

別紙1

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究

令和2～4年度 総合研究報告書

研究代表者 明田 幸宏

令和5（2023）年 5月

別添 2

目 次

I. 総合研究報告

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究 . . . . . 1

明田幸宏

腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発 . . . . . 14

林 哲也

感染症発生動向調査 (NESID) をベースとした腸管出血性大腸菌感染症を原因とする広域食中毒探知と対応の取り組み . . . . . 20

砂川富正

食品由来株の収集 . . . . . 23

工藤由起子

動物由来株の収集と分子型別 . . . . . 27

寺嶋 淳

反復配列多型解析法の有効性の検証・精度管理手法の確立 . . . . . 50

平井晋一郎

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 88

厚生労働省科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業  
「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」  
(20KA0501)  
総合研究報告書

研究代表者

明田幸宏 (国立感染症研究所)

研究分担者

林哲也	(九州大学大学院医学研究院細菌学分野 教授)
砂川富正	(国立感染症研究所実地疫学研究センター センター長)
工藤由起子	(国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 部長)
寺嶋 淳	(岩手大学農学部共同獣医学科 教授)
平井晋一郎	(国立感染症研究所感染症危機管理研究センター主任研究官)

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli* : EHEC) のサーベイランスにおいて、現在、主に反復配列多型解析 (multi locus variable tandem repeat analysis : MLVA) 法が使われている。MLVA データを基盤とするため継続的に全国の EHEC 分離株を解析した。2020-2022 年の間に約 7700 株について MLVA による型別を実施し、厚生労働省 NESFD において MLVA リストの基盤データを提供した。また、血清群 O157、O26、O111 については地方衛生研究所から直接 MLVA データが送付され MLVA 型の付与が行われている。2020-2022 年の間に約 2200 株について解析し型名を付与した。このうち約 6 割の株について感染研でも MLVA 法による解析を行い、データの精度確認を行った。

国内 EHEC のサーベイランスを全ゲノム配列解析で効率的に行うために、core genome single nucleotide polymorphism (cgSNP) および core genome multilocus sequence typing (cgMLST) パイプラインを構築するとともに、国内株ゲノムデータのデータベース化を行った。同パイプラインを用いることで、新たに EHEC 分離株ゲノムが得られた際に、国内外の大腸菌ゲノムとの比較解析を迅速に行える体制が確立した。加えて、同環境を地方衛生研究所にも試験的に導入した。また、Oxford Nanopore 社 (ONT) シークエンサーによるデータ解析を地方衛生研究所と協同して行った。この結果、全ゲノム配列解析をサーベイランス等で用いる際の課題として、データおよび解析手法の共有、ONT データの解析法の確立が必要であることが明らかとなった。

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) のサーベイランスではこれまでパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) が主要な解析手法であったが、2018年6月29日付の厚生労働省事務連絡「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、反復配列多型解析 (multi locus variable tandem repeat analysis : MLVA) 法が血清群 O157、O26、O111 の統一手法として用いられている。本研究では全国の MLVA による解析結果の総括並びに、事務連絡に基づいて送付された地方衛生研究所からの MLVA データについて解析を行った。

近年、EHEC 菌株の解析にゲノム配列 (whole-genome sequence : WGS) が広く用いられており、Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) などの公共データベースには25万件以上の大腸菌ゲノム情報が登録されている。また、感染研・細菌第一部ではこれまでに9,000株以上のEHECゲノムを解読しているが、それらゲノム既読株と新規ゲノムとの網羅的な比較には、数日単位での時間がかかるなどの課題があった。そこで、新規ゲノムを入手した際に国内外の大腸菌ゲノムと迅速な比較解析を可能にする手法の確立を行った。さらに、最適な単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) 解析条件を明らかにする目的で、参照配列と解析するデータセットといった条件が型別能に与える影響について、EHEC O76:H7 および O111:H8 の WGS データをもとに検討し

た。

また近年、多くの地方衛生研究所において次世代シーケンサーが導入されたが、Oxford Nanopore 社 (ONT) シーケンサーについては、SNP 等を用いた菌株間の関連性解析の知見が少ない。そこで、沖縄県衛生環境研究所 (沖縄衛研) と協同して、ONT データを用いた病原性大腸菌事例の解析を行った。さらに、イルミナシーケンサーによるデータも含めた情報解析環境の構築を、沖縄衛研にて試験的に行った。

## B. 研究方法

### MLVA 法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研に送付された腸管出血性大腸菌2020年~2022年分離株に対して MLVA 法により解析した。方法は Izumiya ら (2008、2020) の方法に従って実施した。血清群 O157、O26、O111 については17か所、O103、O121、O145、O165、O91 については43か所の遺伝子座を用いた。地方衛生研究所から MLVA 型付与のために送付された MLVA データ (血清群 O157、O26、O111) も併せて解析を行った。

### 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発

Core genome (cg)SNP は、解析時に供試する全株に共通する領域 (コアゲノム) を抽出する必要があるため、計算機への負荷が高く、時間がかかるため、snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>) および BactSNP (<http://platanus.bio.titech.ac.jp/bactsnp>) を

組み合わせた解析パイプラインを構築した。事前の検討では、snippy は再解析が容易であるものの一部のデータで多数の SNP を誤って検出することが示されている。一方、BactSNP は精度の高い SNP 抽出が可能であるものの、SNP のデータベース化や数百株以上の解析が困難であった。そこで、BactSNP で得られた SNP 情報を snippy で利用できる形に変換するプログラムを作製することで、高精度な SNP のデータベース化と迅速な再解析が可能となるパイプラインを構築した。一方、cgMLST は大腸菌の大部分の株が保有する 2,513 遺伝子を対象とした MLST であり、Enterobase 上で手法が公開されている。そこで、各遺伝子のアリアル情報をダウンロードし、BLAST 解析をベースにした自製 cgMLST 解析パイプラインの構築を行った。以上のパイプラインを利用し、これまでに細菌第一部で WGS を解読した EHEC 計 2,248 株の cgSNP および cgMLST データベース化を行った。さらに、新たに EHEC のゲノム情報が得られた際に、迅速に国内外の大腸菌ゲノムとの比較を容易にするパイプライン構築を行った。

### EHEC 調査における最適な SNP 解析法の検討

EHEC O76:H7 および O111:H8 の菌株を対象に、より高精度な SNP 解析法の検討を行った。SNP 解析時には、参照配列および解析を行うデータセットが重要と考えられたため、それぞれに複数の条件を設けて解析を行った。O76:H7 では、参照配列として、近縁 (O76:H7 JNE132847

株の完全長ゲノム配列) または遠縁 (O157:H7 Sakai 株) の 2 株を用いた。データセットとしては、多様な大腸菌を含む 34 株 (O76:H7 8 株を含む) または O76:H7 8 株のみでの解析、の 2 条件で行った。O111:H8 の解析では、計 878 株分のゲノムデータを用いた。この中には 79 事例のクラスター (疫学関連のある事例) が含まれており、このうち 10 株以上のクラスター 15 事例を対象とした。参照配列としては、O111:H8 の代表株 (11128 株)、クラスター内の株、または O157:H7 Sakai 株の 3 種を用いた。データセットとしては、O111:H8 878 株をまとめて解析、またはクラスター内の株のみで解析、の 2 条件を設けた。SNP 解析は、1 年度目で確立した BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインを用いて行った。

### 地方衛生研究所と協同した WGS 解析

沖縄県で 2022 年に発生した腸管病原性大腸菌 (EPEC) O153 感染事例について、協同して WGS 解析を行った。本事例では、家族内感染 2 株および散発例 1 株が近い時期に分離されていた。そこで、沖縄衛研にて 3 株のゲノム DNA を抽出し、Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore) でライブラリー抽出した後に、MinIONにて R9.4 のフローセル (Oxford Nanopore) を用いてシーケンス解析を行った。得られた Fast5 ファイルを感染研に送付後、Guppy basecallerにて、3 種のモデル (Rapid, High accuracy, Super accuracy) でベースコールを行った。それぞれの条件で得られた FastQ ファイルを用いて、Tricyclerにてアセンブリを行った。アセンブリによ

って得られたコンプリートゲノムから ART を用いて疑似ショートリードを作製し、Lee ら (2021. Emerg Infect Dis 27:1509-1512) の方法を用いて cgSNP を抽出した。また、解析を行った 3 株については、MiSeq (Illumina) でも全ゲノム配列の解読を行った。上記と同様の方法で cgSNP を抽出し、ONT データによる結果との比較を行った。

### 地方衛生研究所における WGS 解析環境の構築

沖縄県衛生環境研究所における WGS 解析環境を構築するために、同所のワークステーションへの Linux 仮想環境の構築および感染研・細菌第一部使用プログラムのインストールおよび動作確認を行った。

### C. 研究結果

#### MLVA 法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研細菌第一部において、2020-2022 年分離株 7665 株について分子型別解析を実施した。このうち 6695 株について MLVA 法による解析を実施した。解析依頼施設数は 102 施設であった。各血清群における株数、同定された型数は以下のとおりであった。O157: 4373 株、1644 型; O26: 1266 株、501 型; O111: 363 株、176 型; O103: 384 株、121 型; O121: 120 株 59 型; O145: 70 株、37 型; O165: 17 株 15 型; O91: 102 株、83 型。得られたデータは毎年 5 月号の IASR の EHEC 特集号において公表された。

2020-2022 年分離株について、MLVA 型

別を実施しデータを感染研に送付した地方自治体は、36 施設であった。感染研において統一型名を付与した菌株数は 2209 株であった。このうち 1323 株については、菌株が感染研に送付された。感染研の結果と比較し精度確認が行われた。感染研の結果と一致したものは 93%であり、それ以外の株もほとんどすべてが 1 遺伝子座違いであった。

2014-2021 年に発生した集団事例のうち、菌株数 10 以上の事例 106 件、約 2600 株について、各事例内で各遺伝子座の標準偏差を算出した。その分布から、事例内におけるリピート数の変動は EHC-6、O157-37 を除きほとんどなく、95 パーセントイル値で 0.4 以下であった。EHC-6 は 5.9、O157-37 は 2.2 であった。

#### 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発

BactSNP および snippy を利用した解析パイプラインの構築により、SNP のデータベース化が可能となった。SNP の抽出には 1 株あたり 20 分程度を要する。既に SNP 情報が存在する株を対象とした再解析では、100 株の解析が 19 秒、500 株の解析が 75 秒で可能であった。また、cgMLST 解析では、98%がデータベース上に同一型が存在しない新規 ST となった。cgSNP および cgMLST データベース化を行った 2,248 株の血清型は、表 X1 のような割合であった。

#### EHEC 調査における最適な SNP 解析法の検討

O76:H7 を用いた解析における条

件ごとの最尤法系統樹を図 X1 に示す。最も型別能が高い（系統樹の枝の長さが長い、株間の SNP 数が多い）条件は、参照配列として O76:H7 を参照配列として用い、同血清型のみで解析を行った場合であった（図 X1D）。しかし、O76:H7 を参照配列として用いた場合でも、遠縁な株を含めて解析した場合には最も型別能が低くなった（図 X1C）。一方で、参照配列が別血清型（O157:H7 Sakai）であっても、O76:H7 のみで解析を行った際には、2 番目に高い型別能となった（図 X1B）。

O111:H8 の解析では、同血清型代表株を参照配列として全株を解析した条件を基準に、他の条件との比較を行った。その結果、クラスター内の株のみで解析した場合には参照配列が代表株の場合でも、クラスター内の場合でも SNP 数の増加分に大きな違いは見られなかった（図 X2）。一方で、参照配列を別血清型（O157:H7 Sakai）とした場合には、参照配列が O111:H8 代表株である場合と比べて型別能が劣る例も認められた。

#### 地方衛生研究所と協同した WGS 解析

Oxford Nanopore シークエンサーによるデータを解析した結果、ベースコールモデルによって結果が大きく異なっていた（図 X3）。すなわち、精度が最も低い Rapid によるベースコールでは、最も多数の SNP が認められた。精度が中間の High accuracy および精度が最高の Super accuracy によるデータでは、菌株 22-13 および 22-18 間の SNP の数は同一であり、ゲノム中の位置も概ね同一であった。High accuracy では 22-17 および 22-18 間

の SNP は検出されなかったが、Super accuracy では両株間に 2 カ所の SNP が認められた。イルミナシークエンサーによる cgSNP 解析では、22-13 および 22-17/22-18 間で 2 カ所の SNP が認められた。22-17 および 22-18 間での差異は認められなかった。これらの SNP の位置は、ONT における High accuracy データと概ね一致していた。各条件で得られたコンプリート配列を比較したところ、Super accuracy およびイルミナ（ONT データで得られた配列をイルミナデータで修正した配列）によって得られた配列間では 47 か所、High accuracy およびイルミナ間では 241 か所の違いが認められた。これらの大部分はホモポリマー（同一塩基が連続する配列）上に存在していた。

#### 地方衛生研究所における WGS 解析環境の構築

沖縄衛研の解析ワークステーションに、基本的な WGS 解析（アセンブリおよび cgSNP 解析）を行うことが可能な環境を構築した。同環境は、現在沖縄衛研においてセレウス菌等の食中毒調査に活用されている。

#### D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は 3 年間で 7000 株を超えた。解析結果は定期的に厚生労働省 NESFD に MLVA リストとして掲載された。地方衛生研究所から送付された MLVA データは 3 年間で 2200 株余りに上った。このうち 6 割の株が後日感染研に送付され、感染研で実施した MLVA データと比較された。結果として

は 93%が一致し、一致しなかった株についても 1 若しくは 2 遺伝子座の違いのみであった。これらの地衛研については技術的な問題は概ねないと考えられた。MLVA データ送付にあたっては、地衛研におけるデータの信頼性が重要であり、今後も引き続きモニタリングしていく必要がある。

集団事例内の MLVA のリピート数のばらつきはほとんどなく、95 パーセントイル値で 0.4 以下であった。95 パーセントイル値が高かった EHC-6 と O157-37 はプラスミドにあるとされる遺伝子座で、当該座位の欠失などの影響から変動が大きかったことが推察された。これ以外の遺伝子座については集団事例内でほとんど変化しないことが示唆され、今後のデータ解析の指標になることが期待される。

cgSNP および cgMLST 解析手法の確立を行い、国内 EHEC 計 2,248 株の WGS データのデータベース化を行った。本手法によって、新たに集団感染株等が得られた際に迅速に近縁株を抽出することが可能となった。特に、O157 以外の血清型では MLVA が利用可能でない O 群や、利用可能な O 群であっても十分な型別能を有さない事例が存在する。そのような事例では、WGS 解析が特に有効であると考えられる。

サーベイランスに用いる SNP 解析法の検討では、近縁な株を参照配列とし、近縁な株のみで解析することでより型別能の高い解析が行えることが示された。O111:H8 の解析からは、参照配列として用いるのが同一血清型であれば、クラスター内の株を参照配列として用いた場

合と比べて同等の型別能が認められることが明らかとなった。完全長ゲノム配列を参照配列に用いることの利点は、組換え領域等をエラーが起りやすい領域をより正確に除けることであるが、本解析では型別能に大きな影響は与えなかった。また、用いるデータセットの影響は、参照配列の影響よりも大きいことが O76:H7 の解析から明らかとなった。これは、遠縁な株を解析に含めることでコアゲノムサイズが小さくなる結果であると考えられる。このため、cgSNP のデータベース化では参照株を EHEC O157 Sakai 株に統一しているが、解析菌株を限定することで cgSNP の減少を最小限にとどめることができることが示された。集団感染等の調査の際には、まず cgSNP データベースを用いた全体的な系統解析を行い、次に近縁株を参照配列として解析をすれば、効率的で精度の高い解析が行えることが明らかとなった。

地方衛生研究所と協同した WGS 解析の結果、ONT シークエンサーによって得られたデータは、High accuracy または Super accuracy のベースコールを行うことで、イルミナデータと同等の cgSNP 解析が行える可能性が示唆された。ONT によるデータは精度が低いとされる。実際にホモポリマー部分ではイルミナデータとの齟齬が認められたが、このような部分は insertion/deletion (indel) とされ cgSNP 解析には含まれない。このため、cgSNP 解析結果には影響がなかったと考えられる。今後、より多数の事例の解析によって、ONT データ解析の妥当性を評価する必要がある。一方、ONT データは容量が非常

に大きい（数 G byte 以上）ため、送付時にデータが破損する例が見られた。このため、地方衛研である程度の解析を行った後に情報を共有するのが効率的と考えられた。

データ解析環境の構築では、感染研・細菌第一部で使用中のプログラムのインストールを行ったが、一部専門知識が必要であり、情報解析に慣れない担当者が行うのは困難であることが判明した。今後、より簡易に解析環境を構築可能な体制を整える必要がある。

## E. 結論

MLVA 法は迅速性、精微性に優れた分子型別手法であり、MLVA リストを共有することで広域食中毒等の早期探知に有効である。地衛研から送付される MLVA データは迅速性の向上に重要であり、今後も当該データの信頼性確保のため、モニタリング等の方策が必要である。

本研究では、国内 EHEC ゲノムのデータベース化と国内外データベース株との効率的な比較解析パイプラインの構築を行った。今後、地方衛生研究所とも協同して、データ、解析手法の共有化や同手法の検証を行っていく必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 誌上発表

1. Kimata K, Lee K, Watahiki M, Isobe J, Ohnishi M, Iyoda S. Global distribution of epidemic-related Shiga toxin 2 encoding

phages among enteroaggregative *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2020 Jul 16;10(1):11738. doi: 10.1038/s41598-020-68462-9.

2. Kato H, Yahata Y, Hori Y, Fujita K, Ooura N, Kido T, Yoshimoto K, Matsui T, Izumiya H, Ohnishi M, Oishi K. A shigellosis outbreak associated with a sports festival at a kindergarten in Kitakyusyu City, Japan. *J Infect Chemother*. 2020 Jul 2:S1341-321X(20)30191-4. doi: 10.1016/j.jiac.2020.06.005.

3. Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, Ohnishi M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis 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. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.095.

4. Nakamura K., Seto K., Lee K., Ooka T., Gotoh Y., Taniguchi I., Ogura Y., Mainil J. G., Piérard D., Harada T., Etoh Y., Ueda S., Hamasaki M., Isobe J., Kimata K., Narimatsu H., Yatsuyanagi J., Ohnishi M., Iyoda S., and Hayashi T. Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25. 2023. *Microbial genomics* 9.

5. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2020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42巻、96-97、2021年5月

6. 李謙一、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：国内で分離された腸管出血性大腸

菌の全ゲノム配列データベース化と食中毒事例の解析. IASR、第42巻、97-98、2021年5月

7. 泉谷秀昌, 李 謙一, 伊豫田 淳, 大西 真. 2021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43巻、108-109、2022年5月

## 2) 学会発表

1. 李 謙一, 綿引正則, 磯部順子, 大西 真, 伊豫田 淳, 大規模集団感染由来O104:H4と同一のStx2aファージを有する志賀毒素産生性腸管凝集性大腸菌 (Stx-EAEC) O86の解析, 第163回日本獣医学会学術集会、2020年9月14-30日、Web開催.

2. 李 謙一、井口 純、宇田和宏、松村 壮史、宮入烈、石倉健司、大西 真、伊豫田淳、EHEC Working Group in Japan. 小児重症例から分離された腸管出血性大腸菌新規血清群OX18および関連株のゲノム解析 第94回日本細菌学会総会、2021年3月23-25日、岡山（オンライン）.

3. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真、明田幸宏：腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析（2018-2020年）。第42回日本食品微生物学会学術総会、2021年9月、オンライン。

4. 泉谷秀昌, 李 謙一, 伊豫田 淳, 大西 真, 明田幸宏. 腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析 (2018-2020年) . 第42回日本食品微生物学会学術総会. 2021年9月、オンライン.

5. 泉谷秀昌, 李 謙一, 伊豫田 淳, 明田幸宏. 腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析. 第43回日本食品微生物学会学術総会. 2021年9月、東京.

物学会学術総会. 2021年9月、東京.

6. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真、明田幸宏：腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析（2018-2020年）。第42回日本食品微生物学会学術総会、2021年9月、オンライン。

7. 泉谷秀昌：分子疫学解析の現状と問題点、課題など（総括）。令和3年度希少感染症診断技術研修会、2022年2月オンライン。

8. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真、明田幸宏：腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析（2021年）。第43回日本食品微生物学会学術総会、2022年9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

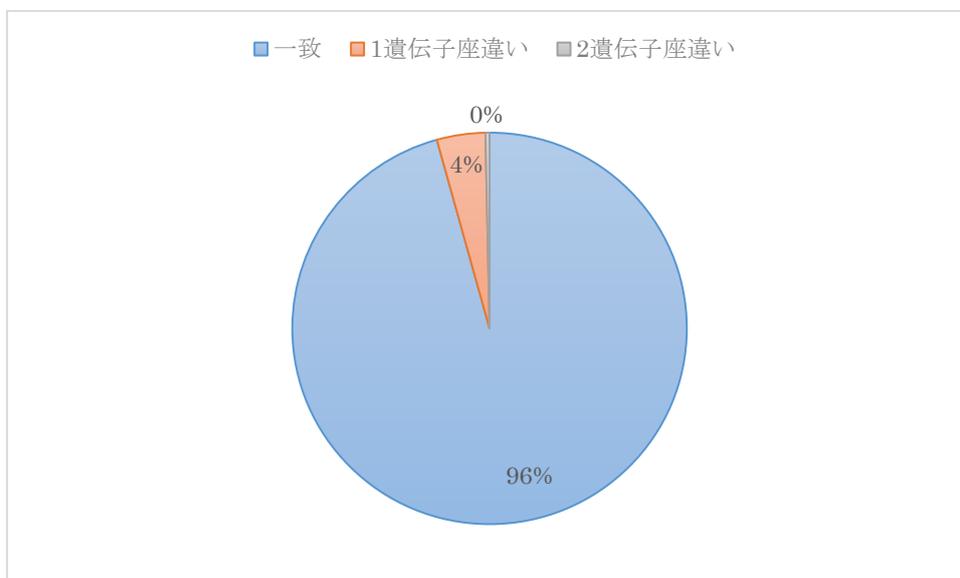
なし

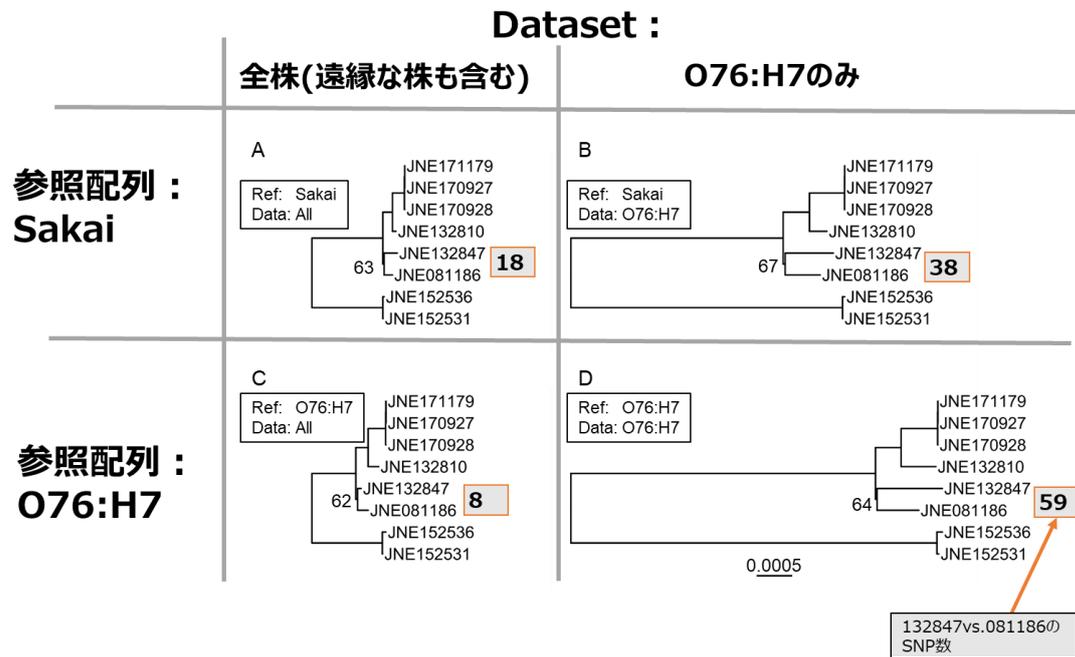
**表 X1. データベース化を行った菌株の血清型別菌株数**

血清型	菌株数
O111:H8	1,020
O26:H11	274
O103:H2	176
O121:H19	153
O146:H21	62
O103:H25	41
O145:H28	41
O91:H14	39
O165:H25	37
O5:H9	36
O115:H10	29
O111:HUT	27
O103:H11	23
OX18:H19	20
O123:H2	16
O177:H25	14
OUT:H8	13
O69:H11	11
O76:H19	10
その他*	206
計	2,248

