0145	0146	0165	05	08	その他	
平成30年度	140	80	22	7	39	6	2	2		1	1		20	320
令和元年度	246	114	42	20	11	10	4	2	2	2		1	23	477
令和2年度	154	81	14	50	25	3	4	3	1		3	4	43	385
計	540	275	78	77	75	19	10	7	3	3	4	5	86	1182

表5.1 平成30年度に九州ブロックの地衛研で確認されたEHECの集団発生事例数

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
4	1	0157: H7	<i>stx₁</i> + <i>stx₂</i>	障害者施設	21	2
5	1	026: H11	<i>stx₁</i>	保育所	158	11
	2	0111: H-	<i>stx₁</i>	保育所	148	8
	3	0121: H19	<i>stx₂</i>	家庭内	7	5
7	1	0121	<i>stx₂</i>	保育所	122	21
10	1	026: H11	<i>stx₁</i>	保育所及び家庭	41	14
11	1	0111: H-	<i>stx₁</i> + <i>stx₂</i>	障害者福祉施設	40	4
12	1	026	<i>stx₁</i>	保育所	3	3

表5.2 令和元年度に九州ブロックの地衛研で確認されたEHECの集団発生事例数

地衛研No.	事例No.	血清型	毒素型	発生場所	被験者数	陽性者数
1	1	0157: H7	<i>stx₁+stx₂</i>	飲食店	9	3
	2	0157: H7	<i>stx₁+stx₂</i>	飲食店	18	4
	3	0157: H7	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	192	15
4	1	0157: H7	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	281	21
	2	026: H11	<i>stx₁</i>	保育所	343	41
	3	0157: H7	<i>stx₂</i>	保育所	98	12
5	1	0157: H7	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	131	17
6	1	026: H11	<i>stx₁</i>	家庭内	327	3
7	1	0157: H7	<i>stx₁+stx₂</i>	飲食店	10	10
8	1	026: H11	<i>stx₁</i>	保育所	10	2
	2	26	<i>stx₁</i>	保育所	61	14
	3	26	<i>stx₁</i>	家庭内	57	2
10	1	111	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	129	23

表5.3 令和2年度に九州ブロックの地衛研で確認されたEHECのC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	<i>stx₂</i>	保育所	100	13
2	1	026: H11	<i>stx₁</i>	保育所	141	17
5	1	0157: H-	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	105	4
	2	0157: H7	<i>stx₂</i>	保育所	121	23
	3	0157: H7	<i>stx₂</i>	保育所	108	8
	4	0103: H2	<i>stx₁</i>	保育所	179	14
6	1	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	4	2
	2	026: H-	<i>stx₁</i>	保育所	160	4
	3	0121: H19	<i>stx₂</i>	保育所	145	16
7	1	OUT	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	39	4
	2	0157	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	93	2
8	1	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	34	2
	2	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	5	2
	3	0157: H7	<i>stx₂</i>	家族内	33	3
	4	0157: H7	<i>stx₂</i>	家族内	5	2
12	1	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	2	2
	2	0103: H2	<i>stx₁</i>	家族内	2	2

表6 EHECの分子疫学解析手法の実施地衛研数*1 (導入予定数)

	平成30年度	令和元年度	令和2年度
PFGE	12	11 (1) *2	12
ISPS	12	11 (1) *2	12
MLVA	1 (8) *2	4 (5) *2	5 (3) *2

*1:九州ブロック内の地衛研数は12施設

*2: () 内は導入予定地衛研数

表7.1 PFGE精度管理結果（平成30年度）

地衛研	問1		問2		問3	
	関連性	異なるバンド数	関連性	異なるバンド数	関連性	異なるバンド数
1	一致	0本	関係する可能性がある	5本	不一致	11本
2	密接に関係	1本	密接に関係	3本	不一致	9本
3	密接に関係	1本	密接に関係	1本	不一致	6本
4	密接に関係	1本	関係する可能性がある	4本	不一致	13本
5	密接に関係	2本	密接に関係	2本	不一致	8本
6	一致	0本	密接に関係	3本	不一致	8本
7	関係する可能性がある	5本	不一致	9本	不一致	11本
8	一致	0本	関係する可能性がある	5本	不一致	7本
9	一致	0本	密接に関係	2本	不一致	8本
10	一致	0本	密接に関係	2本	不一致	7本
11	一致	0本	密接に関係	2本	不一致	8本
12	密接に関係	2本	不一致	8本	不一致	11本

表7.2 PFGE精度管理結果（令和元年度）

地衛研	問1		問2		問3	
	関連性	異なるバンド数	関連性	異なるバンド数	関連性	異なるバンド数
1	一致	0本	関係する可能性がある	4本	関係する可能性がある	6本
2	一致	0本	密接に関係	2本	関係する可能性がある	6本
3	一致	0本	密接に関係	1本	関係する可能性がある	5本
4	一致	0本	関係する可能性がある	4本	関係する可能性がある	5本
5	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	5本
6	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	5本
7	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	6本
8	一致	0本	関係する可能性がある	4本	不一致	8本
9	一致	0本	密接に関係	2本	関係する可能性がある	6本
10	一致	0本	密接に関係	3本	関係する可能性がある	4本
11	一致	0本	密接に関係	2本	密接に関係	3本
12	一致	0本	関係する可能性がある	4本	不一致	7本

表7.3 PFGE精度管理結果（令和2年度）

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

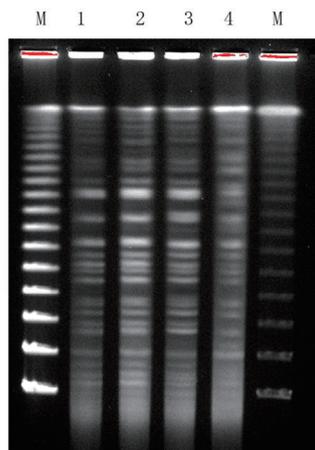


図3 制限酵素による消化が不十分と考えられるPFGE写真の例

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

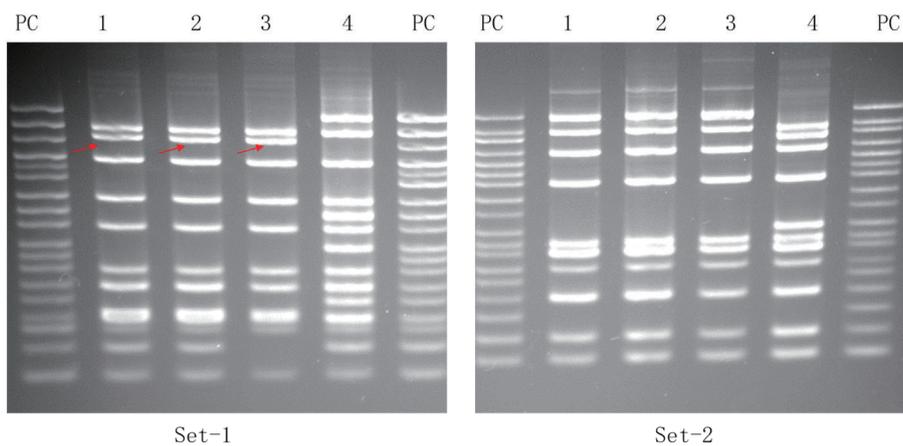


図4.1 ISPSの精度管理に使用した株の電気泳動写真
(平成30年度)

→：エクストラバンドの位置、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

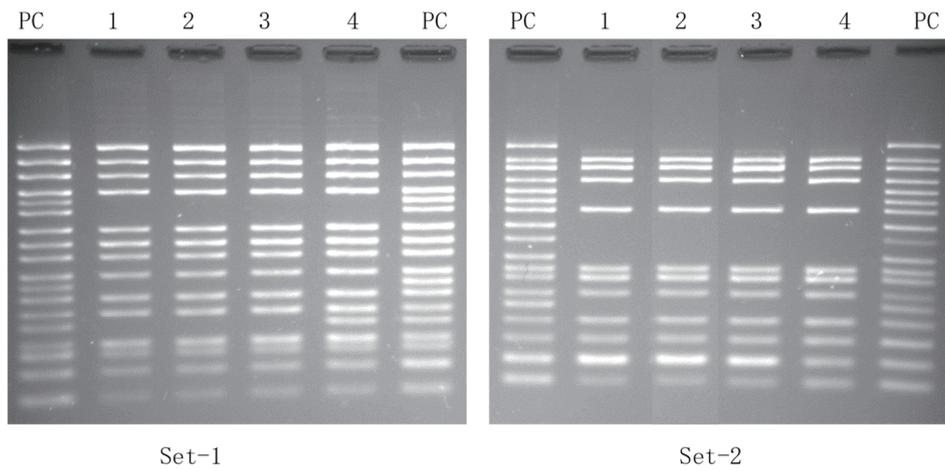


図4.2 ISPSの精度管理に使用した株の電気泳動写真
(令和元年度)