\* O103:H8 等 82 種の血清型

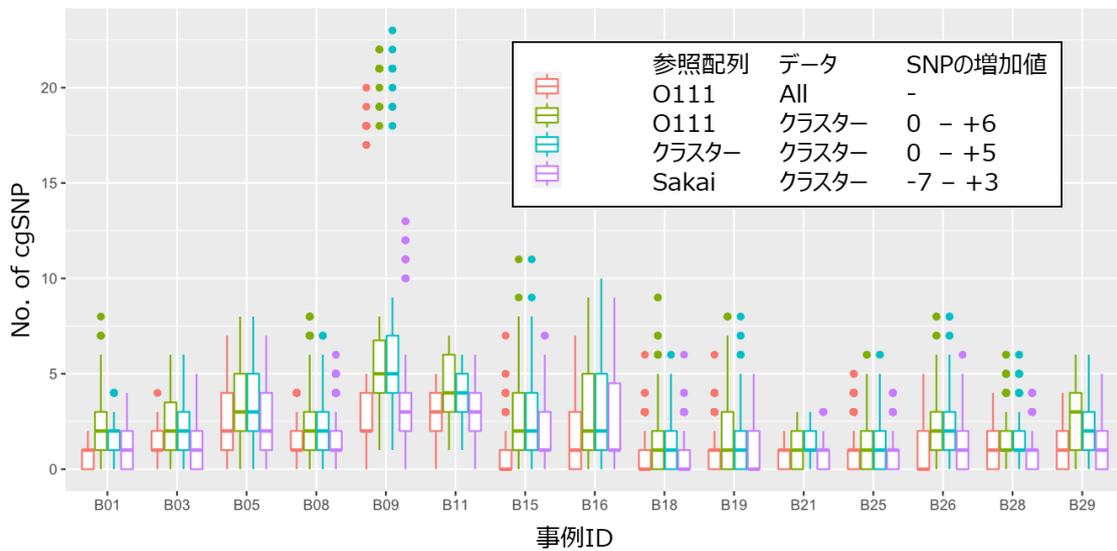
図 1. 送付 MLVA データと菌株データの結果の比較





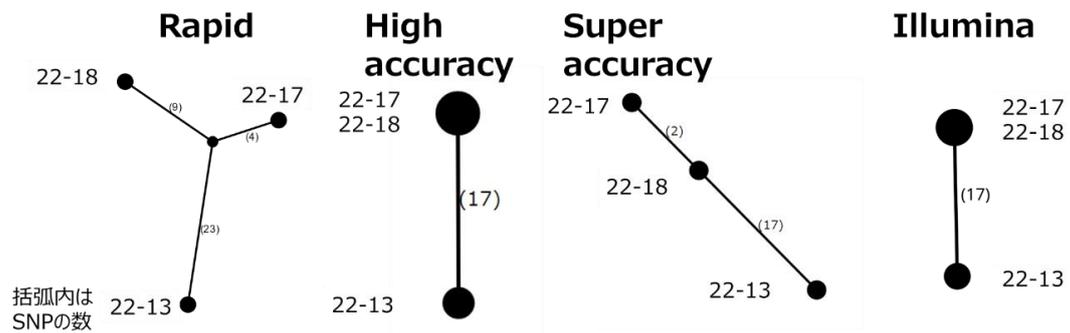
**図 X1. SNP 抽出条件ごとの O76:H7 の最尤法系統樹**

参照配列としては、O76:H7 代表株 (JNE132847 株) および O157:H7 Sakai 株の 2 種を用いた。解析データは、多様な大腸菌を含むデータセットおよび O76:H7 のみの 2 条件を用いた。四角内の数字は、型別能の例として JNE132847 および JNE081186 株間の SNP 数を示した。



**図 X2. O111:H8 における集団感染クラスター別の SNP 数を示した箱ひげ図**

参照配列としては、O111:H8 代表株（11128 株）、クラスター内の株、O157:H7 Sakai 株の 3 種を用いた。解析データは、O111:H8 全株（878 株）およびクラスター内の株のみの 2 条件を用いた。注釈中の SNP の増加値とは、参照配列として O111:H8 代表株を用いて全株で解析を行った際のデータと比べた時の、SNP 数の差異を示したものである。



**図 X3.** ベースコールモデルおよびシーケンサー別にみた EPEC O153 における SNP による median joining tree

各ノード（丸印）は菌株を示す。カッコ内は SNP の数を示す。Rapid、High accuracy、および Super accuracy は Oxford Nanopore シーケンサーデータのベースコールモデルを示す。Illumina は、Illumina HiSeqX によって得られたデータを示す。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究  
分担課題 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発  
研究分担者 林 哲也 九州大学大学院医学研究院・教授

## 研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の事例調査のために各種の分子型別法が開発されてきたが、国内では反復配列多型解析法（MLVA 法）がその迅速性・精微性から主に用いられてきた。本研究班は、MLVA に関する蓄積データの検証や地方衛生研究所における利用促進のための精度管理手法の確立などを行うとともに、EHEC 等の検査への全ゲノム解析の適用に関する検討を行うことを目的とした。本分担者は、他の分担者とともに後者の課題を担当し、我が国でゲノム情報を利用したサーベイランスや事例調査を効率的に実施するために求められる解析手法とデータベースの必要要件等を明らかにするため、欧米諸国におけるゲノム情報の活用状況、使用する解析パイプラインやデータベース等の調査を行うとともに、我が国での活用法について検討した。この結果、ゲノム解析の主流はイルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であるが、解析パイプラインは国や研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクローンの判定基準についても国際的なコンセンサスが得られていないことから、国内で使用すべき解析パイプライン等に関しては、国際的に整合性のあるデータフォーマットや同一クローンの判定基準などを決定することが難しいことが明らかとなった。したがって、ゲノム情報の幅広い活用を我が国で早期に開始するためには独自のパイプラインを構築する必要があると結論した。これと並行して、ゲノム情報の収集とデータベース構築を進め、国内分離株のゲノム情報の収集整理を行い、これに公共データベースから収集した海外株のゲノム情報を加えたデータベースを構築した。参照配列になりうる株については、ロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。その結果、主要 EHEC 血清型のうち、0157、026、0145、0103、0121、0165 のグローバルなゲノム情報データベースを構築できた。0157 に関しては、0157 全体のデータベースとは別に、特に病原性が高いとされる clade 8 に特化したデータベースを構築し、0103 と 0165 に関しては血清型が異なる近縁株を含めたデータベースを構築した。さらに、収集整備したゲノム情報を利用して、各血清型のグローバルな集団構造とその中での国内株の分布等を明らかにするとともに、Stx フェージのバリエーションや Stx 産生量の菌株間での多様性等に関する詳細な解析を行い、その成果を論文化した。

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の事例調査のために各種の分子型別法が開発されてきたが、反復配列多型解析法（MLVA 法）が迅速性・精微性に優れていることから、国内では MLVA 法を用いた解析が主に行われてきた。本研究班の目的の 1 つは、MLVA に関する蓄積データの検証や地方衛生研究所での利用促進のための精度管理手法の確立等であるが、もう一つの目的は「EHEC 等の検査への全ゲノム解析（WGS）の適用に関する検討」であり、本分担者は、

この課題を担当した。本分担課題は、国際整合性の観点から実施したものであり、まず海外で展開されている解析手法とデータベース（DB）等を検証し、国内の現状を踏まえた上で、効率的に事例調査やサーベイランスを実施するための解析手法とデータベースの必要要件等を明らかにすることを目指した。また、これと並行して、これまでに蓄積された国内分離株のゲノムデータと新たに取得する国内株のデータの整理と解析を行うとともに、海外株のデータを公共 DB から収集して EHEC

の WGS 情報 DB を構築し、さらに、これらの検証・解析結果を踏まえて、地方衛生研究所等でも利用可能な解析パイプライン、国際的に整合性のあるデータフォーマットや同一クローンの判定基準等を確立することを目標とした。また、本研究班では、これらの課題と関連して、MLVA 及び WGS 解析から得られたデータを利用して感染源や経路経路等に関する後方視的な疫学解析手法を検証することも目的とした。そのため、主感染源である食品からの分離菌株の WGS データ収集を可能とする方策の検討と臨床分離株との比較、同様に動物由来株のデータ収集を可能とする方策の検討と事例調査への利用を試みることとなっていたため、本分担者は、これらの食品・動物分離株の WGS データ収集を随時サポートし、必要に応じて、上記のゲノム情報 DB に組み込んで解析する役割も担った。

## B. 研究方法

(1) 国内で WGS 解析を利用した事例調査とサーベイランスを効率的に実施するために求められる解析手法と DB の必要要件等を明らかにするため、文献情報を基に欧米諸国（英国、他のヨーロッパ諸国、米国、カナダ）における WGS の活用状況、解析パイプラインや DB 整備等の調査を行い、我が国の現状を踏まえた活用法について検討した。具体的には、WGS データの取得方法、解析法と解釈の基準、利用している DB、データフォーマット等を調査した。

(2) 既に蓄積されている国内分離株の WGS データの収集と整理を行なった。また、一部の血清型については、分担者あるいは本研究班の代表者らによって新たに WGS 情報を算出した。また、公共 DB（NCBI/EMBL/DDBJ と ENTEROBASE）から海外株のデータを収集した。WGS 情報の新規取得には、基本的にはイルミナ社のシーケンサ（MiSeq または NovaSeq）を使用し、ショートリード配列を取得した。参照配列になりうる代表的な菌株等については、ONT 社の MinION を用いたロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。その他、0157 clade 8、026、0145、0121 などについては、収集した WGS データに加え、Stx ファージ領域の個別シーケンス、Stx 産生量の測定（定量系の開発を含む）を行い、Stx ファージの多様性の解析や Stx 高産生亜系統の検索等を行った。

（倫理面への配慮）

該当しない

## C. 研究結果

(1) 欧米諸国における WGS の活用状況、解析パイプラインや DB 整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討：

シーケンシングの主流は、イルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であり、後発の中国製（MGI 社）のシーケンサの利用に関しては、欧米での利用が拡大していない。ロングリードシーケンサの利用は研究面にとどまっており、一般的なサーベイランス等での利用は現時点では行われていない。

解析パイプラインは、調査研究機関によって様々であり、WGS の取得には、i) 参照配列に対するリードマッピング、ii) リード配列のアセンブリのいずれかであり、後者で使われるアセンブラには SPAdes と Velvet が多く使われている。国内（分担者も含む）では、Platanus-b もアセンブリに使用されており、近縁菌株の SNP 解析には BactSNP も使用されている。WGS の解析では、i) コアゲノム配列に基づく系統解析、ii) コア遺伝子の配列に基づく系統解析、iii) コアゲノムあるいはコア遺伝子の配列に基づく cgMLST (core gene Multi Locus Sequence Typing) または wg (whole genome) MLST のいずれかが使用できるが、ii) と iii) が主流である。集団事例に関連するクローンの判定基準については、コアゲノムまたはコア遺伝子の SNP 距離（5 SNPs など）を採用していることが多いが、解析対象によって異なり、国際的なコンセンサスは得られていない。各血清型で使用するコアゲノムあるいはコア遺伝子についても同様で、こういった配列あるいは遺伝子を使うかについても、国際的なコンセンサスは得られていない。したがって、国際的なコンセンサスに基づいて国内で使用する解析パイプラインを決定することは難しく、現時点では現実的ではない。

(2) 国内・国外分離株の WGS 情報データの収集・解析と DB 構築：

主要 EHEC 血清群に関して、本分担者がこれまでに取得したデータ、新規に取得したデータ、公共 DB から取得したデータ（海外株のデータ）の収集を行った。3つの血清型については先行して収集整備を行い [026 (540 株：国内株は 314)、0145

(246 株：国内株は 88)、0121 (638 株：国内株は 211 株)、グローバルな集団構造とその中での国内株の系統進化学的な分布、Stx 2 産生量の多様性 (Stx 2 定量系の作成を含む) などを明らかにし、論文文化した。026 に関しては、収集した WGS データに加えて、Stx1 ファージ領域の個別シーケンス、Stx1 定量系の作成を新たに行い、Stx1 ファージ領域の詳細な解析から 026 における Stx1 ファージの多様性を明らかにし、論文発表した。0145 に関しても、Stx2 について同様な解析を行った (論文準備中)。0121 については、収集した WGS データに加え、*lac* オペロンと *iee* 遺伝子や IS の関係を解析し、ラクトース利用能の多様性と多様化メカニズムを明らかにし、論文発表した。

0165:H25 に関しては、近縁株 (0172 : H25 EHEC など) を加えて、clonal complex 119 (CC119) としてデータを収集し、最終的に 197 株 (国内は 77 株) からなる WGS 情報 DB を構築した。CC119 についても、この情報を基に系統解析などを行って、グローバルな集団構造とその中での日本分離株の分布を明らかにし、論文発表した。

0103:H2 に関しては、当初の解析で、系統の大きくなる 2 つの系統が存在することが明らかになり、さらに近縁株を含めた解析を行う中で、近縁株を含めた clonal complex として解析する必要があることが判明した。そのため、主要系統については、ST17 complex として、0 抗原型が異なる近縁株も含めた WGS 情報を収集した。具体的には、主要系統の 0103:H2 に加えて、40 の血清型 (69 の ST) に属する 6,091 株のゲノム情報を収集した (国内株は 199 株)。現在、これらの株のうち、低品質のものや菌株情報が不十分なものを除いた 5,051 株の WGS を使って大規模な系統解析を行っているところである。ST2307 を代表とするマイナー系統に関しては、少数の海外株 (ベルギー株など) の WGS 情報を追加収集して 080:H2 を中心とした小規模な比較解析のみを行い、論文発表した。

0157:H7 に関しては、特に病原性が高いと推察されている clade 8 の WGS 情報整備を最初に行った。最終的に 511 株 (国内株は 150 : 亜系統を代表する 18 株については完全長配列を取得) のゲノム情報を収集整備した。また、その詳細な解析から、clade 8 のグローバルな集団構造を明ら

かにするとともに、Stx2 高産生性で重症化頻度の高い亜系統を同定するなどの知見を得て、論文発表した。0157:H7 全体に関してもグローバルな WGS 情報の収集整備を進め、7,290 株 (国内は 3,275 株) からなる DB を構築した。このうち、分担者が以前にシーケンスした国内分離株の中には、当時のライブラリー調整キットの性能の関係で品質の低いものが多く含まれていたため、960 株を再シーケンスし、DB に組み込んだ。現在、これらの株の WGS 情報を使って大規模な系統解析を行っているところである。

食品や動物からの分離菌株のゲノムデータ収集については、本研究期間中には該当する解析対象がなかったため、実施しなかった。

#### D. 考察

(1) 欧米諸国における WGS の活用状況、解析パイプラインや DB 整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討：

WGS 解析の主流がイルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であるが、解析パイプラインは国あるいは研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクローンの判定基準についても国際的なコンセンサスは得られていない。したがって、国内で使用するべき解析パイプラインに関しては、国際的に整合性のあるデータフォーマットや同一クローンの判定基準等を確立することは難しいと考えられ、WGS の幅広い活用を我が国で早期に開始するためには独自のパイプラインを構築する必要がある。この点に関しては、コア遺伝子セットの配列に基づく cgMLST が地方衛生研究所などでは最も取り入れやすい手法であると思われる。この場合、英国等で使用されている約 2,600 の遺伝子セットと共通の大腸菌コア遺伝子セットも使用すれば、国際的にデータを共有できる可能性が高まるだけでなく、他の病原性大腸菌にも同じ解析パイプラインが利用できるというメリットがある。

(2) 国内・国外分離株の WGS 情報データの収集・解析と DB 構築：

上記のように、主要 EHEC 血清群のうち、0157、026、0145、0103、0121、0165 の WGS データの収集・整理を進めたが、海外からの公共 DB への登録が急速に進んでいること、また 0103 や 0165 のように、血清型は

異なるが極めて近縁の EHEC が存在することが明らかになったことから、0157 と 0103 では非常に大規模な WGS 情報 DB を構築することになった。他の血清型についても、幅広い継続的な収集と DB のアップデートが必要である。また、0103 や 0165 以外の血清型に関しても、近縁株を含めた DB に変更することを検討する必要がある。さらに、データ重複や品質の問題、株情報の不備等の問題があるため、収集したデータに関しては、整理作業を行っていく必要がある。同時に、DB のスリム化を図るために近縁クローンなどの重複を一定の基準で除外することも検討すべきである。参照配列あるいは landmark となりうる株に関しては、完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備することも重要である。このような解析に加えて、国内株については Stx の産生量や臨床情報が利用できるという我が国の強みを生かして、今回行った 0157:H7 clade 8 の解析のように、高リスク系統の同定やその発生动向変化などを解析することも DB の活用という観点からは必要である。

#### E. 結論

欧米諸国の状況に関しては、シーケンシングの主流がイルミナのシーケンサーを用いたショートリード配列の取得である一方、集団事例に関連するクローンの判定基準や使用する解析パイプラインについては国際的なコンセンサスは得られていないため、WGS の幅広い活用を我が国で早期に開始するためには独自のパイプラインを構築する必要がある。

WGS 情報 DB の構築に関しては、主要 EHEC 血清群のうち、0157、026、0103、0145、0165 の国内・国外分離株の WGS データの収集・整理を行い、各血清型においてグローバルな大規模 DB を構築した。0103 と 0165 については、0 抗原型が異なる近縁株も含めた DB を構築したが、他の血清型についても同様な DB の構築を進める必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Nakamura K, Ogura Y, Gotoh Y, Hayashi T.: Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion

effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in *Escherichia coli*, PLoS Pathogens, 17(4):e1009073, 2021.

(2) Nakamura K, Tokuda C, Arimitsu H, Etoh Y, Hamasaki M, Deguchi Y, Taniguchi I, Gotoh Y, Ogura Y, Hayashi T.: Development of a homogeneous time-resolved FRET (HTRF) assay for the quantification of Shiga toxin 2 produced by *E. coli*. PeerJ, 9:e11871, 2021.

(3) Nishida R, Nakamura K, Taniguchi I, Murase K, Ooka T, Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Toyoda A, Mainil JG, Piérard D, Seto K, Harada T, Isobe J, Kimata K, Etoh Y, Hamasaki M, Narimatsu H, Yatsuyanagi J, Kameyama M, Matsumoto Y, Nagai Y, Kawase J, Yokoyama E, Ishikawa K, Shiimoto T, Lee K, Kang D, Akashi K, Ohnishi M, Iyoda S, Hayashi T.: The global population structure and evolutionary history of the acquisition of major virulence factor-encoding genetic elements in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121:H19, Microbial Genomics, 7(12):000716, 2021.

(4) Nakamura K, Seto K, Isobe J, Taniguchi I, Gotoh Y, Hayashi T.: Insertion Sequence (IS)-Excision Enhancer (IEE)-Mediated IS Excision from the lacZ Gene Restores the Lactose Utilization Defect of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O121:H19 Strains and Is Responsible for Their Delayed Lactose Utilization Phenotype, Applied Environmental Microbiology, 88(16):e0076022, 2022.

(5) Miyata T, Taniguchi I, Nakamura K, Gotoh Y, Yoshimura D, Itoh T, Hirai S, Yokoyama E, Ohnishi M, Iyoda S, Ogura Y, Hayashi T.: Alteration of a Shiga toxin-encoding phage associated with a change in toxin production level and disease severity in *Escherichia coli*. Microbial Genomics, 9:0009935, 2023.

(6) Ikeda R, Nakamura K, Saulmont M, Habets A, Duprez JN, Korsak N, Hayashi T, Thiry D, Mainil JG.: *Escherichia coli* O80 in Healthy Cattle: Absence of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *E. coli* O80:H2 and (Phylo) Genomics of

Non-Clonal Complex 165 *E. coli* O80, *Microorganisms*, 11(2):230, 2023.

(7) Yano B, Taniguchi I, Gotoh Y, Hayashi T, & Nakamura K: Dynamic changes in Shiga toxin (Stx) 1 transducing phage throughout the evolution of O26:H11 Stx-producing *Escherichia coli*, *Scientific Reports*, 13(1):4935, 2023.

(8) Nakamura K, Seto K, Lee K, Ooka T, Gotoh, Taniguchi I, Ogura Y, Mainil JG, Piérard D, Harata T, Etoh Y, Ueda A, Hamasaki M., Isobe H, Kimata K, Narimatsu H, Yatsuyanagi J, Ohnishi M, Iyoda S, Hayashi T: Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25, *Microbial Genomics*, 9:000959, 2023.

## 2. 学会発表

(1) 林哲也 (教育講演) : 腸管出血性大腸菌のゲノム解析 : 次世代シーケンサを用いた感染症と病原体の解析の例として, 第90回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第63回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第68回日本化学療法学会西日本支部総会 (合同学術集会), 2020. 11. 5-7, 福岡.

(2) 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也 : プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム, 第15回日本ゲノム微生物学会年会, 2021. 3. 4-6, 福岡.

(3) 宮田達弥, 小椋義俊, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊豫田淳, 伊藤武彦, 大西真, 林哲也 : EHEC O157 clade 8のゲノム多様性とStx2とStx2ファージのバリエーション, 第94回日本細菌学会総会, 2021. 3. 23-25, 岡山.

(4) 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也 : プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム, 第94回日本細菌学会総会, 2021. 3. 23-25, 岡山.

(5) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也 : 腸管出血性大腸菌O26:H11におけるStxファージの遺伝的多様性とダイナミクス, 第94回日本細菌学会総会, 2021. 3. 23-25, 岡山.

(6) 林哲也 (招待講演) : 次世代シーケンサ (NGS) の活用によって進展する細菌ゲ

ノムの進化・多様性解析, 2021年第41回阿蘇シンポジウム, 2021. 8. 21, 阿蘇市.

(7) 林哲也 (特別講演) : 大規模ゲノム解析から紐解く細菌の多様性, 2021年度日本生化学会九州支部例会, 2021. 6. 12, 久留米 (オンライン).

(8) 林哲也 (特別講演) : 細菌感染症とゲノム解析について, 令和3年度地方衛生研究所地域専門家会議 (地域保健総合推進事業), 2021. 11. 25, 太宰府

(9) 林哲也 (招待講演) : ゲノム解析を基盤とした細菌学遺伝的多様性に関する研究, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 30, 東京 (オンライン).

(10) 矢野文悟, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 中村佳司 : 腸管出血性大腸菌 O26:H11 ST21 系統における Stx1 ファージのゲノム多様性, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(11) 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 李謙一, 大岡唯祐, 小椋義俊, 大西真, 伊豫田淳, 林哲也 : 大腸菌 O103:H2 国内分離株とデータベース株を用いた高精度系統解析及び完全長配列決定株のゲノム構造比較, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(12) 中村佳司, 瀬戸和子, 磯部順子, 林哲也 : 挿入配列の切り出しによる大腸菌 O121:H19 の乳糖分解性の再活性化, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(13) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 小椋義俊, 大西真, 伊豫田淳, 林哲也 : 完全長配列を用いた EHEC O157 clade 8 のゲノムと Stx2 ファージの多様性解析, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(14) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊藤武彦, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC O157:H7 clade 8 のグローバルな集団構造および系統・Stx2a phage subtype と Stx2 産生量・重症度の関連性, 第24回 EHEC 研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(15) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 志賀毒素産生性大腸菌 O26:H11 ST21 系統における Stx1 ファージゲノム多様性と Stx1 産生性. 第24回 EHEC 研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(16) 西田留梨子, 中村佳司, 谷口愛樹, 伊豫田淳, 林哲也, STEC O121:H19 のグローバルな集団構造と主要病原因子をコードする遺伝子の進化. 第24回 EHEC 研究

会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(17) 中村佳司, 勢戸和子, 磯部順子, 林哲也, Insertion sequence (IS)-excision enhancer (IEE)を介したISの切り出しによるSTEC 0121:H19の乳糖分解性の変化における乳糖の関与. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(18) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊藤武彦, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC 0157:H7 clade 8のグローバルな集団構造および系統・Stx2a phage subtypeとStx2産生量・重症度の関連性. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(19) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 志賀毒素産生性大腸菌 026:H11 ST21系統におけるStx1ファージゲノム多様性とStx1産生性. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(20) 西田留梨子, 中村佳司, 谷口愛樹, 伊豫田淳, 林哲也, STEC 0121:H19のグローバルな集団構造と主要病原因子をコードする遺伝子の進化. 第24回EHEC研究

会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(21) 中村佳司, 勢戸和子, 磯部順子, 林哲也, Insertion sequence (IS)-excision enhancer (IEE)を介したISの切り出しによるSTEC 0121:H19の乳糖分解性の変化における乳糖の関与. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(22) 林哲也(特別講演): 次世代シーケンサを活用した病原細菌と細菌感染症研究, 第54回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2022. 11. 5, 福岡.

(23) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC 0157:H7 clade 8の世界的な集団構造とStx2とStx2aファージのバリエーション. 第96回日本細菌学会総会, 2023. 3. 16-18, 姫路.

(24) 中村佳司, 瀬戸和子, 李謙一, 後藤恭宏, 伊豫田淳, 林哲也, 隠れた志賀毒素産生性大腸菌系統, Clonal complex 119(CC119)の集団構造とCC119菌株の糖代謝. 第96回日本細菌学会総会, 2023. 3. 16-18, 姫路.



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
 「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究  
 （20KA1004）」  
 （総合）分担研究報告書

**分担課題名 感染症発生動向調査（NESID）をベースとした腸管出血性大腸菌感染症を原因とする広域食中毒探知と対応の取り組み**

研究分担者： 砂川 富正  
 所属（令和3-4年度）： 国立感染症研究所実地疫学研究センター長

研究要旨 広域食中毒アラートとして、迅速な集団発生・広域散発事例の探知を目的として、食中毒情報以前の感染症情報である感染症発生動向調査（NESID）データを活用し、過去データに基づくベースラインとの比較により、特異な EHEC 患者報告数の増加を迅速に探知することを目的として、レベル1-4のアラートシステムの開発に取り組んできた。また、広域食中毒アラートを端緒とした感染源の分析からさらに汚染源へと迫る広い追及についても本分担研究グループの研究目的の一つとした。2019年から2022年までの状況として、全体を通してレベル4は2019年第44週に探知した0157VT1VT2による1回のみであった。レベル3以上の年毎の検知回数/厚生労働省への情報提供回数は、2019年（5回/4回）、2020年（2回/1回）、2021年（1回/0回）、2022年（3回/3回）であった。レベル分けの根拠とした情報は2018年のデータであり、直近の3年間は新型コロナウイルス感染症によるパンデミックによる大きな影響を受けていたと考えられる。厚生労働省への情報提供（注意喚起）は、アラートレベルの見地に拠らず、MLVAの時間的・空間的拡がりについても加味したことから、2022年の厚生労働省への情報提供回数は3回と比較的多いように見えるが、実際には他の要因が含まれる。アラートレベルの設定及び情報提供のあり方について検討を進める必要がある。また、実際にこの3年間に、本研究をベースとした広域としての調査事例が無かったことから、省庁を超えた分析には至らなかった。

研究協力者（令和4年度の主たる所属）：  
 加納 一彦（同上・品質保証・管理部）  
 土橋 酉紀（同上・実地疫学研究センター）  
 高橋 琢理（同上・感染症疫学センター）  
 有馬 雄三（同上・感染症疫学センター）  
 高原 理（同上・感染症疫学センター）

垣根を超えての活動という点がチャレンジである。なお、事例に応じて発出された広域食中毒アラートを端緒とした感染源の分析からさらに（場合によっては農林水産部局の管轄する）汚染源へと迫る広い追及についても本分担研究グループの研究目的の一つとした。

#### A. 研究目的

本分担研究グループにおいては、詳細な菌株データが得られていない初期の段階において、患者の届出情報から早期に広域 EHEC 事例疑いを探知し、迅速な調査開始につなげることが研究開始当時の最大の目的であった。すなわち、広域に流通する食品による食中毒アラート（以下、広域食中毒アラート）として、迅速な集団発生・広域散発事例の探知を目的として、食中毒情報以前の感染症情報である感染症発生動向調査（NESID）データを活用し、過去データから算出したベースラインとの比較により、特異な EHEC 患者報告数の増加を迅速に探知する試みとなる。厚生労働行政においては部局の

#### B. 研究方法

広域食中毒アラート検出の具体的な検出の方法としては、集団発生（ポイントソース）による報告数増加の影響を除くため、集団発生病例（家庭内感染含む）をクラスタリングした件数（=イベント数）を過去と比較することとなる。アラートレベルは患者イベント数/過去と比べてどの程度多いか（週とベースラインからの逸脱度：標準偏差によって分類）の組み合わせとなり、分かりやすさを重視してレベル1-4と区分し（図1）、レベルごとに対応を規定した。このアラートレベルの設定と各レベルにおける分担研究グループによる対応の具体的な内容については以下のようなになる。

【レベル2+まで】

内部注意喚起アラート：隠れクラスタの確認、情報収集、継続監視を実施する。国立感染症研究所 感染症疫学センター／実地疫学研究センター（FETPを含む）内で監視を強化する。

【レベル3】

提供可否を都度判断：他の情報を確認（年齢性別分布や地域の偏り、重症度等を考慮）して判断する。厚生労働省（医薬・生活衛生局食品監視安全課等）に情報提供→重症度、地理分布や年齢・性別分布の偏りなどを考慮し総合的に判断する場合があります。

【レベル4】

厚生労働省への情報提供を実施：厚生労働省関係各所（医薬・生活衛生局食品監視安全課・健康局結核感染症課）に情報提供を実施する。

レベル4により規定される厚生労働省へのアラートの「回数」については、2018年のデータをベースに5回（程度）としてきた（図2）。これは、多過ぎず少な過ぎず、必ずアクションを求める前提では適切として試行的に設定したものである。以上について NESID から得られる情報を自動的に整理し、自動的に分類出来るようにプログラムを組んだ。レベル分けの根拠とした情報は2018年のデータであり、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）によるパンデミック前の時期であることに注意する。

		ベースラインからの逸脱度	
		+1SD以上2SD未満	+2SD以上又は2週連続で+1SD以上
患者イベント数/週	1-9件	レベル1	
	10-19件	レベル2	レベル3
	20件-	レベル2+	レベル4

図1. アラート閾値設定

		過去と比べてどのくらい多いか	
		+1SD以上2SD未満	+2SD以上、もしくは、二週連続1SD以上
患者イベント数/週	1-9件	14回	
	10-19件	3回	2回 O157VT2・42週 O157VT1VT2・19週
	20件~	2回 O157VT1VT2・38週 O26VT1・35週	5回 O157VT2・30週 O157VT2・34週* O157VT1VT2・23週 O157VT1VT2・33週 O121VT2・35週

図2. アラートレベルの設定（COVID-19 前の2018年に準拠）

（倫理面への配慮）

本研究ではラインリスト作成やそのための個人

情報を扱わないことから倫理的な問題は発生しない。

C. 研究結果

2019年から2022年までの情報について列挙する。全体を通してレベル4は2019年第44週に探知したO157VT1VT2による1回のみであった。レベル3以上の年毎の検知回数/厚生労働省への情報提供回数は、2019年（5回/4回）、2020年（2回/1回）、2021年（1回/0回）、2022年（3回/3回）であった。2022年の厚生労働省への情報提供回数は3回と比較的多いように見えるが、実際には厳密にレベル別アラートとして情報提供を行った回数は1回のみであり、同一MLVAの時間的・空間的拡がりについても加味した点で他の情報提供と異なる。2022年のその1回については、リアルタイムな監視の状況（2022年21-22週）として、O157VT1VT2が東日本にやや多い等の疫学的な偏りの可能性を認めた。2022年6月10日の情報提供の内容は以下のとおりである。

・全国で診断週2022年19週から22週にかけて、NESID上では例年を上回るO157VT1VT2症例数の増加を認め、特に診断・週21週から22週にかけては、明らかにO157VT1VT2に起因するイベント数の増加がみられた（2週連続で+1SD以上となり、またイベント数20前後で推移したことからレベル3相当）。

・O157VT1VT2症例群は、やや女性に多いが、年齢層は幅広い。

・O157VT1VT2症例群は、地理的分布としては関東地方、北海道などの東日本が多い。

O157VT1VT2症例群は、事例調査（MLVAを含む）の情報も併せ、全体が単独の汚染原因によるものではないことが考えられるが、一部は広域流通している食材による事例の可能性もある。

・事例発生時には、迅速かつ丁寧な疫学調査・ゲノム解析がこれまで以上に重要であり、常に広域発生の可能性を念頭に置くと共に、再発予防のためには食材の汚染発生時点まで遡る連携した調査が必要である。

・予防的には、これから腸管出血性大腸菌を始めとする食中毒がより増加する時期に入っていくこと、オミクロン株によるパンデミックの状況がやや落ち着き、人々の手洗い等の衛生に対する関心の低下が起る可能性があることから、改めての国民に対する情報提供と注意喚起が必要である。

D. 考察

本研究は行政と連携して実施し、公衆衛生上の成果を上げることが必要である最たるものである。本分担研究グループが最大の目的としたEHEC患者の届出情報から早期に広域事例疑いを探知し、迅速な調査開始につなげることについては、食中毒

の前段階での EHEC 患者の届出時点を対象にしていることから、探知という点では一定の有用性を認めるシステムになっているものと考ええる。さらなる情報の深堀については、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課による自治体に対する詳細な情報収集が試みられた場面も少なくなかったが、総じて広域事例は各自治体においては単発・散発として発生していることは少なくなく、事例全体の情報収集やまとめを新たに追加的に行うことは出来なかった。広域事例全体の一部の可能性のある死亡例が発生した事例についての情報収集を、国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース (FETP) により実施出来た例はあったが、広域事例全体の感染源等の同定には至らなかった。各自治体にとっては散発である広域事例 (の可能性のある事例) に対する調査体制の整備が必要である。また、これまで、原因の可能性のあるメニュー・食品・食材に辿り着いても、その食品の汚染源までは分からず、多くは回収、再発防止策への取り組みに繋がってこなかった状況があったが、2022 年は特筆すべき事例発生も無かったと考えられた。国内でのエビデンスの集積と活用を厚生労働省のみならず農林水産省を含め、関係省庁全体で行える連携体制作りが重要である。

新型コロナウイルスを踏まえた研究実施にあたっての工夫としては、結果の項に記載したように、レベル 3 以上の年毎の検知回数/厚生労働省への情報提供回数は、2019 年 (5 回/4 回)、2020 年 (2 回/1 回)、2021 年 (1 回/0 回)、2022 年 (3 回/3 回⇒実際には 1 回) であった。COVID-19 がパンデミックとなった 2020 年からの回数の減少は明らかであり、COVID-19 パンデミック中のベースラインの変化に合わせたアラートレベルの設定変更の検

討・試行が今後必要であると考ええる。さらに、2022 年に厚生労働省への情報提供を行う理由となった MLVA 情報に患者情報をどのように突合して効果的・効率的に行うための体制の構築についても今後、検討していきたい。

#### E. 結論

2018 年までのデータをベースに広域食中毒アラートの設定を行い、食中毒とは別システムである感染症発生動向調査のレベルで散発事例を広域事例として探知する仕組みを整えた。運用面で COVID-19 パンデミックの影響を強く受けていたと考えられ、閾値の改良を含む運用面の改善が急務である。更なる狙いであった汚染源の調査には至らなかったが、引き続き対応を強化していく。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
特記事項無し
2. 学会発表  
特記事項無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (あれば記載) (予定を含む。)

1. 特許取得  
特記事項無し
2. 実用新案登録  
特記事項無し
3. その他  
特記事項無し

令和2～4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保

推進研究事業）

食中毒調査の迅速化・高速化及び広域食中毒発生時の早期探知に資する研究

研究代表者 明田幸宏 国立感染症研究所

分担研究報告書

食品由来株の収集

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

本研究では、食中毒事例検体および食品検体から分離された志賀毒素産生性大腸菌(STEC)の同一検体由来株間における反復配列多型解析(MLVA)型の多様性を明らかにするため、食中毒事例検体および食品検体由来 STEC 菌株を MLVA 法に供試し、MLVA 型多様性を解析した。食中毒事例 2 事例検体、食品 5 検体由来の STEC 0157 菌株 215 株を解析した結果、同一検体中に MLVA 型が異なる STEC は殆ど存在しなかったことから、食中毒検査の際に同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一の MLVA 型の報告が過去に複数の地方自治体からあったことから、一層、食品を汚染する STEC の分離と分離株の MLVA 型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低い但し複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

#### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬 昌平

国立感染症研究所

泉谷 秀昌

国立大学法人帯広畜産大学

佐々木 貴正

#### A. 研究目的

反復配列多型解析法 (MLVA 法) は迅速性、精微性に優れている。MLVA 型による広域食中毒の早期探

知には、食中毒事例の原因食品から分離された株の MLVA 型の迅速かつ正確な報告が必須である。しかし、仮に原因食品中に多様な MLVA

型の株が存在する場合、MLVA 法に供試する株数が少ないと、複数地域で食中毒事例に関連する同一 MLVA 型の株を見逃し、広域食中毒の早期探知に支障をきたす可能性がある。そのため、本研究では同一食中毒事例から分離された複数の志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 菌株および同一食品から分離された複数の STEC 菌株について MLVA 法による比較解析と選択培地上での生育性の比較を行い、多様性を解析した。また、食品由来株の保有病原因子関連遺伝子を解析し、薬剤感受性を判定した。

## B. 研究方法

### 1) 菌株

STEC 0157 菌株 215 株 (食中毒事例 A 由来非運動性株 25 株および運動性株 1 株、食中毒事例 D 由来 30 株、食品 E 由来 30 株、食品 F 由来 30 株、食品 G 由来 40 株、食品 H 由来 35 株、食品 I 由来 24 株) を供試した。

### 2) DNA 抽出

各菌株を Tryptone soya agar (TSA) に画線し、37°C にて 18 時間培養後、生育したコロニーから DNA を熱抽出した。

### 3) MLVA 解析

食中毒事例 A および D ならびに食品 E、F、G、H および I 由来株の抽出 DNA を鋳型として MLVA 解析用のマルチプレックス PCR 反応を行い、各遺伝子座ごとのリピート数

を菌株間で比較した。また、得られたデータを MLVA 情報共有リストと照合した。

### 4) Stx サブタイプ型別試験と病原因子関連遺伝子の解析

食品 E、F、G、H および I 由来株が保有する Stx サブタイプ

(*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*) の型別を実施した。

また、病原因子関連遺伝子

(*eae*, *saa*, *iha*, *espB*, *espD*, *espP*, *tir*, *ehxA*, *subA*, *katP*, *stcE*) を PCR 法およびリアルタイム PCR 法で検出した。

### 5) 腸管出血性大腸菌用分離培地での生育性

令和 3 年度には、食中毒事例 D 由来株、食品 E および食品 F 由来株をセフェキシムおよび亜テルル酸添加クロモアガー STEC 培地

(CT-クロモアガー STEC) に画線し、37°C で 22±2 時間培養した後、コロニー生育状況を比較した。

### 6) 薬剤感受性試験

食品 E、F、G、H および I 由来株を TSA に画線し 37°C で 18 時間培養した。生育したコロニーを MUELLER-HINTON Broth に混合し、各ウェルごとに異なる濃度の薬剤 (アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、コリスチン、クロラムフェニコー

ル、トリメトプリム)が固着済の96wellプレートに接種した。35°Cで18±2時間培養し菌の増殖を判定した。

### C. 研究結果

#### 1) 同一食品由来 STEC 菌株間での MLVA リピート数の比較

食中毒事例 A 由来の非運動性 STEC 25 株のうち、22 株は 17 遺伝子座の各リピート数が全て同一であり、3 株は 1 遺伝子座のみリピート数が異なっていた。同事例由来の運動性 STEC 1 株の MLVA 型は非運動性株とは異なっていた。また、食品 I 由来の 23 株のうち、22 株は 17 遺伝子座の各リピート数が同一であり (食品 I 由来株 1)、1 株は 1 遺伝子座のみリピート数が異なっていた (食品 I 由来株 2)。食中毒事例 D 由来株、食品 E 由来株、食品 F 由来株、食品 G 由来株および食品 H 由来株の 17 遺伝子座の各リピート数は各由来食品ごとに全株で同一であった。また、食品 E、F、H 由来の全株および食品 I 由来の 22 株 (食品 I 由来株 1) の MLVA 型は、過去に地方自治体から報告された MLVA 型と同一であった。

#### 2) Stx サブタイプ型別試験

食品 E 由来の STEC 0157 菌株は、*stx2a* および *stx2c* を保有していた。食品 F および G 由来株は、*stx2a* を保有していた。食品 H 由来株、食品 I 由来株 1 および食

品 I 由来株 2 は、*stx2c* を保有していた。

#### 3) 病原因子関連遺伝子の解析

食品 E 由来株は、*eae*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*katP* および *stcE* が陽性となった。食品 F、G、H および I 由来株では、*eae*、*iha*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*katP* および *stcE* が陽性となった。

#### 4) 腸管出血性大腸菌用分離培地での生育性

食中毒事例 D 由来の 30 株のうち 14 株は、CT-クロモアガー STEC 上で生育したコロニー数が少なかった。食品 E 由来の 30 株のうち、11 株は CT-クロモアガー STEC 上で生育したコロニー数が少なく、9 株は非生育であった。食品 F 由来の 30 株のうち、10 株は CT-クロモアガー STEC で生育したコロニー数が少なく、13 株は非生育であった。

#### 5) 薬剤感受性試験

食品 E 由来株は、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールおよびトリメトプリムに耐性が認められ、食品 F、G、H および食品 I 由来株では薬剤耐性が認められなかった。

### D. 考察

食中毒事例 2 事例および食品 5 検体由来の STEC 0157 菌株 215 株のうち、同一検体由来で MLVA 型が異なる菌株は食中毒事例 A 由来株

4株と食品I由来株1株のみであった。MLVA型が異なるSTECは、同一食品中に出現する頻度が非常に低いことから、食中毒検査の際に同一検体から必要以上に多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株の一部は全国の地方自治体から報告されたSTECとMLVA型が一致し、共通して複数の病原因子関連遺伝子を保有していた。以上から、これらの食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。また、複数種類の寒天培地での生育性の比較から、同一MLVA型でもその生育状況には違いがあることが示された。また、食品E由来株は複数の薬剤耐性を保有しており、他の食品由来株は薬剤耐性が認められなかった。食品由来株が薬剤耐性を有する頻度は低いが、複数の薬剤に耐性を有する菌株も確認されたため、注視する必要があると考えられた。

#### E. 結論

食中毒事例2事例検体および食品5検体由来のSTEC 0157菌株215株は、殆どが由来検体ごとに同一のMLVA型であり、同一検体中に異なるMLVA型のSTECが存在する可能性は低いことから、食中毒検査の際に同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一のMLVA型の報告が過去に複数の地方

自治体からあったことから、一層、食品を汚染するSTECの分離と分離株のMLVA型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低いが複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 論文発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

研究課題名：「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」

令和 2-4 年度 (総合) 分担研究報告書

分担研究者	寺嶋 淳	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	品川正臣	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	和賀萌美	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	山田翔子	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	推野千紘	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	桑原多佳子	岩手大学農学部	共同獣医学科

**研究要旨** 2020年5月から2022年8月までに岩手県の食肉処理場で採取した牛の直腸便 591 検体及び豚の直腸便 521 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。また、市販の豚挽肉及び小腸検体について STEC の分離を試みた。牛では、stx 陽性率は 23.7%となり、35 検体から 39 株が分離された。病原因子、薬剤感受性の観点から公衆衛生学的に対応が求められるような菌株の検出は少数にとどまった。一方、農場や都道府県をまたいで拡散している遺伝学的に近縁と考えられる菌株が検出された。豚の直腸便 521 検体のうち 252 検体 (48.4%) が stx 陽性となり、20 検体 21 株が単離された。単離株はすべて stx 2e を保有しており、15 株は 08 または 0g8 であった。豚挽肉及び小腸検体から stx は検出されなかった。豚由来株における STEC の陽性率は高かったものの、主要な O 抗原をもつ株や、病原性因子 eae をもつ株など、食中毒リスクの高い株は分離されなかった。また、牛由来株との比較から、PFGE 解析の結果を含めて、牛と豚に共通した株が拡散している可能性は低いことが示唆された。

**A. 研究目的**

STEC 感染症は、感染症法において三類感染症として規定され全数把握疾患となっている。本疾患は食品由来感染症として特徴づけられるものの、原因となる食品は非常に多様であり、主たる保菌動物である牛の腸管内容物による二次的な汚染を含め汚染源は広範な食品・食材に及んでいる。汚染経路も複雑であるがゆえに、

STEC 食中毒の原因究明は困難な場合が多く、原因が明らかになることは稀である。牛が主たる保菌動物であることから、汚染源となり得る牛の STEC 保菌状況を知ることが STEC 感染症の制御にも極めて有効な情報と考えられる。一方で豚の STEC 保菌状況については報告が少なく、その実態については不明な部分が残る。本研究では、さまざまな農場に由来する牛及び

豚が搬入される食肉処理場において両者の大腸内容物を調べることで STEC 保菌状況を明らかにし、STEC 感染症由来の菌株との比較を行うことで、原因となる STEC の動向を把握することで STEC 感染症の制御に資する情報を得ることを目的とする。

## B. 研究方法

### (1) 牛及び豚の直腸便からの STEC の分離収集

2020年5月から2022年8月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛591頭の直腸便、豚521頭の直腸便及び市販の豚肉を材料とした。採取した豚直腸便については明確な由来農場を把握することができなかったため、詳細な疫学的情報は不明である。糞便サンプル1gをノボバイオシナトリウム(ナカライテスク, 日本) 20 mg/L を添加した mEC 培地(日水製薬, 日本) 9 mL に接種し、ボルテックスで混和した後 42°C, 16 時間振盪培養した。培養後、培養液 7 mL を 15 mL チューブに移して 3,000 rpm, 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨てた沈査に 6 mL の PBS を加えて懸濁し 3,000 rpm, 1 分間遠心分離して夾雑物を除いた。その後、上清から 5 mL 採取し、3,000 rpm, 10 分間遠心分離した。上清を捨て、沈渣を 450 µL の PBS で再懸濁し、一部をコロニーPCR 用ストックとしてマッコンキー寒天培地(日水製薬, 日本)に画線し、37°C, 一晚培養した。残りの沈渣から以下の方法で DNA を抽出した。懸濁液をマイクロチューブに移して 15,000 rpm, 10 分間遠心分離した。上清を捨てた沈渣に 100 µL の 25 mM NaOH

を加え再懸濁し、95°C, 5 分でヒートブロックによる熱処理をした。熱処理後、8 µL の 1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて、15,000 rpm, 10 分間遠心分離し、得られた上清を回収し抽出 DNA とした。

抽出 DNA をテンプレート DNA とし、stx1, stx2 を検出する PCR をサーマルサイクラー (GeneAtlas G02, astec, 日本) を用いて行った。本 PCR には酵素として KAPA Taq ReadyMix (KAPA Biosystems, マサチューセッツ州) もしくは KAPA Taq Extra HS ReadyMix (KAPA Biosystems, マサチューセッツ州), プライマーとして Cebula らの設計した stx1 および stx2 に特異的な LP30 / LP31 (stx1), LP43 / LP44 (stx2) を使用した (表 2) [Cebula et al., 1995]。反応液組成及び反応条件は以下のとおりである。

PCR 反応液 (25 µL)	
2×KAPA Taq (Extra HS) Ready Mix	12.5 µL
Water	11.0 µL
Forward Primer	0.25 µL
Reverse Primer	0.25 µL
Template DNA	1.0 µL

### 反応条件

95°C	3 分間
94°C	20 秒間
58°C	20 秒間
72°C	30 秒間
72°C	30 秒間

PCR 後、増幅産物をサブマリン型電気泳動

装置 (Mupid-2 plus, タカラバイオ, 日本) を用いて 100V, 30~40 分間の条件で, 2%アガロースにより電気泳動を行った。泳動バッファーとして 1×TAE 緩衝液, 分子量マーカーとして 100 bp DNA パーソナルマーカー (eurofins, ルクセンブルク) を用いた。stx1 及び stx2 が陽性となった検体についてコロニーPCR を以下の手順で実施し STEC 株を分離した。前項でマッコンキー寒天培地に画線したストックから新たなマッコンキー寒天培地にコロニーができるように播種し 37°C, 一晩培養した。培地上に得られたコロニーを PCR 反応液に釣菌し, 懸濁した。釣菌した懸濁液から一部を LB 寒天培地 (Becton Dickinson, ニュージャージー州) に接種後 37°C, 一晩培養して STEC 分離株のストックとした。残りの懸濁液はそのまま PCR 反応させた。PCR 条件は前項と同様である。得られた各 STEC 分離株の DNA を以下の方法で抽出した。LB 寒天培地のストックから新たな LB 寒天培地全面に播種し, 37°C で一晩培養した。培養後, 菌体を 1.5 mL チューブに分注した TE buffer 1 mL に懸濁し, 100°C, 15 分間加熱した後, 18,000×g, 5 分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し, 抽出 DNA とした。超微量分光光度計 (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州) で抽出 DNA の濃度を測定し, 約 10 ng/μL になるよう TE buffer で希釈し, これをテンプレート DNA として用いた。

(2) 分離株の性状解析

Stx 陽性株について, PCR による毒素のサ

ブタイピング, O 抗原の決定, 病原性因子遺伝子の検出, 薬剤感受性試験及びパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて詳細な性状解析を行った。

2-1 毒素のサブタイピング

Scheutz1)らの方法に準じて stx サブタイプを決定した。PCR 反応で stx1 陽性となった検体に対して さらに stx1a, stx1c, stx1d を特定するプライマーで PCR 反応を行った。stx2 陽性となった検体に対しては stx2a, stx2b, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, stx2g を特定するプライマーで PCR 反応を行った。PCR 反応液組成及び PCR 条件は以下のとおりである。

- stx1a, stx1c, stx1d, stx2b, stx2c, stx2e, stx2f, stx2g の PCR 反応液 (20 μ L)

HotStarTaq (Q IAGEN)	10 μL
Water	4.5 μL
Forward primer	0.25 μL
Reverse primer	0.25 μL
Template DNA	5.0 μL

- stx2a の PCR 反応液 (20 μL)

HotStarTaq	10 μL
Water	4.25 μL
Forward primer1	0.25 μL
Forward primer2	0.25 μL
Reverse primer	0.25 μL
Template DNA	5.0 μL

- stx2d の PCR 反応液 (20 μ L)

HotStarTaq	10 μL
Water	4.0 μL
Forward primer	0.25 μL
Reverse primer1	0.25 μL

Reverse primer2            0.25  $\mu$ L  
Reverse primer3            0.25 $\mu$ L  
Template DNA                5.0  $\mu$ L  
・ stx1a, stx1c, stx1d, stx2b, stx2e,  
stx2f, stx2g の PCR 反応条件  
95°C      15 分間  
94°C      50 秒間  
64°C      40 秒間          35 サイクル  
72°C      1 分間  
72°C      3 分間  
・ stx2a, stx2c, stx2d の PCR 反応条件  
95°C      15 分間  
94°C      50 秒間  
66°C      40 秒間          35 サイクル  
72°C      1 分間  
72°C      3 分間  
PCR 反応後、増幅産物を TAE buffer を用  
いて 2%アガロースにより電気泳動を行っ  
た。