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

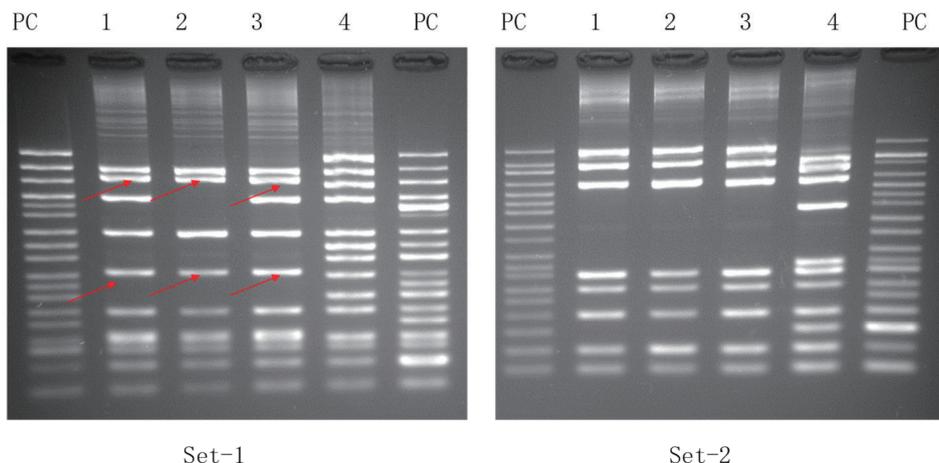


図4.3 ISPSの精度管理に使用した株の電気泳動写真
(令和2年度)

→ : エキストラバンドの位置、PC : 陽性コントロール、レーン1 : 検体1、
レーン2 : 検体2、レーン3 : 検体3、レーン4 : 検体4、

表8 平成30年度から令和2年度に実施したISPSの精度管理結果

	参加地 衛研数	誤判定なし		備考
		無し	有り	
平成30年度	12	7	5	エキストラバンドがある菌株を使用。 菌株が輸送中に変異したものが認められた。
令和元年度	10	10	0	エキストラバンドがない菌株を使用。
令和2年度	9	5	4	エキストラバンドがある株を使用。

表9 精度管理に使用した菌株のMLVA型

検体	MLVA型 (感染研)	EH111	EH111	EH111	EH157	EH26	EHC	EHC	EHC	EHC	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	
		-11	-14	-8	-12	-7	-1	-2	-5	-6	-3	-34	-9	-25	-17	-19	-36	-37	
令和元年度	菌株1	18m0249	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6
	菌株2	18m0249	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6
	菌株3	18m0249	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	12	8	12	12	8	7	6	3	6
	菌株4	19m0278	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	9	11	12	7	8	6	3	6	
令和2年度	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	9	12	12	7	7	6	3	6	

表10 令和元年度から令和2年度に実施したMLVAの精度管理結果

	参加地 衛研数	誤判定なし		誤判定が見られたローカスと地衛研数				
		無し	有り	EHC	EHC	EHC	0157	0157
				-2	-5	-6	-34	-17
令和元年度	5	4	1					1
令和2年度	7	4	3	1	2	2	1	

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成30-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
泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真	2017年に分離された腸管出血性大腸菌のMLVA法による解析	IASR	39	81-82	2018
泉谷秀昌	腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について	獣医公衆衛生研究	20	6-11	2018
泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真	2018年に分離された腸管出血性大腸菌のMLVA法による解析	IASR	40	81-82	2019
泉谷秀昌	腸管出血性大腸菌の分子疫学解析 (MLVA法) について	食品衛生学雑誌	60	J7-8	2019
泉谷秀昌	広域散発事例探知に向けた取り組み	日本食品微生物学会雑誌	36	10-12	2019
泉谷秀昌	腸管出血性大腸菌～分子疫学解析を利用した病原体サーベイランス	感染制御と予防衛生	3	75-80	2019
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
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
Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M	Effective surveillance using multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157.	Appl Environ Microbiol	85	e00728-19	2019