## 2-2 O 抗原の決定

単離した stx 遺伝子陽性株については、以  
下の手順で O 抗原を決定した。まず、stx  
遺伝子陽性コロニーのストックを 100  $\mu$ L  
の PBS に懸濁し、LB 寒天培地上で コンラ  
ージ棒を用いて塗り広げ 37°C, 1 晩培養  
した。培養後マッシュ棒の頭 3~5 倍程度の  
菌体を回収し 3 mL の生理食塩液 を入れた  
小試験管で懸濁した。懸濁液を 121°C, 15  
分間高圧蒸気滅菌をした後、900 $\times$ g で 20  
分間遠心分離して沈査を回収した。沈査  
を 0.5 mL の生理食塩液で懸濁し凝集反応  
用の抗原液として用いた。スライドグラ  
スを数区画に分け、区画毎に大腸菌セッ  
ト病原大腸菌免疫血清 「生研」デンカ生

研) の混合血清 1 滴を滴加した。試料が自  
己凝集をおこしていないことを確認する  
ため 1 区画に対照として混合血清の代わり  
に生理食塩液を 30  $\mu$ L 滴下した。調製した  
抗原液の各検体 10  $\mu$ L を混合血清及び生理  
食塩液に滴加した。ピペットチップを用  
いて検体と混合血清及び生理食塩液をよ  
く混和させた。スライドグラスを前後に  
傾斜させながら 1 分間反応させて凝集の  
有無を目視で蛍光灯の透過光下で観察し  
た。各血清との反応で 1 分間以内に透明な  
背景に凝集塊が生じる強い凝集が観察さ  
れたものだけを陽性とし 1 分以降に遅れて  
出現する凝集塊や乳白色の背景に凝集塊  
が観察された微弱な凝集は陰性とした。  
混合血清で陽性と判断された場合、その  
混合血清を構成する単味血清を用いて凝  
集試験を行った。いずれの混合血清及び  
単味血清も陰性となった検体は大腸菌セ  
ット病原大腸菌免疫血清に含まれる O 群に  
は該当しないと判定し、単独の単味血清  
が陽性となった検体のみをその単味血清  
名を O 群と判定した。  
凝集試験で凝集塊が認められなかった 検  
体に対しては Og typing PCR2) によって O  
抗原の遺伝子を同定し Og 抗原とした。  
stx 遺伝子陽性検体のコロニーを 1 mL の  
LB broth に接種し 37°C, 1 晩培養した。  
100  $\mu$ L の培養液を 10,000 $\times$ g で 10 分間遠  
心分離し上清を捨て得られた沈査に 1000  
 $\mu$ L の TE buffer を加えて懸濁した。懸濁  
液を 100°C, 10 分間加熱した後 10,000 $\times$ g  
で 10 分間遠心分離し、上清を別のチュー  
ブに移し DNA テンプレートとした。20 種

類のマルチプレックス PCR により O<sub>g</sub> 抗原を特定した。PCR 反応液 組成及び PCR 条件は以下のとおりである。

・ PCR 反応液 30 μL)

5 × KAPA Taq Extra buffer no Mg

(KAPA) 6.0 μL

Water 14.42 μL

Primer Mix 3.52 μL

MgCl<sub>2</sub> (KAPA) 3.0 μL

dNTP mix (KAPA) 0.9 μL

KAPA Taq DNA polymerase (KAPA)

0.16 μL

Template DNA 2.0 μL

・ PCR 反応条件

94°C, 1 分間

94°C, 30 秒間

58°C, 30 秒間 25 サイクル

72°C, 1 分間

72°C, 2 分間

### 2-3 病原性因子遺伝子の検出

病原性因子遺伝子として stx1, stx2, eae, fliC, hlyA, rfbE の 6 種類を Bai らの方法に準じたマルチプレックス PCR により検出した [Bai et al., 2010]。前項で調整した DNA をテンプレート DNA とした。50 μM の各プライマー (12 種類) を等量ずつ混和したものをプライマーミックスとした。各プライマーの配列は表 6 に示した。PCR 反応液組成および PCR 条件は以下の通りである。

PCR 反応液 (20μL)

10×PCR buffer, -Mg (Invitrogen, カリフォルニア州) 2.0 μL

MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, カリフォルニア州) 3.0 μL

Primer Mix 1.92 μL

dNTP mix (Invitrogen, カリフォルニア州) 0.48 μL

Taq DNA polymerase (Invitrogen, カリフォルニア州) 0.5 μL

Water 11.1 μL

Template DNA 1.0 μL

PCR 反応条件

94°C 5 分間

94°C 30 秒間

58°C 30 秒間 25 サイクル

72°C 75 秒間

68°C 7 分間

### 2-4 薬剤感受性試験

ディスク拡散法により各株の薬剤感受性を調べた。分離した stx 陽性コロニーを LB 寒天培地上に塗り広げ 37°C, 一晚培養した。培養後, 菌体を小試験管に分注した滅菌生理食塩水 1 mL に懸濁し McFarland Standard 0.5 (bioMérieux, フランス) と同等の濁度になるよう目視で調整した。これを菌液とした。菌液に滅菌綿棒を浸し, 余液を管壁で取り除いた後, 感性ディスク用培地 N (日水製薬, 日本) に綿棒で菌液を平板を約 60° ずつ回転させながら 3 回塗抹した。菌液を接種した平板を 3~5 分静置した後, ディスクデイスペンサー (Becton Dickinson, ニュージャージー州) でディスクを 1 枚の平板あたり 2~3 枚ずつ置いた。15 分以内に培

地に蓋をして逆さにし、37°Cで16~18時間培養した。培養後、形成された阻止円の直径をmm単位で測定し、S(感受性)、I(中間耐性)、R(耐性)を判定した。

ディスクはセンシディスク(Becton Dickinson, ニュージャージー州)のアンピシリン10(ABPC)、セファゾリン30(CEZ)、セフォタキシム30(CTX)、ゲンタマイシン10(GM)、カナマイシン30(KM)、テトラサイクリン30(TC)、ナリジクス酸30(NA)、シプロフロキサシン5(CPFX)、クロラムフェニコール30(CP)、SXT(ST)を用いた。S、I、Rの判定基準はCLSIのディスク法の判定基準に従った[CLSI, 2022]。

#### 2-5 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

遺伝的異同を判定するため単離された全ての株についてPFGEを行なった。

LB寒天培地に保存した菌体を少量かき取り、滅菌蒸留水200µLにMcFarland Standard 3.0と同等の濁度となるよう目視で調整しながら懸濁した。懸濁液に、TBEに溶かした1%SeaKem Gold Agarose(Lonza, スイス)液200µLを加えて混ぜ、プラグモールド(BioRad, カリフォルニア州)へ流し込み固化させ、プラグとした。固まったプラグを、proteinaseKを含む菌体処理溶液1mLが入ったSterile Tube(SARSTEDT, ドイツ)に移し、50°Cで一晩振盪した。菌体処理溶液の組成は以下のとおりである。

- 菌体処理液(16 mL)

proteinaseK (Sigma-Aldrich, ミズーリ州)	0.016g	(最終濃度 1 mg/mL)
N-Lauroysarcosine (Sigma-Aldrich, ミズーリ州)	0.16g	(最終濃度 1%)
0.5M EDTA pH8.0		16mL

菌体処理後、プラグをシャーレへ取り出し、カバーガラスを用いて1.5mm程度になるようプラグを切断し、プラグ断片とした。プラグ断片を4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE 500µLに移し、50°Cで15~20分間振盪(40min<sup>-1</sup>)し、洗浄した。洗浄後、4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TEを新しい液に交換し、同じ条件で振盪して再度洗浄した。続いて、4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TEを捨て、TE buffer 1mLに交換し、15分以上氷上にて平衡化した。TE bufferを捨て、酵素処理の前段階としてSURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes(Sigma-Aldrich, ミズーリ州)200µLに交換し、氷上で35分以上インキュベートした。SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymesを捨て、20unitsの制限酵素XbaIを含む反応液100µLに交換し、37°Cで一晩振盪した。4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE及びXbaI反応液の組成は以下のとおりである。

• 4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE	(15 mL)
100mM Pefabloc SC (Sigma-Aldrich, ミズーリ州)	0.0144 g
TE (pH8.0)	14.9856 mL

- XbaI 反応液 (1.5 mL)

XbaI (Sigma-Aldrich, ミズーリ州)	30 $\mu$ L
H buffer (Sigma-Aldrich, ミズーリ州)	147 $\mu$ L
滅菌蒸留水	1323 $\mu$ L

DNA サイズマーカーである CHEF DNA Size Standard Lambda ladder (BioRad, カリフォルニア州) をシャーレへ取り出し、カバーガラスで約 2 mm の短冊状に切断し使用した。コームにマーカーと制限酵素処理をしたプラグを静置し、プラグに付着した余分な Buffer をキムワイプ (Kimberly Clark, テキサス州) で取り除いた後、数分間乾燥させた。プラグを貼り付けたコームをゲル作成台にセットし、1% SeaKem Gold Agarose in TBE 100 mL を流し込んだ。ゲルが固まるまで 20~30 分間静置した。水準器を用いて泳動槽が水平になるように調整した。また 2.2 L の 0.5×TBE (BioRad, カリフォルニア州) を泳動 buffer とした。固まった泳動用ゲルを泳動槽に設置し、再び水平になるように調整した。泳動条件は 6.0 V/cm, スイッチ時間 2.2(initial sw time)-54.2(final sw time)秒, buffer 温度 14°C, 泳動時間 22 時間, ポンプの循環速度 100 とした。電流は最初 90~100 mA, 最終的には 150 mA とするよう調整とした。泳動装置は CHEF-DR II システム (BioRad, カリフォルニア州) を用いた。泳動後、ゲルを染色し、イルミネーターにて泳動像を確認した。また、制限酵素 XbaI を用いて実験を行った結果類似したパターンを示した株の一

部について、別の制限酵素である Bln I を用いて同様に PFGE を行った。制限酵素 Bln I は 20 units を使用し、制限酵素 Bln I を含む反応液の組成は、酵素を変更した点を除いて XbaI のものと同様である。

### (3) 豚肉における志賀毒素産生性大腸菌の汚染状況調査

2022 年の 6 月から 11 月までに岩手県内で購入した豚ミンチ肉 48 検体および豚小腸 4 検体を材料とした。用いた検体の購入日, 商品名, 購入場所は表 10 に示した。

#### 3-1 stx の PCR によるスクリーニング

本試験は「食品からの腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法」[厚生労働省, 2014] を参考とした。

食品検体 25 g をストマッカー袋に秤量し、ノボビオシン加 mEC (1) と同様) 培地 225 mL を加え、1 分間ストマッカー処理を行った後、42°C で 22±2 時間培養した。培養液 0.1 mL をマイクロチューブにとり、10,000 ×g, 10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH 85  $\mu$ L を添加して 100°C で 10 分間加熱した。その処理液に滅菌した 1M Tris-HCl (pH7.0) 15  $\mu$ L を加えて中和し、10,000 ×g, 10 分間遠心した。得られた上清を抽出 DNA とした。50 mM NaOH, 1M Tris-HCl (pH7.0) の組成は以下の通りである。

50 mM NaOH (20 mL)	
1 M NaOH	1 mL
Milli-Q water	19 mL

1 M Tris-HCl (pH 7.0)	
Trizma base	12.1 g
Milli-Q water	80 mL

Milli-Q water に Trizma base を溶解させたのち、塩酸を加え、pH 計測器で計測しながら pH 7.0 に調整した。その後 Milli-Q water で 100 mL に調整した。

抽出 DNA をテンプレート DNA とし、stx1, stx2 を検出する PCR を行った。本 PCR で用いた酵素、プライマー、サーマルサイクラーならびに PCR 反応液組成、PCR 条件は前項 (1) と同様である。PCR 反応後、増幅産物を 2 %アガロースにより電気泳動を行った。泳動後、染色し、イルミネーターにて泳動像を確認した。用いた泳動バッファー、分子量マーカー、染色剤、イルミネーターは前項 (1) と同様である。

### 3-2. 分離培養

ノボビオシン加 mEC 培地で増菌培養した培養液をマッコンキー寒天培地に塗抹し、37°C で 18~24 時間培養した。

## C. 研究結果

### 1. 牛及び豚直腸便サンプル における STEC スクリーニング及び分離

牛の直腸便 591 検体のうち stx1 または stx2 が陽性を示した検体は 140 検体 (23.7%) であった。140 検体のうち、27 検体 (4.6%) は stx1 のみ、89 検体 (15.1%) は stx2 のみ、24 検体 (4.1%) は stx1 および stx2 について陽性を示した。stx 陽性を示した 140 検体についてコロニー PCR を実施し、STEC 株を分離した。140

検体のうち、全体の 5.9%、陽性検体の 25% に当たる 35 検体から 39 株の STEC が分離された。39 株のうち 10 株は stx1 のみ、19 株は stx2 のみ、10 株は stx1 および stx2 陽性であった。39 株について、各株における性状解析および PFGE の結果を表 1-牛、図 1-牛に示した。

豚の直腸便 521 検体について stx1, stx2 遺伝子の有無を調べた。521 検体のうち stx1 または stx2 について陽性を示した検体は 252 検体 (48.4%) であった。内訳としては、stx1 のみが 3 検体 (0.6%)、stx2 のみが 246 検体 (47.2%)、stx1 および stx2 について陽性を示したのが 3 検体 (0.6%) であった。採材日別の stx 陽性率は表 6 に示した。最も高い陽性率を示したのは 2022 年 6 月 22 日の 59.3% であり、最も低い陽性率を示したのは 2022 年 8 月 2 日の 38.0% であった。また、各採材日ごとに検体を採取した順に並べると、陽性検体が続く箇所とほとんどない箇所があり、陽性検体はある程度まとまっていた (図 2)。

stx 陽性を示した 252 検体についてコロニー PCR を実施し、STEC 株を分離した。252 検体のうち、全体の 4.8%、陽性検体の 9.9% に当たる 25 検体から 26 株の STEC が分離された。26 株は全て stx2 のみ陽性であった。26 株について、各株における性状解析結果を表 2 に示した。

### 2. stx サブタイプの特異性

牛では、コロニー PCR により分離された 39 株について stx subtyping PCR を実施した。stx1 陽性を示した 20 株は全てサブタイプ

stx1a に属した。stx2 陽性を示した 29 株は stx2a, 2c, 2d のいずれかまたは複数を有しており、stx2b, 2e, 2f, 2g を有する株は検出されなかった。stx サブタイプの組み合わせとして 1a/2a : 2 株, 1a/2d : 4 株, 1a/2a/2c : 2 株, 1a/2a/2d : 1 株, 1a/2c/2d : 1 株, 2a/2c : 2 株, 2a/2d : 1 株, 2c/2d : 2 株, 2a/2c/2d : 2 株が得られた。豚では、コロニーPCRにより分離された 26 株について stx subtyping PCR を実施した。全ての株が stx2 のみ陽性であったため stx2 のサブタイプについてのみ調べた。結果、26 株全て stx2e 陽性を示し、stx2a, 2b, 2c, 2d, 2f, 2g を有する株は検出されなかった。

### 3. 凝集試験または O 抗原遺伝子の有無を標的とした PCR による O 抗原 (Og 抗原) の特定

牛では、コロニーPCRにより分離された 39 株について抗病原性大腸菌血清を用いた免疫血清凝集試験を行った。凝集試験で O 抗原が決定されたのは 0136 : 5 株, 08 : 4 株, 0157 : 2 株, 0103 : 1 株の 12 株であった。凝集試験で O 抗原が決定されなかった 27 株は Og-typing PCR によって Og 型が決定された。最も多かったのは Og113 : 7 株で、Og22 : 6 株, Og116 : 4 株, Og2, 50 : 2 株と続いた。他に Og136, Og103, Og117, 107, Og117, 107+Og179, Og130, Og163, Og171, Og183 が 1 株ずつ検出された (表 1 - 牛)。

コロニーPCRにより分離された豚由来 26 株の凝集試験で O 抗原が決定されたのは 08 で 5 株であった。凝集試験で O 抗原が

決定されなかった 21 株は Og-typing PCR によって Og 型が決定された。最も多かったのは Og8 の 11 株で、次に Og9 の 4 株であった。他に Og89, 101, 162 が 2 株, Og22, Og100, Og180 が 1 株ずつ検出された。1 株 (表 7 の株番号 11) は凝集試験および Og-typing PCR で O 抗原型または Og 型を決定することができなかった。

### 4. 病原性因子遺伝子の検出

牛では、コロニーPCRにより分離された 39 株について、6 種類 (stx1, stx2, eae, fliC, hlyA, rfbE) の病原性因子遺伝子の保有状況を調べた。39 株のうち各遺伝子について陽性を示したのは stx1 : 20 株, stx2 : 29 株, eae : 4 株, fliC : 5 株, hlyA : 23 株, rfbE : 2 株であった。eae を有した株は 0103 株, Og136 株, 0157 株, 計 4 株であった。fliC を有した株は Og22 株, Og113 株, 0157 株, 計 5 株であった。hlyA を有した株は 0103 株, Og116 株, Og130 株, 0136 または Og136 株, 0157 株, Og163 株, Og2, 50 株, OgUT 株, 計 23 株であった。rfbE を有した株は 0157 株のみであった (表 1 - 牛)。

豚由来 26 株全てで stx2 は検出されたものの、stx 以外の病原性遺伝子は検出されなかった。

### 5. 薬剤感受性試験

牛では、コロニーPCRにより分離された 39 株について、10 種類 (ABPC, CEZ, CTX, GM, KM, TC, NA, CPF, CP, ST) の薬剤に対する感受性を調べた。全ての薬剤に対して感受性であった株は 4 株で、他の 35 株は単一または複数の薬剤に対して中間耐性

または耐性を示した。35 株のうち複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した株は 20 株であった。中間耐性または耐性を示した株が多かった薬剤は TC, ABPC, KM, CP で、KM については半分以上 (28 株) が中間耐性であった。また CP 耐性を示した 8 株のうち 3 株は ABPC と TC, 4 株は TC についても耐性を示した。一方、CEZ, CTX, NA については全てまたはほとんどの株が感受性を示した (表 1-牛)。

豚由来 26 株については、全ての薬剤に対して感受性であった株は無く、全ての株が単一または複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した。26 株のうち複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した株は 23 株であった。中間耐性または耐性を示した株が多かった薬剤は ABPC, ST, KM, TC で、これらの薬剤に対して半分以上の株が耐性または中間耐性を示した。また、KM については感受性を示した株は認められなかった。一方、CEZ, CTX については全ての株が感受性を示した。

## 6. PFGE の結果

牛では、コロニーPCR で得られた 39 株について PFGE を実施した。得られた泳動像は図 1-牛に示した。

0g113 の 7 株は PFGE により 3 グループ (a, b, c) に分類された。グループ a を構成する株番号 1, 2 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも去勢された黒毛和種であった。グループ a は PFGE パターンとともに解析した全ての性状も同じ結果を示した。グループ b

を構成する株番号 3, 4, 7 の株はそれぞれ別の都道府県から得られた株であった。個体はいずれも去勢された黒毛和種であった。性状について 7 番の株のみ stx2c, flhC を保有していた点や薬剤耐性、中間耐性を示す薬剤の種類について差異が見られたものの、stx1a/2d を有していた点、ABPC と TC に耐性を示した点は共通していた。グループ c を構成する株番号 5, 6 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも雌の交雑種であった。5 番は stx2c/2d を保有していたのに対し 6 番は stx2a/2c/2d を保有していた点で差が見られたが、保有していた病原遺伝子や薬剤耐性を示した薬剤は共通していた。

0136 または 0g136 を示した 6 株のうち 3 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ d)。グループ d を構成する株番号 11, 12, 13 の株は同一都道府県内の 2 農場から得られた株であった。個体はいずれも雌の交雑種であった。薬剤耐性について 11, 12 は KM に中間耐性を示したが、13 は感受性であった点で差異が見られたが、stx サブタイプや保有していた病原遺伝子については共通していた。

0g22 の 6 株のうち 2 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ e)。個体はどちらも雌であり、一方は黒毛和種、一方は交雑種であった。グループ e を構成する株番号 14, 15 の株は異なる都道府県から得られた株であった。グループ e は PFGE パターンとともに解析した全ての性状も同じ結果を示した。

0g116 の 4 株のうち 2 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ f)。グループ f を構成する株番号 25, 26 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも去勢された交雑種であった。薬剤耐性について 25 は KM に対して中間耐性であったのに対し 26 は感受性であった点で差異が見られたが, stx サブタイプや保有していた病原因子遺伝子, 耐性を示した薬剤については共通した結果が得られた (図 1-牛)。

豚由来 26 株について得られた泳動像を図 3-1 に示した。08 または 0g8 の 16 株から 2 つ (g, h), 0g9 の 4 株から 1 つ (i), PFGE パターンの類似したグループがあった。グループ g, h については制限酵素 Bln I を用いた PFGE を実施した (図 3-2)。グループ g は株番号 6~8 (表 2) の 3 株で構成された。採材日は 3 株とも 2021 年 7 月 27 日で検体番号が 8, 9, 10 と連続していた。この 3 株は Xba I, Bln I とともに類似したパターンを示し, 薬剤感受性について ABPC, ST に耐性, KM に中間耐性を示した点は共通であったが, TC に 6 番は耐性を示したのに対し 7, 8 番は中間耐性であった点, GM に 6, 8 番は感受性を示したのに対し 7 番は中間耐性であった点で差異が見られた。

グループ h は株番号 13~16 の 4 株で構成された。採材日は 4 株とも 2021 年 7 月 27 日で検体番号は 78, 80, 83, 89 であった。この 4 株は Xba I では類似したパターンを示したが, Bln I で切断した場合に株 14 と 15 は類似したパターンだったものの, 株

13 と 16 では類似性は高いが少し違うパターンとなった。13, 14, 15 番は薬剤感受性の結果は全て共通していたが, 16 番のみ ABPC と ST に対し感受性を示した点で他の 3 株と異なっていた。

グループ i は株番号 22, 23 の 2 株で構成された。採材日は 2 株とも 2022 年 6 月 22 日で検体番号は 25, 31 であった。この 4 株は Xba I では一見類似したパターンであったが, 一部若干の違いがみられた。株番号 25 は GM に感受性であったが, 株番号 31 は中間耐性を示した点で異なっていた。

#### 7. 豚肉検体における STEC スクリーニング及び分離

豚ミンチ肉 48 検体および豚小腸 4 検体について stx1, stx2 遺伝子の有無を調べた。すべての検体で stx1, stx2 とともに陰性であり, 陽性を示した検体はなかった。

#### D. 考察

本研究では牛の直腸便 591 検体及び豚の直腸便 521 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。

まず牛では, 検体における stx のスクリーニングにおいて 23.7%に当たる 140 検体で stx1, stx2 のいずれかまたは複数が陽性を示した。

李らの報告において国内 7 地域 15 県の 110 農場から収集した 551 の牛糞便検体の PCR による stx 陽性率は 24.1% (133 検体) とされており<sup>1)</sup>, 本研究ではこれに近い結果が示された。本研究で対象となった牛は北日本 6 道県に限定されていたが, 李らの

報告の結果と stx 陽性率に大きな差がないことから、STEC の保有に地域差はなく、北日本 6 道県の牛でも国内の他の地域と同様の STEC 保菌率であると考えられる。本研究では凝集試験法または 0g-typing PCR 法で 0 抗原型、0g 抗原型を決定し、4 種類の 0 抗原型と 12 種類の 0g 型が検出された。最も得られた株数の多かった 0 型、0g 型は 0g113 であった。026, 0103, 0111, 0121, 0145, 0157 は国内におけるヒト由来腸管出血性大腸菌の主要な 0 抗原とされているが<sup>2)</sup>、このうち本研究で検出されたのは 0103, 0157 の 2 種類のみであった。また stx のサブタイプと病原性因子遺伝子 (stx1, stx2 の他に、eae, fliC, hlyA, rfbE) を PCR で調べた結果、検出されたサブタイプは stx1a, stx2a, stx2c, stx2d の 4 種類であった。FAO/WHO STEC Expert Group の報告では、HUS などの重篤な病態と関連している stx サブタイプは stx1a, stx2a, stx2c, stx2d の 4 種類であり、加えて eae の存在が病原性に大きく関与している<sup>3)</sup>。また Ethelberg らは特に stx2 と eae の両方を保有することが HUS を引き起こす重要な因子であるとしている<sup>4)</sup>。本研究で得られた株のうち、eae を保有した株は 0103 株、0g136 株、0157 株であったが、stx2 もともに保有していたのは 0157 株のみであった。0157 株は今回調査した病原性因子遺伝子を全て保有していた。以上より、本研究で得られた STEC の分離株のうち、0157 株は高い病原性を有している可能性があると考えられた。0g113 については stx の他に hlyA を有する株が 2

株検出された。0113 は牛検体から分離される株の 0 抗原型として最も一般的であるとされており<sup>5), 6)</sup>、今回はこれを支持する結果が得られた。Karmali らによる血清型を用いた STEC 病原性の疫学的分類では、0113 の一部はまれに HUS 散発例から検出されるグループ C に分類されており<sup>7)</sup>、実際にヒト臨床例から検出される例や HUS を引き起こす例も報告されている。1999 年の Paton らによって報告された、0113 が HUS を引き起こした例では、原因株は eae を欠損していた<sup>8)</sup>。また 2012 年の Monaghan らは臨床例から分離された 0113 株は hly を保有していたとしていたと報告している<sup>6)</sup>。以上より本研究で得られた 0g113 株の中にヒトに対して病原性を有する株が含まれている可能性は否定できない。ただし本研究で調べられた病原因子の数は stx を除いて 4 種類であり病原性を断定するには不十分であった可能性が高い。特に大腸菌の接着に関わる因子は病原性の決定に重要であり、saa や iha など eae 以外にも複数調べる必要があると考えられる。調査する病原性因子を増やすことで 0157 以外の株の病原性が明らかになることも十分に考えられる。

本研究で得られた株の 0 抗原型、0g 型と stx サブタイプについて、同じ 0 抗原または 0g 型を示した株では共通の stx サブタイプを保有している例が見られた。0g113 に分類された 7 株は全て stx2d を有しており、0136, 0g136 を示した 6 株は全て stx1a を有していた。0113 については共通して stx2d を有しているという報告が複数

存在する<sup>6), 9)</sup>。今回の結果は 0 抗原型と stx サブタイプにはある程度の相関があるとする説を支持するものとなった。stx サブタイプと病原性の関連が指摘されていることから、0 抗原型と stx サブタイプの相関が明らかになることで 0 抗原型のみでの信憑性の高い病原性の推測ができるようになる可能性が考えられる。

薬剤感受性について、テトラサイクリン、アンピシリン、クロラムフェニコール、ST 合剤の順に耐性を示した株が多く、カナマイシンでは 28 株が中間耐性を示した。テトラサイクリン、アンピシリン、サルファ剤、カナマイシンは牛での使用量の多い抗菌薬である<sup>10)</sup>。これら 4 剤については抗菌薬使用量の多さが原因となり耐性菌が認められたと考えられる。一方でクロラムフェニコールについては使用実態が無いのにも関わらず耐性菌が複数認められた。クロラムフェニコール耐性を示した株はアンピシリン、テトラサイクリンについても耐性を示している株が多く、原田らの報告ではクロラムフェニコール耐性が他薬剤によって共選択されている可能性が指摘されている<sup>11)</sup>。したがって今回検出されたクロラムフェニコール耐性はアンピシリンやテトラサイクリンによって共選択されたものと考察された。このように抗菌薬の乱用は使用していない薬剤に対する耐性菌の出現も促進すると考えられるため、抗菌薬の慎重な使用が引き続き求められる。

STEC の主要 6 抗原に分類される 0103, 0157 の株はどの薬剤に対しても耐性を示

さなかった。また 3 剤以上耐性を示した株は 39 株中 4 株であった。ヒトの医療に重要とされる第三世代セファロスポリンのセフトキシムやフルオロキノロン系薬剤のシプロフロキサシンについては全てまたはほとんどの株が感受性を示した。以上のことから、薬剤耐性のみについて考えるとヒトの医療に由々しき影響を与えうるような STEC の薬剤耐性状況ではないと言える。STEC における薬剤耐性菌の出現状況が悪化しないよう、抗菌薬の慎重な使用に加え定期的なモニタリングも求められる。

PFGE では個体、農場、都道府県をまたいで同一泳動パターンの株が得られた。調査した遺伝子の保有状況や薬剤感受性については差異が見られたが、PFGE パターンが同一であった株は由来が同じまたは比較的近縁であった可能性が高いと考えられる。今回の結果より農場内のみならず農場、都道府県をまたいで菌株が拡散している可能性が示唆された。今回拡散していることが確認された菌株は比較的病原性が低いと考えられるものであったが、高病原性の STEC が同様に拡散した場合、食中毒リスクが上昇する可能性が考えられる。菌株の拡散状況についてモニタリングを継続するとともに拡散経路を解明することで食中毒予防に貢献するものと考えられる。一方で PFGE では株の遺伝的近縁性のある程度予測することが限界であり、詳細な遺伝的近縁性を判断するには MLVA 法など別の方法により分子疫学的解析を強化することや全ゲノムシー

クエンスが必要である。STEC 分離株の解析情報と菌株に関する疫学情報を組み合わせることで、食中毒予防に向けたより信頼性の高い情報提供が可能になるものと考えられる。

一方、豚の直腸便 521 検体に由来する STEC では、48.4%に当たる 252 検体で stx1, stx2 のいずれかまたは両方が陽性を示した。また陽性になった 252 検体のうち 246 検体は stx2 陽性であった。また STEC 株分離率は 4.8%であった。

日本における豚糞便から分離された STEC について、木島らは STEC 分離率 14%、小林は stx 陽性率 4.9%、福山らは STEC 分離率 10.7%と報告している<sup>12), 20), 21)</sup>。一方、アメリカでは Cha らの縦断的コホート研究で調査期間中に 68.3%の豚から少なくとも 1 回は STEC が検出され、Fratamico らは stx 陽性率 70%、Remfry らはリアルタイム PCR による調査で stx 陽性率 70.1%であったと報告している<sup>14), 22), 18)</sup>。本研究では分離率は 4.8%とそれほど高くなかったものの、stx 陽性率は 48.8%とこれまで国内で報告されてきたものより高い数値となった。アメリカでは先述のように高い STEC 陽性率、分離率が報告されており、国内では 1999 年に中沢ら、2003 年には福山らによって健康な豚から 0157:H7 の分離が確認されているため<sup>15), 21)</sup>、引き続き国内の豚の STEC 陽性率や分離株の性状について調査する必要があると考えられる。分離率が低かった理由としてはバックグラウンドの微生物が多かった可能性や、目的の大腸菌が VBNC の状態であった可能性、

手技的な問題等が挙げられる。

本研究で分離された 26 株は全て stx2e を保有していた。また 26 株中 16 株は 08 または 0g8 に分類され、続いて 0g9 が 4 株、0g89, 101, 162 が 2 株、他には 0g100, 0g22, 0g180, 0g 不明が 1 株ずつ得られた。豚では Stx2e 産生性 STEC による浮腫病が知られている。浮腫病が発生するためには Stx2e 産生性 STEC が小腸に移行し、定着することが前提条件となる<sup>23)</sup>。Parma らはアルゼンチンにおける調査で 08, 0138, 0139 が浮腫病と関連していると報告している<sup>17)</sup>。またアメリカにおける Remfry らの報告では 08 が豚で最も頻繁に分離されており、今回の結果と一致した<sup>18)</sup>。よって今回分離された株は浮腫病との関連が疑われるため、今後浮腫病原菌の特徴である F18 線毛の有無を調査するなどさらなる検討が必要であると考えられる。

一方、ヒトで食中毒の原因となることが多い 026, 0103, 0111, 0121, 0145, 0157 といった主要 6 抗原の血清型の株は本研究では分離されなかった。病原性因子についても eae や hlyA といった病原性に大きく関わりとされる遺伝子は検出されなかった。Friedrich らによると stx2e はヒトの下痢症に関連している可能性はあるが HUS との関連はないとされるため<sup>19)</sup>、本研究で豚より分離された株はヒトに重篤な病態をもたらす可能性は低いと考えられる。一方、緒言でも述べたように下痢症や HUS 患者から Stx2e 産生株が検出された例もあり、Zweifel らは豚の Stx2e 産生 STEC がヒトへの感染源となる可能性を排

除できないと報告していることから<sup>24)</sup>、病原性因子についてさらに調査するなど、ヒトへの影響についてはさらなる検討が必要であると考えられる。

薬剤感受性試験ではアンピシリン、ST 合剤、カナマイシン、テトラサイクリンについて耐性または中間耐性を示す株が多数得られた。本研究で薬剤感受性試験に使用した薬剤では、テトラサイクリン、スルファメトキサゾール、アンピシリン、トリメトプリム、カナマイシンの順に実際の使用量が多い<sup>25)</sup>。したがって今回得られた結果については抗菌薬の使用量の多さが原因となり耐性菌が認められたと考えられる。一方、ヒトの医療に重要とされる第三世代セファロスポリンのセフォタキシムについては全ての株が感受性を示した。フルオロキノロン系薬剤のシプロフロキサシンについては中間耐性を示した株が認められたものの耐性を示した株は認められなかった。以上のことから薬剤耐性のみについて考えるとヒトの医療に重大な影響を与えうるような STEC の薬剤耐性状況ではないと言える。

PFGE の結果、類似したパターンを示したグループが 3 つ (g, h, i) あった。グループ g の株は Xba I, Bln I 共に類似したパターンを示した。これらは採材日が同じかつ検体番号が近いこと、同一農場由来の可能性が高いと考えられる。また、グループ h と i では類似したパターンをもつ株の中に、わずかに相違がある株がみられた。よってこれらは関連性を示唆する株と考えられる。さらに、スクリーニ

ングにおいて陽性検体がある程度まとまっていたこともあわせて考えると、農場ごとに STEC の保持状況に差がある可能性が示唆される。

よって今後、農場間の差や農場をまたいで同一株が拡散しているかについて調査するためには、検体の由来農場について把握することが必要だと考えられる。

本研究ではさらに豚検体および豚小腸検体における STEC 汚染状況を調査した。PCR によるスクリーニングの結果 stx 遺伝子陽性の検体はなく、今回調べた豚肉の STEC 汚染は極めて少ないと考えられた。その理由としては、今回調査した豚肉を処理した処理場や加工場での衛生管理レベルが高いことが考えられる。しかし今回の調査では検体数も少なく、前述のように糞便における STEC 陽性率は高い値であったことから、今後も調査を継続する必要があると考えられる。

#### (参考文献)

1. Lee K, Kusumoto M, Iwata T, Iyoda S and Akiba K. (2017). Nationwide investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups. *Epidemiology & Infection*.**145**:1557-1566.
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. (2014). 腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について. 食安監発 1120 第 1 号.
3. FAO/WHO STEC Expert Group. (2019). Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin-

- Producing *Escherichia coli* on a Risk Basis. *Journal of Food Protection*. 82 (1) : 7-21.
4. Ethelberg S, Olsen KEP, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Engberg J, Petersen AM, Olsen B, Gerner-Smidt P and Mølbak K. (2004). Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (5): 842-847.
  5. Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I and Misawa N. (2014). Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *Journal of Food Protection*. 77(8):1269-1274.
  6. Monaghan AM, Byrne B, McDowell D, Carroll AM, McNamara EB and Bolton DJ. (2012). Characterization of farm, food, and clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O113. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9(12):1088-1096.
  7. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K and Kaper JB. (2003). Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(11):4930-4940.
  8. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA and Paton JC. (1999). Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(10):3357-3361.
  9. Miko A, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N, Krause G and Beutin L. (2009). Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(20):6462-6470.
  10. 農林水産省動物医薬品検査所. (2019). 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量. 動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器販売高年報 別冊.
  11. Harada K, Asai T, Kojima A, Ishihara K and Takahashi T. (2006) Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *American Journal of Veterinary Research*. 67 (2) : 230-235.
  12. Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Kojima A, Morioka A, Nagata R, Kawanishi M, Nakazawa M, Tamura Y and Takahashi T. (2005). A National Surveillance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food-Producing Animals in Japan. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 52: 230-237.
  13. 小林秀樹. (2013). 動物における人獣共通病原性大腸菌の保有状況と特徴. 農林水産省委託プロジェクト 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発 技術情報

- 集 p26.
14. Cha P, Fratamico PM, Ruth LE, Bowman AS, Nolting JM, Manning SD and Funk JA. (2018). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in finishing pigs: Implications on public health. *International Journal of Food Microbiology*. 264: 8-15.
  15. Nakazawa M, Akiba M and Sameshima T. (1999). Swine as a Potential Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerging Infectious Diseases*. 5(6):833-834.
  16. 石川弘道 (2005). カラー版すぐに役立つ現場の豚病対策. 有限会社ベネット, 東京.
  17. Parma AE, Sanz ME, Viñas MR, Cicuta ME, Blanco JE, Boehringer SI, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J and Blanco M. (2000). Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 72(3-4):269-276.
  18. Remfry SE, Amachawadi RG, Shi X, Bai J, Woodworth JC, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD, DeRouchey JM and Nagaraja TG. (2020). Polymerase Chain Reaction-Based Prevalence of Serogroups of *Escherichia coli* Known to Carry Shiga Toxin Genes in Feces of Finisher Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. 17(12):782-791.
  19. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A and Karch H. (2002). *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *The Journal of Infectious Disease*. 185: 74-84.
  20. 小林秀樹. (2014). 牛・豚が保有する病原性大腸菌の細菌学的特性の解明と疫学的解析基盤の構築. 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発 技術情報集: 149-155.
  21. 福山正文, 古畑勝則, 大仲賢二, 八木原怜子, 小泉雄史, 原元宣, 堂ヶ崎知格, 島田時博, 栗林尚志, 中澤宗生, 渡邊忠男. (2003). 豚からの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型. *感染症学雑誌*. 77(12): 1032-1039.
  22. Fratamico PM, Bagi LK, Bush EJ and Solow BT. (2004). Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swine Feces Recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12): 7173-7178.
  23. 小林秀樹. (2018). 豚の浮腫病と離乳後下痢ならびにそれらの対策について. *All about SWINE*. 53: 13-24.
  24. Zweifel C, Schumacher S, Beutin L, Blanco J and Stephan R. (2006). Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Veterinary Microbiology*. 117(2-4): 328-332.
  25. 農林水産省動物医薬品検査所. (2020). 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量. 動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器販売高年報 別冊.

## E. 結論

本研究では牛の直腸便 591 検体及び豚 521 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。

牛では、stx 陽性率は 23.7%となり、35 検体から 39 株が分離された。病原因子、薬剤感受性の観点から公衆衛生学的に対応が求められるような菌株の検出は少数にとどまった。一方、農場や都道府県をまたいで拡散している遺伝学的に近縁と考えられる菌株が検出された。

豚では、stx 陽性率は 48.8%となり、25 検体から 26 の株が分離された。陽性率はこれまで国内で報告されてきたものより高い値となったが、公衆衛生学的に重要である、主要な O 抗原や病原性因子を保有するような食中毒リスクの高い株は分離されなかった。

さらに本研究では豚ミンチ肉 48 検体および小腸 4 検体における STEC 汚染状況を調査した。stx 陽性検体はなく、STEC による汚染の可能性は低いと考えられた。

また、本研究で得られた牛由来 STEC と豚由来 STEC を比較した結果、菌株の性状に関して共通点よりも相違点の方が多く認められた。豚由来 STEC について由来農場の情報を収集する他、調査を継続し結果を蓄積することが必要であると考えられる。豚由来 STEC について日本国内における報告は限られているため本調査を継続することは STEC 食中毒の原因究明に大きく貢献すると期待される。また牛由来 STEC との比較により拡散経路の解明の一助になると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

・和賀萌美，品川正臣，山田翔子，山崎朗子，寺嶋淳．岩手県の食肉処理場に搬入された牛の直腸便における志賀毒素産生性大腸菌の性状解析 第 42 回日本食品微生物学会学術総会(WEB 開催) 令和 3 年 9 月 21 日 (火) ～10 月 20 日 (水)

・山田翔子，和賀萌美，推野千紘，山崎朗子，寺嶋淳．岩手県の食肉処理場に搬入された豚の直腸便および豚肉における志賀毒素産生性大腸菌の性状解析．第 118 回日本食品衛生学会学術講演会 令和 4 年 11 月 9 日～11 月 11 日

・山田翔子，和賀萌美，推野千紘，山崎朗子，寺嶋淳．岩手県の食肉処理場に搬入された豚の直腸便における志賀毒素産生性大腸菌の性状解析．第 24 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 令和 4 年 10 月 13 日～10 月 14 日

## 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

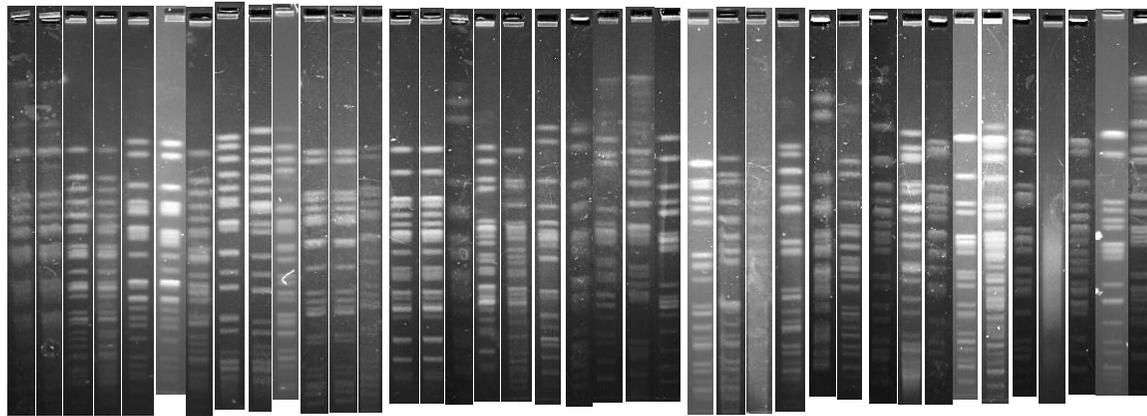
表-1 (牛)

株番号	採材日 (年月)	stx	O抗原	Og-typing	農場	齢(月-日)	品種	性別	病原性因子							薬剤耐性							PFGE		
									stx1	stx2	fla-C	eae	rfbE	hlyA	ABPC	CEZ	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX		CP	ST
1	200915	1a/2d	×	Og113	A	29-15	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	a
2	200915	1a/2d	×	Og113	A	30-3	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	a
3	210405	1a/2d	×	Og113	B	27-5	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	R	I	S	S	R	b
4	210405	1a/2d	×	Og113	C	30-2	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	b
5	210609	2c/2d	×	Og113	D	25-3	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	c
6	210609	2a/2c/2d	×	Og113	D	26-4	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	c
7	210714	1a/2c/2d	×	Og113	E	27-14	黒毛和種	去勢	○	○	○	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	b
8	200703	1a	O136	—	F	64-1	黒毛和種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
9	210205	1a	O136	—	G	27-27	交雑種	去勢	○	×	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	
10	210205	1a	×	Og136					○	×	×	○	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
11	210609	1a	O136	—	D	25-24	交雑種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	d
12	210609	1a	O136	—					○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	d
13	210623	1a	O136	—	H	26-13	交雑種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	d
14	200610	2d	×	Og22	I	26-14	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	e
15	200703	2d	×	Og22	J	28-27	交雑種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	e
16	200703	2c	×	Og22	K	25-2	交雑種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	
17	210405	2d	×	Og22	C	29-16	黒毛和種	去勢	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	
18	210714	2c/2d	×	Og22	E	27-14	黒毛和種	去勢	×	○	○	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	
19	210714	1a/2a/2c	×	Og22	L	26-1	交雑種	去勢	○	○	○	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
20	200703	2a/2d	O8	—	F	37-16	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
21	210205	2c	O8	Og8	M	71-15	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
22	210205	2c	O8	Og8					×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
23	210405	1a/2a/2c	O8	Og8	N	26-14	交雑種	雌	○	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
24	210609	2a/2c	×	Og116	O	24-5	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	
25	210623	2a	×	Og116	H	26-5	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	f
26	210623	2a	×	Og116	H	25-28	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	f
27	210714	2a/2c	×	Og116	L	25-27	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	
28	200731	2a	×	Og2,50	P	27-4	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	
29	210714	2a/2c/2d	×	Og2,50	Q	26-19	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	
30	200731	1a/2a	<b>O157</b>	—	R	25-21	交雑種	去勢	○	○	○	○	○	○	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
31	210714	1a/2a/2d	<b>O157</b>	—	L	26-7	交雑種	去勢	○	○	○	○	○	○	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	
32	200703	1a	<b>O103</b>	Og103	K	25-12	交雑種	雌	○	×	×	○	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
33	210609	1a	×	Og117,107	S	28-17	黒毛和種	去勢	○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	
34	210609	1a	×	Og117,107+Og179					○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	R	R	R	
35	200915	2a	×	Og130	T	189-24	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
36	210609	1a/2a	×	Og163	U	155-25	黒毛和種	雌	○	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
37	200731	2c	×	Og171	P	27-21	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
38	210405	1a	×	Og183	C	29-30	黒毛和種	去勢	○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	I	I	S	S	S	S	
39	210205	2a	×	OgUT	V	27-6	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	

图 1 - 牛

No.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39



a a b b c c b

d d d e e

f f

PFGE Group

図2 豚採材日別陽性率

210419			
1		51	
2		52	
3		53	
4		54	
5		55	
6		56	
7		57	
8		58	
9		59	
10		60	
11		61	
12		62	
13		63	
14		64	
15		65	
16		66	
17		67	
18		68	
19		69	
20		70	
21		71	
22		72	
23		73	
24		74	
25		75	
26		76	
27		77	
28		78	
29		79	
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40		90	
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			

210727			
1		51	
2		52	
3		53	
4		54	
5		55	
6		56	
7		57	
8		58	
9		59	
10		60	
11		61	
12		62	
13		63	
14		64	
15		65	
16		66	
17		67	
18		68	
19		69	
20		70	
21		71	
22		72	
23		73	
24		74	
25		75	
26		76	
27		77	
28		78	
29		79	
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			

211221			
1		51	
2		52	
3		53	
4		54	
5		55	
6		56	
7		57	
8		58	
9		59	
10		60	
11		61	
12		62	
13		63	
14		64	
15		65	
16		66	
17		67	
18		68	
19		69	
20		70	
21		71	
22		72	
23		73	
24		74	
25		75	
26		76	
27		77	
28		78	
29		79	
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40		90	
41		91	
42		92	
43		93	
44		94	
45		95	
46		96	
47		97	
48		98	
49		99	
50		100	
		101	

220602				
1		51	101	
2		52	102	
3		53	103	
4		54	104	
5		55	105	
6		56	106	
7		57	107	
8		58	108	
9		59	109	
10		60	110	
11		61	111	
12		62	112	
13		63	113	
14		64		
15		65		
16		66		
17		67		
18		68		
19		69		
20		70		
21		71		
22		72		
23		73		
24		74		
25		75		
26		76		
27		77		
28		78		
29		79		
30		80		
31		81		
32		82		
33		83		
34		84		
35		85		
36		86		
37		87		
38		88		
39		89		
40		90		
41		91		
42		92		
43		93		
44		94		
45		95		
46		96		
47		97		
48		98		
49		99		
50		100		

220802				
1		51	101	
2		52	102	
3		53	103	
4		54	104	
5		55	105	
6		56	106	
7		57	107	
8		58	108	
9		59	109	
10		60	110	
11		61	111	
12		62	112	
13		63	113	
14		64	114	
15		65	115	
16		66	116	
17		67	117	
18		68	118	
19		69	119	
20		70	120	
21		71	121	
22		72	122	
23		73	123	
24		74	124	
25		75	125	
26		76	126	
27		77	127	
28		78	128	
29		79	129	
30		80		
31		81		
32		82		
33		83		
34		84		
35		85		
36		86		
37		87		
38		88		
39		89		
40		90		
41		91		
42		92		
43		93		
44		94		
45		95		
46		96		
47		97		
48		98		
49		99		
50		100		

表2 豚由来26株の性状一覧

株番号	採材日 (年月)	検体番号	stx	O抗原	Og-typing	病原性因子							薬剤耐性							PFGE				
						stx1	stx2	fli-C	eae	rfbE	hlyA	ABPC	CEZ	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX	CP	ST	MEPM	Xba I	Bln I
1	210419	#3-2	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	I	S	I	S	S	S		
2	210419	#77-1	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	R	S	S	R	I	S		
3	210419	#78-7	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	S	S	I	S	R	S		
4	210419	#78-11	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	R	S	S		
5	210727	#1-5	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	R	R	S	S	R	R	S		
6	210727	#8-20	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	R	S	g	g
7	210727	#9-2	2e	O8	—	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	I	S	S	S	R	S	g	g
8	210727	#10-15	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	g	g
9	210727	#23-1	2e	—	Og100	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	R	S	I	S	R	S		
10	210727	#38-15	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	I	I	R	S		
11	210727	#40-1	2e	—	OgUT	×	○	×	×	×	×	R	S	S	R	R	R	S	I	S	S	S		
12	210727	#70-3	2e	—	Og180	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S		
13	210727	#78-20	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h'
14	210727	#80-18	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h
15	210727	#83-1	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h
16	210727	#89-5	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	h	h''
17	211221	#2-2	2e	-	Og89,101,162	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	I	S	S	S		
18	211221	#3-2	2e	-	Og89,101,162	×	○	×	×	×	×	S	S	S	R	I	S	S	I	S	S	S		
19	211221	#24-3	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S	S		
20	211221	#87-2	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S		
21	211221	#93-1	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S		
22	220622	#25-5	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	i	
23	220622	#31-5	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	i'	
24	220622	#39-3	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S		
25	220622	#66-7	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S		
26	220802	#124-10	2e	-	Og22	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S		

図 3-1 XbaI を用いた PFGE 結果

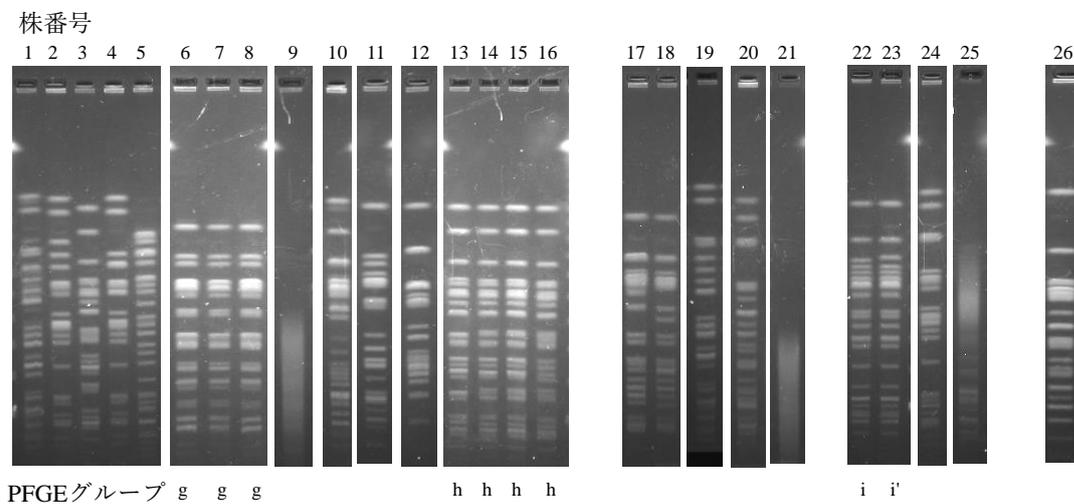


図 3-2 BlnI を用いた PFGE 結果

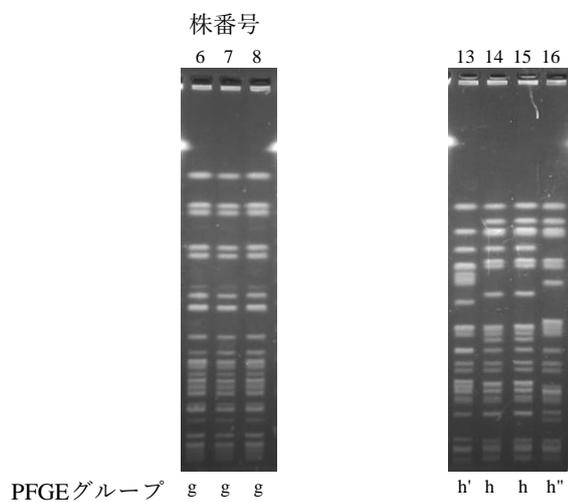


図 3 豚糞便から分離された STEC 26 株 PFGE 結果

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」

### 分担研究報告書

#### 反復配列多型解析法の有効性の検証・精度管理手法の確立

研究代表者<sup>1)</sup> 大西 真 国立感染症研究所 副所長  
研究代表者<sup>2)</sup> 明田 幸宏 国立感染症研究所 細菌第一部長  
研究分担者 平井 晋一郎 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

<sup>1)</sup> 令和2-3年度研究代表者

<sup>2)</sup> 令和4年度研究代表者

腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学的解析法である反復配列多型解析（MLVA）法は、地方衛生研究所（地衛研）における食中毒サーベイランスで用いられている。食品流通網の充実により以前とは食中毒の形態が変わりつつあるため、近年に分離されたEHEC菌株を使ってMLVA法の有効性を再検証する必要があるだろう。一方で、MLVA法が持つ能力をサーベイランスで活かすには、地衛研の検査精度も高くなければならない。そこで、本研究ではMLVA法の菌株間の類似性を判定する能力（分離能）を検証するために、2016～2020年に、国内で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株を用いて各年の多様度指数（SDI）を算出した。その結果、2017年の0111のSDIが0.925とやや低かったが、それ以外は0.95以上だった。全国規模のEHEC 0157集団事例が発生した2018年でもSDIが高かったことは、MLVA法の分離能が高く、同一クローン由来の菌株間の僅かな違いも認識できることを示している。次に、海外から持ち込まれたEHEC菌株をMLVA法で解析した場合の判定基準を検証するために、公共データベースに登録されているEHECのゲノムデータを使って、*in silico*でMLVA法を行った。その結果、同一集団事例由来の菌株間におけるタンデムリピートの違いは2領域以内だったことから、2領域違いを同一クローン由来の基準とするべきだろう。さらに、地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験を行ったところ、参加した47施設中39施設が全検体に正しく回答した。不正解の検体があった施設に実験工程を照会したところ、基本的な工程を正しく行えていなかった。例えば、解析ファイルのBin設定が正しくなかった施設、電気泳動の際にDNAの添加を忘れた施設があった。これら施設には改善法を示したが、全地衛研の約3割は本研究の精度管理試験に未参加である。我が国のサーベイランスの精度を上げるためにも、MLVA法の検査精度試験の継続が必要だろう。

#### A. 研究目的

全国の地方衛生研究所（地衛研）では食中毒を早期に探知するために分子疫学的解析法によるサーベイランスが行われている<sup>1)</sup>。これまで、サーベイランスでは菌株間の類似性を判定する能力（分離能）に優れたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法が用いられてきた。しかし、PFGE法は迅速性に欠け、さらに結果が画像データであるために自治体間での共有には不向きである<sup>1)</sup>。

近年、腸管出血性大腸菌（EHEC）の新しい分子疫学的解析法として開発された反復配列多型解析（MLVA）は、特定遺伝子領域における繰り返し配列の（TR）数の比較により菌株間の類似性を判定する

方法である<sup>2)</sup>。MLVA法の分離能はPFGE法と同程度以上であると報告されている<sup>3)</sup>。また、MLVA法ではPCR法を用いるため、PFGE法と比較し短時間で解析結果を出すことが可能である。さらに、MLVA法の結果は数値であるため、自治体間での結果の比較が容易、つまり、広域な食中毒への対応に適すると利点もある。そこで、2018年に厚生労働省は地方自治体に対して、EHECの食中毒調査等で用いる分子疫学的解析としてはPFGEからMLVA法へ統一する様に通知した（平成30年2月8日付け健感発0208第1号、薬生食監発0208第1号）。

MLVA法のサーベイランスでの有効性を担保するには、近年に国内で分離された

EHEC菌株を用いてTRパターンの多様性を検証する必要がある【2年目】。過去の研究では<sup>3)</sup>、国内で分離されたEHEC菌株をMLVA法で解析したところ、多様な菌株が分布していた。しかし、近年、食品流通網の拡大・複雑化に伴い、食中毒の期間の長期化、規模が拡大しつつある<sup>4)</sup>。2018年の夏に、分子疫学的解析法でほぼ同じTRパターンを持つEHEC 0157菌株が全国的に蔓延し、ある汚染食品の流通が原因と思われた<sup>5)</sup>。2012年8月には、EHEC 0157に汚染された白菜の浅漬が食品流通網を介して北海道から山形県、東京都、神奈川県、奈良県、大阪府にまで広がり、最終的に160名以上もの感染者が発生した<sup>6)</sup>。この様に食中毒の形態が変わりつつある現在、我が国に分布するEHEC菌株におけるMLVA法の結果の多様性に变化があるかもしれない。

さらに、海外で分離されたEHEC菌株のゲノムデータを用いて同一食中毒事例由来の菌株であるかの判定基準の再検証も必要だろう【2年目】。食生活の多様化により輸入食品を原因とした食中毒も増加していると思われる。海外の研究によってEHECのMLVA法の検証が行われている。しかし、海外の多くのMLVA法の研究ではアメリカ合衆国CDCが推奨する8領域の解析が採用されている<sup>7)</sup>。従って、我が国で採用されている17領域のMLVA法を用いて、海外のEHEC菌株に対する有効性を検証する必要がある。一方で、EHECの中で分離頻度が高い血清型である0157では、地域間で異なる進化系統学的集団(PG)の菌株が分布していると報告されている<sup>8)</sup>。特定の菌種をMLVA法で解析すると、各PGの菌株は固有の遺伝子型を持つと報告されていることから<sup>9)</sup>、海外と日本に分布するEHEC菌株では、各遺伝子領域のTR数の多様性が大きく異なるかもしれない。もしかしたら、海外で分離された菌株については同一クローン由来であるかの判定基準を変えるべきかもしれない。

MLVA法によるサーベイランスでは、食中毒等の疫学的関連性が確認されないにも関わらず、類似したTRパターンを持つEHEC菌株が一定期間、広域に蔓延することが、毎年確認されている<sup>10)</sup>。これら菌株間のTRパターンの違いは時間の経過とともに徐々に増加することから同一クローンから発生したと思われる<sup>11)</sup>。一般的に、病原体は宿主内では負の自然選択圧がかかり、多様性が抑えられる<sup>12)</sup>。反対に、宿主外では正の自然選択圧がかかるために多様性が増加する。従って、類似したTRパターンを持つEHEC菌株の蔓延する原因として、あるクローンが食品流通網に乗ったこと等により宿主外で維持され、時間経過に伴い菌株の多様性が増加したと考えられる。一方で、蔓延が一定

期間で終わる原因として、菌株が付着した食品等が消費されたことが考えられるが、もしかしたら、多様性が増加し過ぎてMLVA法では同一クローン由来と判断できなくなったのかもしれない。蔓延菌株に対するMLVA法の有効性を証明するためにも、宿主外で長期的に維持されたEHEC菌株のTRパターンの変化を調査するべきだろう【3年目】。

MLVA法が有効な分子疫学的解析法であったとしても、その能力を公衆衛生分野の検査でより活かすには、地衛研での検査精度を高く保つ必要がある。感染者が複数自治体に存在する食中毒事例をMLVA法で検査する場合、1つの地衛研に菌株を集めて検査する必要はなく、地衛研間でTRパターンを共有するだけで対応できる。しかし、MLVA法では結果が数値のみのため、解析の失敗を見抜く手がかりが殆どなく、誤った結果を自治体間で共有してしまう恐れもある。MLVA法の結果共有性を活かすには、地衛研における精度管理を行う必要がある。

地衛研に対して適切に精度管理試験を行う上で、試験に適した検体を選定する必要がある【1年目】。ある研究では、検査過程での培養により、特定のEHEC菌株は他の菌株と比べて変異の蓄積量が優位に多いことを報告している<sup>13)</sup>。このような菌株をMLVA法で解析する場合、配布後にTR数が変わってしまうかもしれない。また、TRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が頻繁に起こる菌株も存在する。非特異的な増幅が起きる菌株を精度管理試験で配布すると、MLVA法の検査精度を正しく評価できない恐れがある。一方で、精度管理において菌株DNAを配布して試験を行う場合、輸送期間中にDNAの品質が低下するかもしれない。MLVA法で用いるMultiplex PCRにおいて、幾つかの領域は増幅効率が低いことが知られている<sup>14)</sup>。増幅効率が低い領域では、DNAの品質低下によりTRが検出されなくなる可能性がある。配布用のDNAは品質低下が起きにくい方法で抽出される必要がある。

MLVA法精度管理において配布する菌株及びDNA抽出法を決めた後は、全国規模で精度管理試験を行う前に、一部の地衛研を対象としたプレ試験を行う必要がある【2-3年目】。精度管理プレ試験の主な目的は、全国の地衛研を対象とした試験での検証項目を決めることである。また、全国規模での精度管理試験の実施中に起こり得る問題を事前に把握し、改善策を立てるためにも、プレ試験の実施が有効である。プレ試験への参加施設の検査能力が低い場合、試験内容の正解率が低くなり、全国規模での精度管理試験での内容を決定できなくなるおそれがある。そこで、プレ試験にはMLVA法を日常業務として実施している施設に参加いただく必要があるだろう。

以上より、MLVA法の分子疫学的解析法としての有効性を確かめるために、本研究2年目には、近年に国内で分離されたEHEC菌株を用いて、MLVA法データの多様性を経時的に調査した。また、海外で発生したEHECの集団食中毒及び集団感染症事例由来の菌株のMLVA法データを解析し、同一クローン由来菌株であるかの判定基準も検証した。3年目には、長期的・連続的な継代培養により、蔓延菌株を模擬的に作成し、TR数の変化を観察した。

次に、地衛研を対象としたMLVA法の精度管理試験を行うために、本研究1年目に、継代培養によるTR数の変化を観察することで試験に適したEHEC菌株を探した。また、DNAの品質低下がTRの検出に与える影響を調査し、試験に適切なDNA抽出法も検討した。2年目には、一部の地衛研を対象としたEHECのMLVA法の精度管理プレ試験を行い、全国規模での試験における検証項目を決定した。3年目には、全国の地衛研を対象としたEHECのMLVA法の精度管理試験を行い、地衛研の検査精度を評価した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株の選定【1年目】

全国各地で感染者から分離されたEHEC菌株は、厚生労働省の通知に基づき地衛研を介して国立感染症研究所（感染研）に集積される。本研究のために、過去に感染研に搬入された全国のEHEC菌株の中から、千葉県で分離された菌株を抽出した。次に、抽出した菌株の中からEHEC 0157については2016～2019年に、EHEC 026と0111については、2015～2019年に分離された菌株を抜き出した。抜き出された352菌株のEHEC 0157、102菌株のEHEC 026、及び22菌株のEHEC 0111の各血清型について、感染研で実施済みのMLVA法の結果を基にMLVA-mateを使ってminimum spanning tree (MST) を作成した<sup>15)</sup> (図1)。供試菌株を多様な特徴を持つ集まりとするために、MST上の位置で偏りが出ない様に菌株を選定した。その結果、10菌株のEHEC 0157、5菌株のEHEC 026及び4菌株のEHEC 0111が選ばれ(表1)、これら菌株を「B. 研究方法」の「2. MLVA法の有効性の検証」及び「3. MLVA法の精度管理試験の実施」で用いた。

### 2. MLVA法の有効性の検証【2-3年目】

#### a. 国内で分離されたEHEC菌株に対するMLVA法の有効性の検証【2年目】

2016～2020年に全国の地衛研で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株の内、感染研に搬入された全菌株について、感染研で実施済みのMLVA法の結果を使って、MLVA法の菌株間の分離能を検証した。各年に搬入された各血清型の菌株について、以下の式を用いてSimpson's

Diversity Index (SDI) を算出した<sup>16)</sup>。

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

$D$ はSDI、 $M$ は各血清型の総菌株数、 $S$ はMLVA法の遺伝子型の総数、 $n_j$ は $j$ 番目のMLVA型に属する菌株数を意味する。SDIが1.0の時、その年に搬入された1つの血清型の全菌株が、MLVA法により互いに異なる遺伝子型に分かれることを示す。反対に、SDIが0の時、全菌株が同じ遺伝子型であることを示す。各血清型のSDIについてカイ二乗検定を行い、搬入年間で有意な増減があるかを調査した。

#### b. 海外で分離されたEHEC菌株に対するMLVA法の有効性の検証【2年目】

我が国の地衛研及び感染研で用いられている17領域のMLVA法が海外で分離されたEHEC菌株においても有効であるかを調査した。最初に、検索エンジンPubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) に収載されている文献から、海外で発生したEHEC 0157、025及び0111の集団食中毒及び集団感染症事例を報告している文献を抽出した。次に、抽出された文献から、集団事例であるとの判断が疫学的調査及びPFGE法の結果に基づいている研究を選んだ。さらに、集団事例由来の菌株について全ゲノムシーケンスが行われており、contig配列が公共のゲノムデータベースに登録されている文献を選んだ。最後に、集団事例由来の菌株のcontig配列を公共のゲノムデータベースから得た後、MEGA11 Software<sup>17)</sup>を使って *in silico*でMLVA法を行った。

#### c. 蔓延菌株に対するMLVA法の有効性の検証【3年目】

蔓延菌株を模擬的に作成するために、表1から4菌株を選び、2つの方法で長期的・連続的に継代培養を行った(表2)。1つ目の継代培養方法では普通寒天平板培地(日水製薬株式会社)を用いた。具体的には、冷凍保存されている各菌株を普通寒天平板培地に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。滅菌済み綿棒で1つのコロニーを釣菌し、新しい普通寒天平板培地に隙間ができない様に塗布した。その後、10日間に3回の頻度で、以下の通り継代培養を行った。37°Cで静置培養後、平板培地の半分に発育した菌体を滅菌済み綿棒で掻き取り、2 mLの生理食塩水に懸濁した。新しい滅菌済みの綿棒を懸濁液に十分に浸し、新しい普通寒天平板培地に隙間ができない様に塗布し、37°Cで静置培養した。10日毎に、生理食塩水に懸濁しなかった菌体を培地から掻き取り、マイクロバンク(イワキ株式会社)を用いて、-20°Cで冷凍保存した。最初の継代培養から150日が経過し

た時、長期的・連続的な継代培養を終了した。

2つ目の継代培養方法ではLB Broth, Lennox (Becton, Dickinson and Company) を用いた。具体的には、冷凍保存されている各菌株を普通寒天培地に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。滅菌済み綿棒で1つのコロニーを3 mLのLB Brothに接種し、その後、10日間に3回の頻度で、以下の通り継代培養を行った。37°Cで静置培養した後、マイクロペットでLB Brothを良く懸濁し、200  $\mu$  Lを新しい3 mLのLB Brothに接種して37°Cで静置培養した。10日毎に、新しいLB Brothに接種しなかったBrothを3000  $\times$ g、15分間遠心分離し、沈査を得た。その後、マイクロバンク (イワキ株式会社) を用いて-20°Cで冷凍保存した。最初の継代培養から150日が経過した時、長期的・連続的な継代培養を終了した。

継代培養終了後、保存した菌体について以下の通りにMLVA法を行った。継代培養150日目のマイクロバンクの1つのピーズを取り出し、2 mL生理食塩水に懸濁後、懸濁液を普通寒天平板培地に画線塗抹した。37°C1晩、静置培養した後、15個のコロニーを釣菌した。InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories) を使って取扱説明書に従い各コロニーからDNAを抽出した後、領域0157-10を除く17領域について、泉谷らの方法に準じてMLVA法を実施した<sup>3)</sup>。Multiplex PCR法で増幅した遺伝子についてはキャピラリーゲル電気泳動装置で電気泳動し、GeneMapper Ver 4.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用しTR数を算出した。各菌株について、TR数に変異が見られたコロニーがあった場合、30日目、60日目、90日目及び120日目のマイクロバンクについても同様の方法でMLVAを行った。

### 3. MLVA法の精度管理試験の実施

#### 【1-3年目】

#### a. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査【1年目】

表1の19菌株について継代培養後のコロニーを以下の通りに得た。各菌株を1枚のLB寒天平板培地 (Becton, Dickinson and Company) に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。培養後、平板に発育した菌株を偏りなく新しいLB寒天平板培地に継代するため、コロニーに分離していない部分を全て生理食塩水に懸濁後、白金耳を使って新しい1枚の培地に画線塗抹し、同様の条件で培養した。この継代培養を20日間連続で行い、5日目、10日目、15日目及び20日目に1枚の平板培地から5コロニーを白金耳で掻き取った。

掻き取ったコロニーについて以下の通りにMLVA法を実施した。InstaGene matrixを使って取扱説明書に従い各コロニーからDNAを抽出した。Qubit

Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を使用し、DNA濃度を2 ng/ $\mu$ Lに調整した。調製したDNAを用いて、泉谷らの方法に準じて18領域のMLVA法を実施した<sup>3)</sup>。Multiplex PCR法で増幅した遺伝子についてはキャピラリーゲル電気泳動装置で電気泳動し、GeneMapper Ver 4.0を使用しTR数を算出した。

#### b. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査【1年目】

表1の菌株co161058をLB寒天平板培地に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。1つのコロニーを掻き取り、InstaGene Matrixを使ってDNA抽出した。DNA濃度を2 ng/ $\mu$ Lに調整した後、-20°C (冷凍)、4°C (冷蔵) 及び15°C (常温) で保存した。

次に、各温度で0日、1日、2日及び3日間保存したDNAについて、領域0157-34のTRをMultiplex PCR法で増幅した。領域0157-34を解析対象に選んだ理由は「a. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査」で増幅遺伝子をシーケンサーで検出した際、多くの菌株において、この領域のピークの検出強度が低かったからである。1検体当たりの反応液として、DNAを1  $\mu$ L、TaqMan Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を10  $\mu$ L、MLVA法のプライマーミックス1を2.0  $\mu$ L<sup>3)</sup>、プローブプライマー (10  $\mu$ M, FAM-CAGTTGATTTACGATTACGGA) を0.4  $\mu$ L、及び脱イオン蒸留水を6.6  $\mu$ L混合し、合計で25  $\mu$ Lとした。反応条件として、95°C、20秒間でDNAポリメラーゼを活性化し、その後の40サイクルは95°C、20秒間の熱変性と60°C、1分間のアニーリング/伸長反応を繰り返した。Multiplex PCR法実施後、領域0157-34のTRの増幅効率の評価のために、DNA 2 ng/ $\mu$ Lの $C_T$ 値及び検出限界のDNA濃度を調査した。

#### c. MLVA法の精度管理プレ試験の参加施設【2年目】

感染研 細菌第一部から情報を得て、全国の地衛研の中からEHECの日常検査においてMLVA法を実施している施設を選定した。選定した地衛研に打診し、最終的に10施設に参加いただいた。10施設の内訳は、東北地区に1施設、関東地区に4施設、東海地区に2施設、近畿地区に1施設、中国地区に1施設、及び九州地区に1施設だった。選定した10施設をグループI (施設A-E) 及びグループII (施設F-J) に分けた。

#### d. MLVA法の精度管理プレ試験での問題内容【2年目】

各施設に3つの菌株検体 (検体1-3) 及び3つのDNA検体 (検体4-6) の合計6検体を配布した (表3)。グループI及びIIの間で菌株検体は異なるが、DNA検体は共通にした。これら検体は本研究1年目で

候補としたEHEC菌株から選ばれ、調製された。菌株の選定基準としては、菌株検体ではMLVA法で典型的なTRを持つEHEC、DNA検体では非典型的なTRを持つEHECを選んだ(表3)。つまり、DNAである検体4の領域0157-9のTR数は-2であるが、このTR数を持つ菌株は日本で分離されるEHEC 0157の中では少数派である。検体6の領域EHC-5のTR数は10であるが、同様にEHEC 0111菌株の中では少数派である。検体の調製方法としては、EHEC菌株をカジトン培地に植えた後、37℃で1晩培養したものを菌株検体とし、EHECのDNAをInstaGene matrixで抽出した後、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)でDNAを2 ng/ $\mu$ Lに調製してDNA検体とした。

問題内容として、全検体についてMLVA法を実施してもらいTR数の回答を求めた(図2)。各参加施設には、日常検査で実施している実験方法(例えば、DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出)でMLVA法を行う様に伝えた。また、問題と併せて、実験方法に関するアンケートを行った。

#### e. MLVA法の精度管理プレ試験の実施工程【2年目】

各参加施設に菌株(検体1-3)及びDNA(検体4-6)を別々に送付した(表3)。2021年11月22日(月)、各施設に菌株(検体1-3)をゆうパック常温便で発送した。11月25日(木)、各参加施設に菌株(検体4-6)をゆうパック冷凍便で発送した。

回答用紙としては、2021年11月23日(火)に各参加施設の参加者にエクセルファイルを(図2)をメールにて送付した。回答締切りを2022年1月31日(月)とした。

#### f. MLVA法の精度管理プレ試験における回答の評価【2年目】

検体5の領域0157-37においては、複数の回答を正解とした。回答用紙の表や備考欄において(図2)、遺伝子増幅産物のサイズのみではTR数を判定できないことが示されていれば正解とした。例えば、「表において、TR数が判定不能(UN)とされ、さらに遺伝子増幅産物のサイズが書かれている。」及び「表でTR数が6、6.5又は7と判定され、備考欄に“電気泳動するとTR数6と7の間に遺伝子増幅産物のピークが確認された。”や“電気泳動すると遺伝子増幅産物のピークがフラグメント解析ソフトのBin内に入らなかった。”と書かれている。」を正解とした。検体5の0157-37以外の領域については正しいTR数の回答のみを正解とした。

#### g. MLVA法の精度管理試験の参加施設【3年目】

地方衛生研究所全国協議会に加盟している地方衛生研究所等の施設から、都道府県及び政令指定都市に属する66施設を抽出した。これら施設から研究2年目に実施された精度管理プレ試験に参加した10施設を除いた56施設に参加の依頼をした(表4)。その結果、37施設から参加の承諾が得られた。参加施設の内訳は、北海道・東北・新潟地区が7施設、関東・甲・信・静地区が5施設、東海・北陸地区が5施設、近畿地区が5施設、中国・四国地区から7施設、九州地区から8施設だった。

#### h. MLVA法の精度管理試験での問題内容【3年目】

参加した全施設に同様のDNA検体を配布した。昨年度の精度管理プレ試験で用いたEHEC 0157、026及び0111の菌株(表3)から4菌株(表2)を選び、これら菌株のDNAを検体とした。検体の調製方法としては、InstaGene matrixを用いて、EHEC菌株からDNAを抽出し、NanoDropで20~25 ng/ $\mu$ Lに調製した。参加施設に検体を送付するまで-20℃で凍結保存した。

問題内容として、4検体についてMLVA法を実施してもらいTR数の回答を求めた(図3)。研究1年目の結果、検体4は1つの領域に非典型的なTR数を持っていた。そこで、サンガーシーケンスを行ったところ、検体4は領域0157-37に9つのTRを持っていたが、PCR法でプライマーからTRまでの領域に遺伝子の欠落が起きており、遺伝子産物のTR数が6と7の間で検出されることが分かった。そこで、参加施設には「検体4も回答をお願いしますが、一部の領域が非典型的なTRを持つために本試験の評価対象としません。」と伝えた。しかし、施設からの回答を精査した結果、非特異的なTRをもつことが原因ではない検査工程の誤りが幾つか確認されたので、検体4も評価対象とした。また、参加施設には、日常検査で実施している実験方法(DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等)でMLVA法を行う様に伝えた。問題と併せて、実験方法に関するアンケートを行った。

#### i. MLVA法の精度管理試験の実施工程【3年目】

2022年12月14日(水)または15日(木)に、各参加施設に検体1-4を特定記録郵便にて常温で発送した。回答用紙については2022年11月25日(金)に各参加施設の担当者にエクセルファイル(図3)をメールにて送付した。回答締切りを2023年1月31日(火)とした。

#### j. MLVA法の精度管理試験における回答の評価【3年目】

基本的に、各検体について全ての領域

で表2のTR数と一致した場合、正解とした。ただし、検体4の領域0157-37においては、複数の回答を正解とした。研究2年目の精度管理プレ試験と同様に、回答用紙の表や備考欄において(図3)、遺伝子増幅産物のサイズのみではTR数を判定できないことが示されていなければ正解とした。例えば、「表においてUNとされ、さらに遺伝子増幅産物のサイズが書かれている。」及び「表でTR数が6、6.5又は7と判定され、備考欄に“電気泳動するとTR数6と7の間に遺伝子増幅産物のピークが確認された。”や“電気泳動すると遺伝子増幅産物のピークがフラグメント解析ソフトのBin内に入らなかった。”と書かれている。」を正解とした。正解でなかった場合、その原因を明らかにするために、参加施設に検査工程を照会し、併せて泳動ファイルの送付を依頼した。

### C. 研究結果

#### 2. MLVA法の有効性の検証【2-3年目】

##### a. 国内で分離されたEHEC菌株に対するMLVA法の有効性の検証【2年目】

2016~2020年に感染研に搬入されたEHEC 0157、026及び0111についてSDIを算出したところ、2017年のEHEC 0111のみが0.925と最も低く、それ以外は0.95以上だった(図4)。各血清型のSDIについて搬入年間で有意な増減は認められなかった。搬入菌株数は、どの年においても0157が最も多く、0111が最も少なかった。

##### b. 海外で分離されたEHEC菌株に対するMLVA法の有効性の検証【2年目】

海外で発生したEHEC 0157による集団食中毒として3事例を選定した(表5)。1事例目は、2011年にカナダで発生した生殻付きクルミを原因とする集団食中毒事例である<sup>17)</sup>。この事例で感染者から分離された14菌株の内、11菌株のcontig配列を公共のデータベースからダウンロードできた(Accession No. PRJNA481261)。contig配列を用いて*in silico* MLVA法を行ったところ、4つのMLVA型に分かれた(表5(A))。型2の4菌株では領域0157-9で、型3の1菌株では領域0157-34及び0157-9でTRを検出できなかった。また、領域EH157-12及び0157-25においてsingle locus variant (SLV)が見られた。

EHEC 0157による2事例目として、2009年にアメリカ合衆国全域で発生したクッキーの生地を原因とする集団食中毒事例を選んだ<sup>18)</sup>。この事例では76名の感染者が確認された。抽出した文献では、感染者由来の5菌株についてWGSが行われていたが、本研究ではcontig配列がデータベースに登録されていた3菌株のデータ

をダウンロードした(Accession No.: PRJNA481261)。*in silico* MLVA法の結果、3菌株が同じMLVA型を持っていた(表5(B))。全菌株において、領域0157-36のTR数を検出できなかった。

EHEC 0157による3事例目としては、2007年にアメリカ合衆国の複数の州で発生したピザ集団食中毒事例である<sup>18)</sup>。この事例では21名の感染者が確認された。抽出した文献では、感染者由来の6菌株についてWGSが行われているが、本研究ではcontig配列が公共のデータベースに登録されていた5菌株のデータをダウンロードした(Accession No.: PRJNA65991)。*in silico* MLVA法の結果、4つのMLVA型に分かれた(表5(C))。型2及び型3の各1菌株は、それぞれ領域EHEC-1及び0157-36におけるSLVだった。型4の1菌株は領域EHEC-1及び0157-36のTR数が異なるdouble locus variant (DLV)だった。大半のEHEC 0157菌株の領域0157-36にTRを持つが、本研究では全菌株においてTRを検出できなかった。

海外で発生したEHEC 026による事例として、2016年4月末にイスラエルの保育園で発生した集団感染症事例を選んだ<sup>19)</sup>。この事例で感染者から分離された6菌株のEHEC 026のcontig配列を公共のデータベースからダウンロードした

(Accession No. PRJNA285020)。*in silico* MLVA法を行ったところ、全ての菌株が異なるMLVA型に分かれた(表5(D))。型1及び3の菌株は領域0157-9が、型2の菌株は領域EHC-2のTR数が異なるSLVだった。型6の菌株は領域EH26-7及びEHC-2のTR数が異なるDLVだった。EHEC 026菌株の大半は領域EHC-6にTRを持つが、本研究では全ての菌株でTRを検出できなかった。全菌株の中で型4の菌株のみEHC-2でTRが確認できなかった。

本研究の選定条件に適合した海外のEHEC 0111による集団食中毒または集団感染症事例の文献を抽出できなかった。

##### c. 蔓延菌株に対するMLVA法の有効性の検証【3年目】

普通寒天平板培地を用いて継代培養した菌株について、150日目のマイクロバンクを用いてMLVA法を行ったところ、菌株1~4の内、菌株1の1つのコロニーのみで領域0157-9及び領域0157-34のTR数が1つ増えていた(表6(A))。そこで、菌株1について、継代培養30日目、60日目、90日目及び120日目について同様にMLVA法を行ったが、TR数が変化したコロニーは確認されなかった。

LB Brothを用いて継代培養した菌株について、150日目のマイクロバンクを用いてMLVA法を行うと、菌株1~4の内、菌株2及び検体3でTR数が変異したコロニーが確認された(表6(B))。菌株2では継代

培養60日目に領域EH111-8のTR数が不検出となった2個のコロニーが観察された。また、菌株2では継代培養90日以降に領域EHC-2のTR数が1つ減ったコロニーが継続的に確認された。検体3では継代培養30日目に領域EHC-1のTR数が1つ減った2個のコロニーが観察された。また、検体3では継代培養120日目及び150日目で領域EHC-6のTR数が不検出となったコロニーがそれぞれ5個及び12個、確認された。

## 2. MLVA法の精度管理試験の回答の評価【1-3年目】

### a. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査【1年目】

LB寒天平板培地を用いて、継代培養が表1の19菌株のTR数の変化に与える影響を調査した(表7)。EHEC 0157は10菌株中3菌株で、EHEC 026は5菌株中3菌株で、EHEC 0111は5菌株中1菌株でTR数の変化が確認された。これらコロニーで変化した領域は1つのみであった。コロニーの変化の詳細は以下の通りである。菌株co170503については、10継代以降も継続して領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが取れた。菌株co190202については、採取した全てのコロニーで同一の変異が観察された。これらコロニーでは、領域0157-37における増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であり、数を判定できなかった。菌株co190173については、10継代で領域0157-10のTR数が変化したコロニーが確認されたが、15継代以降、この領域が変化したコロニーは取れなかった。菌株co152166については、5継代でのみ、領域EHC-1が変化したコロニーが取れた。菌株co190892及びco150594は、本来、領域0157-3にTRを持たないが、TRと誤判定される非特異的な遺伝子増幅が見られた。

継代培養後のTR数の変化がどの領域で起きているかで整理した(表8)。18領域中5領域でTR数の変化が見られた。領域EHC-1及び0157-10では、3菌株においてTR数の変化が観察された。領域0157-37が変化した菌株はco190202のみだった。領域0157-3では、本来、TRを持たない菌株において非特異的な遺伝子増幅が確認された。

### b. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査【1年目】

冷凍、冷蔵及び常温の各温度で、2 ng/ $\mu$ Lの菌株co161058(表1)のDNAを1日、2日及び3日間保存した後、Multiplex PCRを用いて、領域0157-34のTRを増幅したところ、 $C_T$ 値の範囲は20.51~22.13であり、検出限界は全て $2 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ Lだった(表9)。 $C_T$ 値についてカイ二乗検定を行ったところ、各温度について異なる保存日数間で有意な増減は無かった。また、異なる保存温度間でも $C_T$ 値

に有意な違いはなかった。

### c. MLVA法の精度管理プレ試験の回答の評価【2年目】

菌株検体(検体1-3)については、グループI及びII間で異なる検体を配布した(表3(A))。グループIでは、全施設が検体1-3の全ての領域について正しいTRを回答したことから、正解と判定した。グループIIでは、検体3の領域EH111-11について、施設GがTR数をUN、遺伝子増産物のサイズを437 bpと記載したため、正誤判定を保留とした(表10(A))。この領域について他の施設は正しいTR数を回答したことから正解と判定した。グループIIの全施設が検体1及び2の全領域、検体3のEH111-11以外の領域で正しいTR数を回答したことから正解とした。

正誤判定を保留とした施設Gの検体3の領域EH111-11について回答の経緯を調査した。フラグメント解析ソフトGeneMapperのBinファイル、及び電気泳動データを取り寄せた。その結果、施設Gで使用されているBinファイルにはTR数2及び4が設定されていたが、TR数3が未設定だった。このBinファイルの由来は、過去のある研究班で作成された試作版とのことだった。電気泳動ファイルを確認したところ、遺伝子増幅産物のピークはTR数2と4のほぼ中央に立ち、TR数2と4のBin間は12 bp(2つのTR分のサイズ)であった。その後、電話で聞き取り調査を行うと、施設Gの参加者はTR数3のBinが未設定だったためUNとしたとの回答だった。以上より、TR数3のBinが未設定でも電気泳動の結果を解釈すればTR数が3と判定できたことから、保留とした回答を不正解とした。

DNA検体(検体4-6)については、グループI及びIIで共通の検体を配布した(表3(B))。検体5の領域0157-37の回答のみが複数に分かれた(表10(B))。

施設B、I及びCはTR数をそれぞれ7、6.5及び9と回答し、それ以外の施設はTR数をUN、遺伝子増幅産物のサイズを記載した。施設B、I及びCは備考欄に、この領域の遺伝子増幅産物を電気泳動すると、ピークはTR数が6と7の間であり、増幅産物のサイズのみではTR数の判定ができなかったと記載していた。さらに、施設I及びCはサンガーシーケンスを実施し、検体5は領域0157-37に9つのTRを持っているが、PCR法でプライマーからTRまでの領域に遺伝子の欠落が起きていることを把握していた。以上より、検体5の領域0157-37の回答については全施設正解と判定した。また、検体4及び6の全領域、検体5の0157-37以外の領域についても全施設が正しいTR数を回答したことから正解と判定した。

一方で、施設Aに送付した菌株検体において遺伝子変異と思われる現象が見ら

れた。施設Aから回答があった際、メールにより「検体3（菌株）の培地中の一部の細胞において領域EHC-6と0157-37のTRが検出されなくなっていた。」と報告を受けた。メールによる報告では以下の通りである。施設Aの参加者は、検体3を画線培養により5つのコロニーを得た後、アルカリ熱抽出によりDNAを調製しMLVA法を行ったところ、1つのコロニーで上述の2領域でTRが検出されなかった。参加者はTRが検出できなくなった原因はプラスミドの脱落によると判断し、他の4つのコロニーで検出されたTR数を回答した。

#### d. MLVA法の精度管理試験の回答の評価【3年目】

精度管理試験に参加した37施設の内、28施設が全検体に正解、6施設が1つ以上の検体で不正解だった（表11）。3施設は1つ以上の検体で判定保留だった。全検体に正解だった28施設の内、2施設はテイルドプライマーを使用していた。そのため、検体4の領域0157-37での遺伝子増幅産物のサイズが約127 bpだった。2施設の回答を判定保留とした理由は、検体4の領域0157-37についてTR数を7又は6と判定し、「電気泳動するとTR数6と7の間に遺伝子増幅産物のピークが確認された。」等の記載が無かったことだった。この件について、この施設にメールにて回答の根拠を照会したところ、「遺伝子増幅産物が解析ソフトのBinの外であることを認識していたが、近いBinのTR数と判定した。」との回答が得られたので、本試験では正解と扱った。残りの1施設の回答を判定不能とした理由は、全ての検体について複数領域でTR数をUN（つまり、TR数を算出できない）と回答したことだった。この施設に回答の根拠をメールで照会したところ、「問題文に“TR数が算出できない遺伝子増幅が見られた場合はUNとご記入ください。”と書かれていたので、他の蛍光色のピークが立つことで検出されるノイズをUNと回答した」とのことだった。問題文の意図を理解できなかったことから、判定不能とした。

不正解の検体があった6施設（施設A-F）の内、施設Aは検体2-4に不正解だった（表11、表12（A））。施設Aに、検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、2つの問題点があった。1つ目の問題点として、EH111-14のTR数を間違えた原因は、解析ソフトのBinの設定ミスだった。具体的には、TR数 = 1のサイズのBinがTR数 = 2と設定されていた。2つ目の問題点は電気泳動の際にPCR産物の添加し忘れと思われた（図5（A））。MLVA法で検出される17領域は、2つのプライマーミックスを用いて行われるが、施設Aでは1つのプライマーミックスで検出される領域が全て-2となってい

た。泳動ファイルを確認するとPCR法で反応しなかった蛍光プライマーのピークも検出されていなかった。

施設Bは検体2と検体4に不正解だった（表11、表12（B））。施設Bに、検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、全ての検体について領域間で遺伝子増幅効率に差があり、領域0157-9と領域0157-34のピークが低かった（図5（B））。施設Bは最もピークが低かった領域0157-9を-2と判定していた。検査工程を照会したところ、「試薬やキャピラリーの状態は悪くなかった（つまり、期限切れや使用回数を超えている状態ではない）。しかし、試験では、保存されていたプライマーミックスを使い、ミックスの調製時期は不明。」との回答が得られた。MLVA法では、領域0157-9は0157とそれ以外の血清型で使われるプライマーの配列が異なる。検体1はEHEC 0157、検体2と検体4はEHEC O26、検体3はEHEC O111のDNAである。施設Bは検体1と検体3には正解したことから、プライマーミックス中で、O26用の領域0157-9のプライマーの状態が悪くなっていたことが予想された。

施設Cは検体4の領域EH111-11のTR数を1と誤って回答していた。この施設に検査工程を照会したところ、記録用紙には正しいTR数である2が記入されていたが、回答用紙に転記する際に誤ったことが明らかとなった。

施設Dは検体2の非特異的なピークを領域0157-37のTR数 = 10と判定した（表11、表12（C））。施設Dに検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、検体2のこの領域において小さなピークが再現性良く観察されたことが分かった（図5（C））。実験工程についても不適切な事項は見当たらず原因を特定できなかった。

施設Eは全ての検体において領域EH111-11をUNと回答した（表11、表12（D））。施設Dに検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、全体的にピークのサイズが小さく検出されており、領域EH111-11とEH157-12が特に小さくなっているのが分かった（図5（D））。また、シングルPCRで行っても同様の結果だった。実験工程についても不適切な事項は見当たらず原因を特定できなかった。照会の結果、施設Eは、現在、日常検査においてMLVA法を殆ど実施していないことも明らかとなった。

施設Fは検体4の領域EHC-6をUNと判定した（表11、表12（E））。施設Fに泳動ファイルの送付も依頼したところ、検体4のEHC-6のピークは解析ソフトのBinの僅か外にあるピークをUNと判定していることが分かった（図5（E））。電話での照会の結果、「解析に使用した試薬やキャピラリーの状態は悪くなかった。」との回答が得られた。問題用紙に「検体4

は一部の領域に非典型的なTRを持つ」と記載したことで、施設Fの判断を感わした可能性があると思われた。

#### D. 考察

##### 1. MLVA法データの地理的整理に基づく有効性の検証【2-3年目】

研究2年目の成果により、MLVA法は我が国で近年に分離されたEHEC 0157、026及び0111の菌株に対しても分離能が高いことが明らかになった。泉谷らが2005～2007年に全国で分離されたEHECを用いてMLVA法の分離能を評価した際、散発事例由来の菌株を全て用いたが、集団事例由来では代表の1菌株のみを選んだ<sup>3)</sup>。その結果、0157、026及び0111のSDIはそれぞれ0.991、0.988及び0.986だった。本研究では、散発及び集団事例を区別せずに、感染研に搬入された全菌株を用いてSDIを算出した。本研究の結果、2017年の0111のSDIがやや低かったが、それ以外の値は泉谷らの数値と大きく変わらなかった。我が国では、2018年に特定の食品が原因と疑われた大規模なEHEC 0157の集団事例が発生した<sup>5)</sup>。しかし、本研究では2016～2020年のSDIの間で有意な差が見られなかった。この結果は、我が国で実施されているMLVA法では17領域を解析するため、本法の分離能が非常に高くなっていることを示唆している。一般的に、同じEHECの集団事例由来の菌株であっても、事例の規模が拡大して長期化すると、徐々に菌株に変異が蓄積する。17領域のMLVA法では、事例の長期化により菌株に蓄積した変異の一部をTR数の変化（つまり、SLVやDLV）として検出できるために、SDIに有意な低下が見られなかったのだろう。

研究2年目には、同一クローン由来のEHEC菌株についてMLVA法での異同判定の基準を示せた。海外で発生した複数の集団事例由来のEHEC菌株のMLVA法のデータを用いて*in silico*でMLVA法を行ったところ、同じ事例においても一部の菌株でTRが検出できなかった（つまり、表5

(A)のMLVA型2及び3の菌株、(D)の型4の菌株)。この原因として、菌株自体はTR数を持っていたが、文献の研究でWGSのショートリード配列をアッセンブルした際、TR数が長すぎた等でcontig配列が作れなかったと考えられる。一方で、*in silico* MLVA法の結果、同じ事例で分離された全ての菌株において、TR数が検出できないことも確認された。MLVA法で解析される17領域の内、0血清型に共通してTRを持たない領域がある(例えば、0157の場合、領域EH111-14やEH26-7)。その様な領域以外において、事例由来の全菌株でTR数が検出できなかった場合、同様にcontig配列が作れなかった可能性がある。その他の可能性としては菌株の個

性としてその領域にTRを持たなかったことも考えられる。また、領域EHC-6、0157-19及び0157-37のプラスミド上に存在する領域においてTR数を検出できなかった場合は<sup>21)</sup>、検査過程で菌株がプラスミドを脱落したのかもしれない。本研究の結果、*in silico*の解析でTRを検出できなかった領域を除くと全ての事例において、変異がDLVまでに収まった。泉谷らは、同一集団事例由来の菌株の多くはSLVで収まることを報告しており<sup>3)</sup>、海外から持ち込まれたEHECによる集団事例においても、この異同判定の基準が採用できると思われた。

研究3年目には、長期的・連続的な継代培養したEHEC菌株に対してもMLVA法は同一クローン由来と判定できることを示した。継代培養には普通寒天平板培地及びLB Brothを用いたところ、培養150日目まで普通寒天平板培地では菌株1の1コロニーのみでTR数が変化したのに対して、LB brothでは菌株2及び菌株3で複数のコロニーでTR数が変化していた。LB brothでは菌株2も菌株3もそれぞれ培養60日目及び30日目までTR数の変化が観察されていた。これらの結果から、普通寒天平板よりLB brothでの培養の方が、正の自然選択圧が強く掛かっていると思われる。本研究では、地衛研でのサーベイランスで観察される類似したTRパターンを持つ菌株の蔓延が一定期間で終わる原因が、多様性の増加により、MLVA法で同一クローン由来と判断できなくなったためではないことの証明を試みた。しかし、普通寒天平板培地及びLB brothで150日培養してもTR数が変化した領域が2つ以内であり、その証明はできなかった。継代培養は、蔓延菌株が晒される環境と同じでないことを考慮する必要があるが、MLVA法は宿主外で長期間に渡って変異が蓄積した菌株にも有効と思われた。

LB brothでの培養では、TR数の変化において興味深い現象が見られた。LB brothでは、同じ培養日数で複数のコロニーが同様のTR数の変化を示した。例えば、菌株2をLB brothで60日間培養すると、2つのコロニーで領域EH111-8のTR数が不検出となった。また、LB brothでは、菌株2及び菌株3のどちらにおいても、培養初期と後半でコロニーのTR数の変化が異なっていた。例えば、菌株2では培養60日目に領域EH111-8のTR数が不検出となった2つのコロニーが取れたが、90日以降、継続的に領域EHC-2のTR数が1減少したコロニーが観察された。これらの結果は、LB brothの培養では、特定の変異を持つ菌体が優勢な状態になり、さらに優勢な菌体は培養日数の経過により置き換わったことを示している。この現象が普通寒天平板培地では起こらず、LB brothで確認される原因を把握するためには、より詳細な検討が必要だろう。

## 2. MLVA法の精度管理試験の回答の評価【1-3年目】

研究1年目の継代培養によるTR数の変化頻度の調査の結果から、精度管理試験に適したEHEC菌株を選定できた。表1の19菌株のEHECについて、20日連続の継代培養を行ったところ、7菌株についてTR数が変化したり、非特異的な遺伝子増幅が見られたコロニーが確認された。特に、2菌株では同じTR数の変化を持つコロニーが継続的に確認された。例えば、菌株co170503では領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが、10継代以降、継続して確認された。この現象はTR数が変化したクローンが何回も発生したのではなく、変化したクローンが分離平板上で増加し一定の割合以上を占めたためだろう。また、菌株co190202では採取した全てのコロニーにおいて、領域0157-37での増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であった。以前に感染研でMLVA法を実施した際は、菌株co190202の領域0157-37のTR数は7だった。そこで、サンガーシーケンスを行ったところ、この菌株は領域0157-37に9つのTRを持っていたが、PCR法でプライマーからTRまでの領域に15 bp（つまり、TR数で2.5分の塩基）の欠落が起きていた。菌株co190202以外では5菌株のコロニーでTR数が変化していたが、全てのコロニーにおいて変化した領域は1つであった。精度管理試験において、TR数が変異し易い菌株やTRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が起こる菌株を配布すると、参加機関の回答が誤っていた場合、その原因の特定が困難となる。本研究で用いた19菌株のEHECの内、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認されなかった12菌株を精度管理試験で用いると良いと思われる。

研究1年目のMLVA法では泉谷らの報告に従い18領域を解析した<sup>3)</sup>。しかし、感染研及び地衛研では、同一の食中毒事例由来のEHEC菌株間で領域0157-10のTR数は頻繁に異なっていることから、この領域を解析対象から除いている。本研究でも、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認された5領域の内、変異した菌株数が最も多かった領域は0157-10であり、この領域の変異頻度は高いことを示している。以上より、精度管理試験を行う場合、領域0157-10を除いた17領域で行うべきである。

研究1年目の成果として、精度管理試験で配布するDNA検体は、InstaGene Matrixを用いてDNA抽出するのが適することも明らかにした。菌株のDNAを精度管理試験の検体とする場合、日本郵便株式会社や民間の配送事業を利用し、常温、冷蔵又は冷凍の温度で全国の地衛研に送ることになる。これら事業を利用すると、感染研から最も輸送日数がかかる沖縄県には2日間を要する。InstaGene Matrixを用いたDNA抽出法では、菌体に

樹脂入りの液体を混ぜた後、加熱して遠心分離後、上清を抽出液とする。この方法では樹脂でPCR反応を阻害する金属イオン等を取り除いているが、DNAの精製効果は低い。そのため、InstaGene Matrixにより抽出したDNAでは不純物の存在により輸送中に品質が低下し、MLVA法の結果に影響を与えることが考えられる。本研究では、InstaGene Matrixで抽出した菌株のDNAを冷凍、冷蔵及び常温で保管し、1日目、2日目及び3日目に領域0157-34における遺伝子増幅の効率を調査した。その結果、各温度について保存日数の経過でC<sub>t</sub>値及び検出限界のDNA濃度に有意な低下は見られず、更に、異なる温度間でも有意な低下は確認されなかった。以上より、InstaGene Matrixで抽出したDNAは輸送中にMLVA法の結果に影響を与える様な品質低下を起こさないと思われる。

研究2年目は、1年目の研究成果（つまり、精度管理試験に適したEHEC菌株の選定及びDNA抽出法の決定）を踏まえて、一部の施設を対象にMLVA法の精度管理プレ試験を行った。その結果、全ての施設において検査精度が高いことが確認された。精度管理プレ試験の目的は、研究3年目に予定している全国規模での試験における検証項目を決定するためである。プレ試験の参加施設の検査能力が低い場合、試験内容の正解率が低くなり、来年度の試験内容を決定できなくなる。そこで、プレ試験ではMLVA法を日常業務として実施している施設に参加いただいた。プレ試験では、当初、DNA検体の正解率が低下すると予想していたが全ての施設で正解だった。例えば、検体5の領域0157-37については全施設が遺伝子増幅産物のサイズからはTR数を算出できないことを見抜いていた。特に、施設C及びB1においてはサンガーシーケンスも実施してTR数を塩基配列から数えて把握していた。一方で、菌株検体において、唯一不正解となった回答があった。施設Gは検体3の領域EH111-11の回答を誤ったので、回答の経緯を調査した。PCR法や電気泳動法等の実験手技は正しかったが、Binファイルの解釈を誤っていた。この様な初歩的な間違いを防ぐためにも本研究の様な精度管理の継続的な実施が必要である。また、各施設が自主的にMLVA法に用いる機器、試薬や解析ファイル等を定期的に評価することも大切だろう。

精度管理プレ試験において不正解だった回答の原因から、全国規模での精度管理試験では参加施設が解析ファイルを正しく利用できるかを検証する必要があるだろう。検証のためには、典型的なTR数を持つ検体だけではなく、検体4-6の様な非典型的なTR数を持つ検体も配布することが望ましいと思われる。一方で、検体としては菌株ではなくDNAを配布すべきだろう。今年度、菌株検体を調製し

た際、施設間での検体の違いを少なくするために、1つのコロニーを1回釣菌した後、連続して複数のカジトン培地に植え継ぎ、各施設に1培地を配布した。しかし、施設Aの検体3において培地中の一部の細胞でTR領域を持つプラスミドが脱落していた。来年度は全国規模で精度管理試験を実施するために、このような現象が起こった検体を受け取る施設が増えるだろう。また、来年度はMLVA法の検査精度が高くない施設も参加すると思われる。全国規模での試験で菌株検体を配布し、参加施設がプラスミド上のTRが未検出と回答した場合、検査精度が低いのか、またはプラスミドの脱落が起きたためかの特定が困難になるかもしれない。今年度に行った実験方法に関するアンケートによると、施設間で菌株検体からのDNA抽出法は様々だった（アルカリ熱抽出法、キレックス樹脂試薬による抽出法、及び抽出を行わずコロニーダイレクトPCR法）。不正解の原因がDNA抽出法でなかったことからMLVA法の精度評価で重要な点はPCR法以降と思われる。

研究3年目に全国規模でのMLVA法の精度管理試験を実施したことで、地衛研での検査精度には差があることが明らかとなった。参加施設全体としては、判定不能の1施設を除く36施設中、30施設が全検体に正しく回答できた。検体4の領域0157-37はMLVA法で非典型的なTR数を示すが、ある施設はこの検体について、MLVA法に加えてサンガーシーケンスも実施し、非典型的なTR数を示す原因を備考欄で回答した。その反面、MLVA法の基本的な実験工程を正しく行えず、不正解となった施設もあった。例えば、施設A及び施設Eは解析ソフトのBin設定に問題があり、TR数を正しく算出できなかった。また、施設Aは検体4を電気泳動する際、PCR法の遺伝子増幅産物の添加も忘れ、複数領域でTRが検出不能となった。施設Bは状態が悪いプライマーミックスを使用したため、複数検体でTRを検出できない領域があった。現在、MLVA法は地衛研での食中毒サーベイランスにおいて主流となっており<sup>1)</sup>、更に、食中毒も広域化している<sup>4)</sup>。MLVA法を正しく実施できない地衛研があることは、我が国全体の公衆衛生に良くない影響を与えるだろう。以上より、本精度管理試験で不正解の検体があった施設には、早急に改善を求めた必要があった。

全国規模での精度管理試験では、回答評価後に本法を正しく実施できなかった施設に改善法を提案できた。解析ファイルのBinの調整を誤っていた施設Aには正しいBin情報を提供できた。Binの調整が不十分であった施設Eには、調整が完了するまでの間、TRパターンが分かっているサンプルをコントロールとして一緒に電気泳動すれば対応できると伝えた。MLVA法の遺伝子増幅産物は実験日によっ

て、泳動度が多少変化するため、既知のTRパターンをコントロールとする方法はBin調整済みの施設にも有効である。次に、施設Bには領域0157-9においてTRを検出できなかった原因として、026用のプライマーの状態が悪い可能性があるかと伝えた。その後、施設Bからこの可能性が正しかったと連絡があった。令和5年2月に厚生労働省はEHEC 026に汚染された馬刺しが流通していると報道発表した。この事例由来のEHEC 026菌株は領域0157-9にもTR数を持つが、施設Bがこの菌株についてMLVA法を行ったところ、領域0157-9でTRを検出できなかった。そこで、プライマーミックスを調製し直したところ、正しい結果を得られた。他にも、施設Aは検体4においてPCR産物の添加を忘れたが、このミスに気付く手段として、蛍光プライマーのピークを確認することが有効と伝えた。一方で、検体2で回答を誤った施設Dには改善方法を示せなかった。この施設は検体2の領域0157-37において非特異的なピークが再現性良く発生したことで、TR数の判定を誤った。回答評価後に実験工程を照会した上、泳動ファイルを取り寄せたが、問題がある点を特定できず、改善法をアドバイスできなかった。施設D以外からは検体2で非特異的なピークが観察されたとの報告が無かったが、特定の領域では非特異的なピークが発生し易いことが知られている。施設Dの原因を明らかにするためにも、今後、本精度管理試験に参加した全施設に対して非特異的なピークの発生について照会する必要があると思われる。

さらに、精度管理試験では全検体に正解した施設に対しても検査精度の向上に有用な情報を提供できた。テイルドプライマーを使用した1施設は自身がテイルドプライマーを使用していることを認識していなかったが、解析ファイルのBinは調整済みだったために検体には正解できた。MLVA法の優れている点としてデータ共有性の高さが挙げられる<sup>1)</sup>。本法の結果を異なる自治体間で共有する際、TRパターンではなく、泳動データを交換することもあり得る。そのような場合、自身がテイルドプライマーを使っていると認識していない場合、お互いの施設が誤った判断をしてしまうだろう。

本研究で実施したMLVA法の精度管理試験を今後も継続する必要があると思われる。試験では、地方衛生研究所全国協議会に加盟する地衛研の内、都道府県及び政令市に属する66施設を対象とした。プレ試験及び全国規模での試験を合わせて47施設が参加したが、約30%の地衛研が未参加である。本研究で試験の対象としなかった中核市においてもMLVA法を実施できる施設もある<sup>22)</sup>。今後、これら施設におけるMLVA法の検査精度を把握し、向上させるためにも精度管理試験の継続は

必要だろう。また、精度管理試験の結果、検査精度が高くない施設があった。これら施設へのMLVA法の検査精度の向上を図るためにも、精度管理試験の実施に加えて、研修会を開催する必要があると思われる。

#### E. 結論

近年に日本で分離されたEHEC 0157、026及び0111の菌株に対してもMLVA法は高い分離能を持っていた。また、海外から持ち込まれたEHEC菌株をMLVA法で解析した場合の同一クローン由来であるかの判定基準はDLV以内であり、国内の菌株と同様だった。以上より、MLVA法は国内及び海外のどちらのEHEC菌株に対しても有効な分子疫学的解析法だった。

全国の地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験を実施したところ、一部の施設でMLVA法を正しく実施できていなかった。これら施設に問題の改善法を提案したが、未参加の施設もあることから、今後も精度管理試験の継続や研修実施の必要性がある。

#### F. 謝辞

本研究の遂行において、終始、貴重なご指導とご助言を賜りました国立感染症研究所 細菌第一部の泉谷秀昌先生に深く感謝申し上げます。何より、業務ご多忙の中、MLVA法の精度管理試験にご参加ください、惜しみないご貢献をくださいました地方衛生研究所の先生方に心より感謝申し上げます。

#### G. 参考文献

- 1) 泉谷ら, 日本食品微生物学会雑誌, 36(1): 10-12, 2019
- 2) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 3) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 4) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40(5): 83-85, 2019
- 5) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 39(5): 74-77, 2018
- 6) 小嶋ら, 病原微生物検出情報, 34(5): 127-128, 2013
- 7) 泉谷ら, 日本食品微生物学会雑誌, 36(1): 10-12, 2019
- 8) Mellor, et al., Appl Environ Microbiol, 78(13): 4724-4731, 2012
- 9) Seto, et al., J Microbiol Methods, 139: 12-14, 2017

- 10) 泉谷ら, 病原微生物検出情報, 43(5): 108-109, 2022
- 11) 大阪健康安全基盤研究所, 反復配列多型解析法による腸管出血性大腸菌の遺伝子型別, ホームページ, 2020 (<http://www.iph.osaka.jp/s008/020/010/010/011/20200316161409.html>)
- 12) Tanner, et al., Trends Microbiol. 26: 986-998, 2018
- 13) Yokoyama, et al., Int J Food Microbiol, 264: 39-45, 2018
- 14) Seto, et al., J Microbiol Methods, 139: 12-14, 2017
- 15) 南須原ら, 東京都健康安全研究センター年報, 69: 279-284, 2018
- 16) Hunter, et al., J Clin Microbiol, 26: 2465-2466, 1988
- 17) Tamura, et al., Mol Biol Evol, 38(7):3022-3027, 2021
- 18) Rumore, et al., BMC Genomics, 19(1): 870, 2018
- 19) Rusconi, et al., Front Microbiol, 7: 985, 2016
- 20) Moran-Gilad, et al., Epidemiol Infect, 145: 2998-3006, 2017
- 21) 河合ら, 岡山県環境保健センター年報, 43, 79-85, 2019
- 22) 泉谷ら, 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業 令和2年度総括研究報告書「食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究」, 1-19, 2020

#### H. 健康危険情報

なし

#### I. 研究発表

- 1) Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Naoshi Ando, Junji Seto, Kyoko Hazama, Keigo Enomoto, Hidemasa Izumiya, Yukihiro Akeda, Makoto Ohnishi, Another advantage of multi-locus variable-number tandem repeat analysis that can putatively subdivide enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains into clades by *maximum a posteriori* estimation, PLOS ONE, 18(3): e0283684, 2023

#### J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

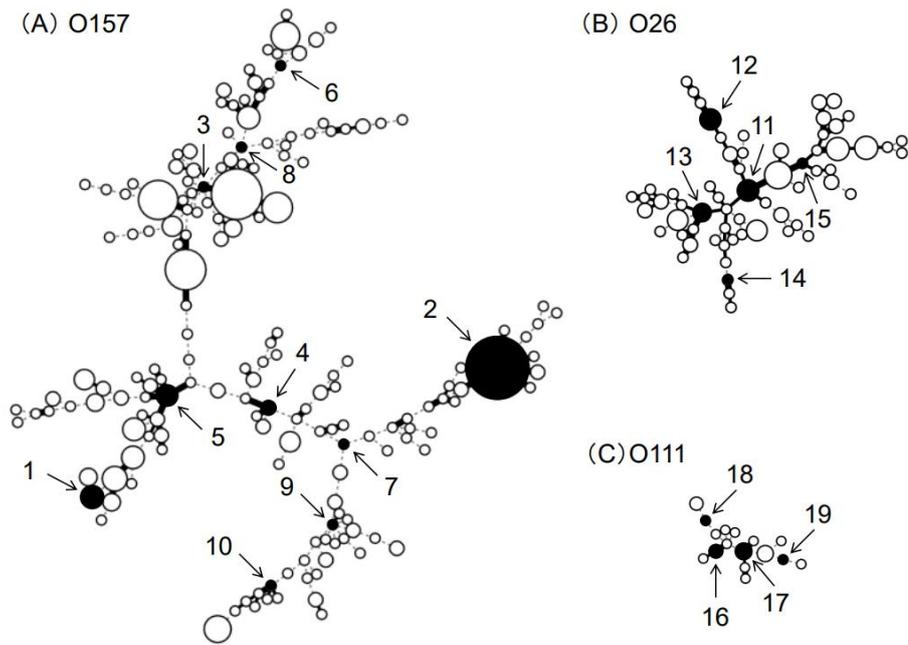


図1 腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法の結果から作成されたminimum spanning tree

所属：

担当者：

### 1. 問題及び回答

検体1～6について反復配列多型解析（MLVA）法を行い、Tandem Repeat（TR）数をご回答ください。

日常の検査において貴所で実施している方法（DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等）でMLVA法を行ってください。

TR数が算出できない遺伝子増幅が見られた場合はUNとご記入ください。また、その増幅産物のサイズ（bp）をご記入ください。

各検体の結果について、詳細に説明したい事がある場合は備考欄にご記入ください。

検体名	種類	TR数（上段）及び遺伝子増幅産物のbp数（下段）																
		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
記載例	菌株	5	2	6	3	-2	UN	7	-2	4	-2	4	10	3	-2	2	-2	7
		721																
検体1	菌株																	
検体2	菌株																	
検体3	菌株																	
検体4	DNA																	
検体5	DNA																	
検体6	DNA																	

備考欄

以上で、「1. 問題及び回答」は終了です。誠に有難うございました。

図 2 EHEC の MLVA 法の精度管理プレ試験での回答用紙

所属：

担当者：

## 1. 問題及び回答

検体1-4について反復配列多型解析（MLVA）法を行い、Tandem Repeat（TR）数をご回答ください。

検体1-4は腸管出血性大腸菌O157、O26及びO111のいずれかのDNAです。

日常の検査において貴所で実施している方法（DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等）でMLVA法を行ってください。

TR数が算出できない遺伝子増幅が見られた場合はUNとご記入ください。また、その増幅産物のサイズ（bp）をご記入ください。

各検体の結果について、詳細に説明したい事がある場合は備考欄にご記入ください。

検体1-3の回答は精度管理試験の評価対象です。検体4も回答をお願いしますが、一部の領域が非典型的なTRを持つために本試験の評価対象としません。

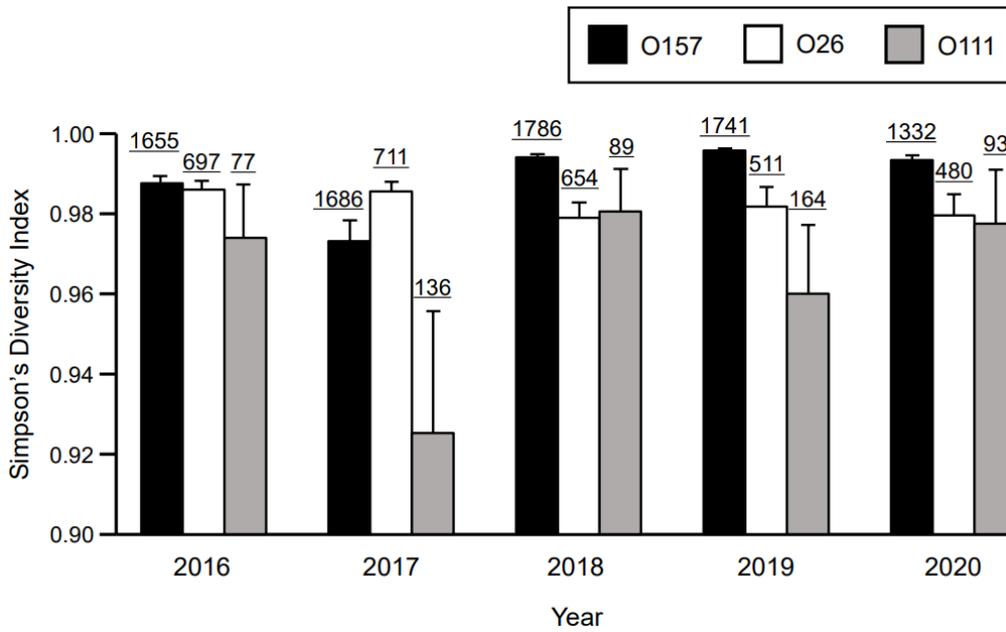
検体名	TR数（上段）及び遺伝子増幅産物のbp数（下段）																
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
記載例	5	2	6	3	-2	UN	7	-2	4	-2	4	10	3	-2	2	-2	7
	721																
検体1																	
検体2																	
検体3																	
検体4																	

備考欄

以上で、「1. 問題及び回答」は終了です。誠に有難うございました。

図 3 EHEC の MLVA 法の精度管理試験での回答用紙

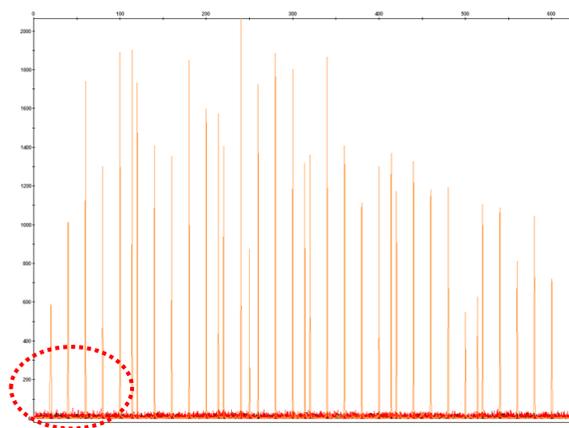




**図4 EHEC菌株の各血清型におけるMLVA法遺伝子型の多様性**

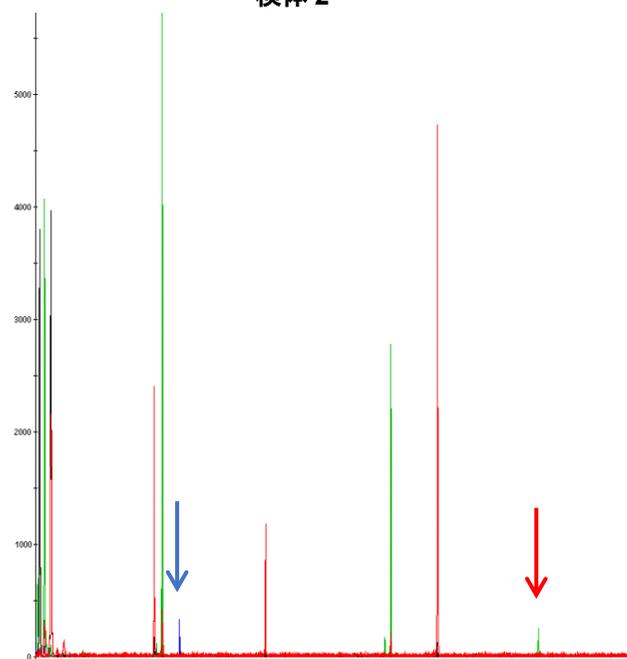
各血清型のSimpson's Diversity Indexを示す棒の上にかかれているアンダーバーがある数値は、各年に国立感染症研究所へ搬入された菌株数を示す。

(A)施設 A

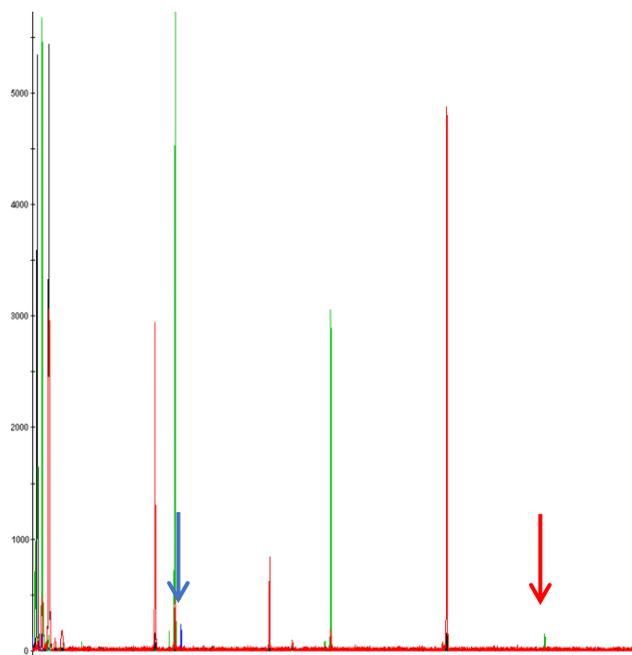


(B)施設 B

検体 2

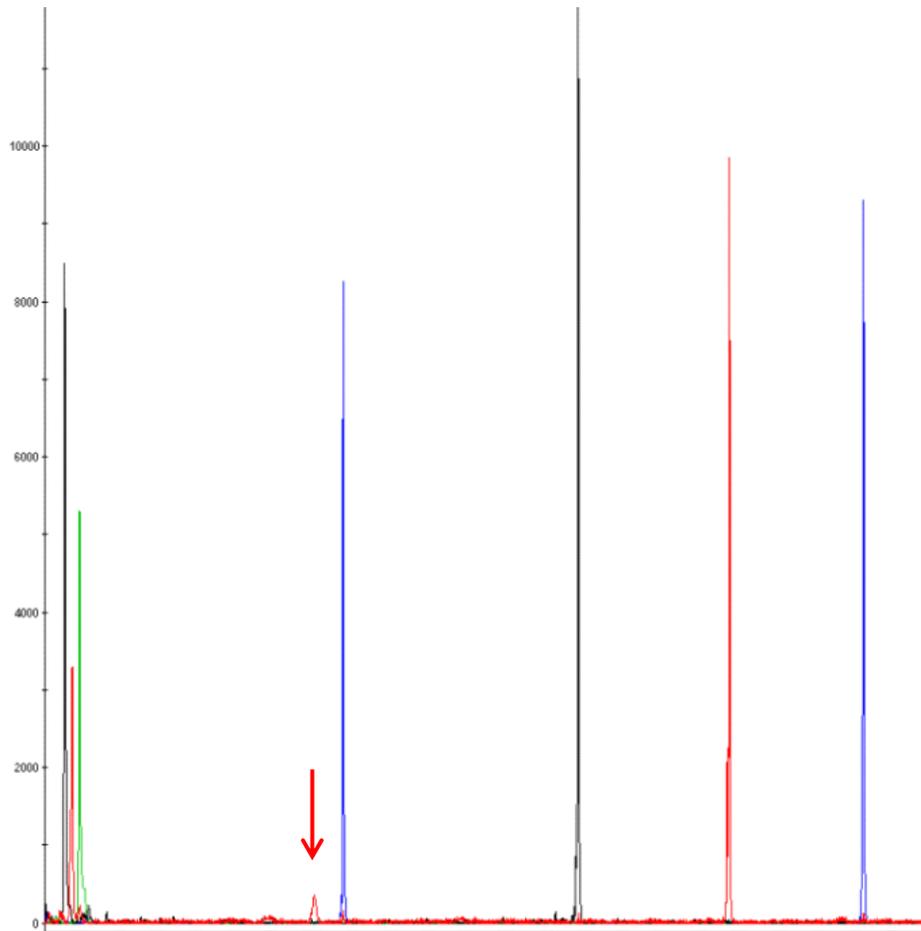


検体 4



**図 5 MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像**

(A) 赤色破線の円は蛍光プラマーが検出されなかったことを示す。(B) 赤色及び青色の矢印はそれぞれ領域O157-9及び領域O157-34の遺伝子増幅産物のピークを示す。  
(C) 施設 D



**図 5(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像**

(C) 赤色矢印は領域 O157-37 のタンデムリピート(TR)として判定された非特異的ピークを示す。

(D)施設 E

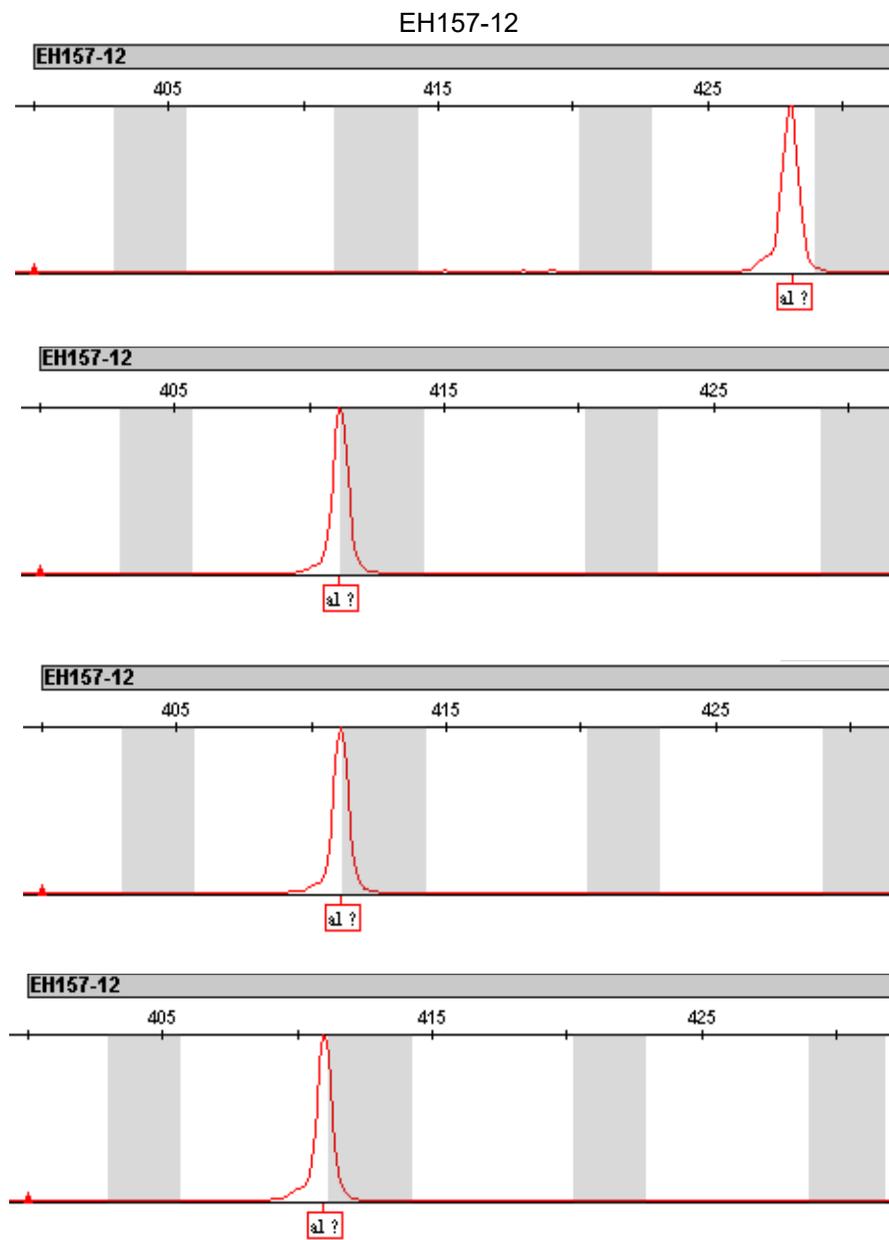
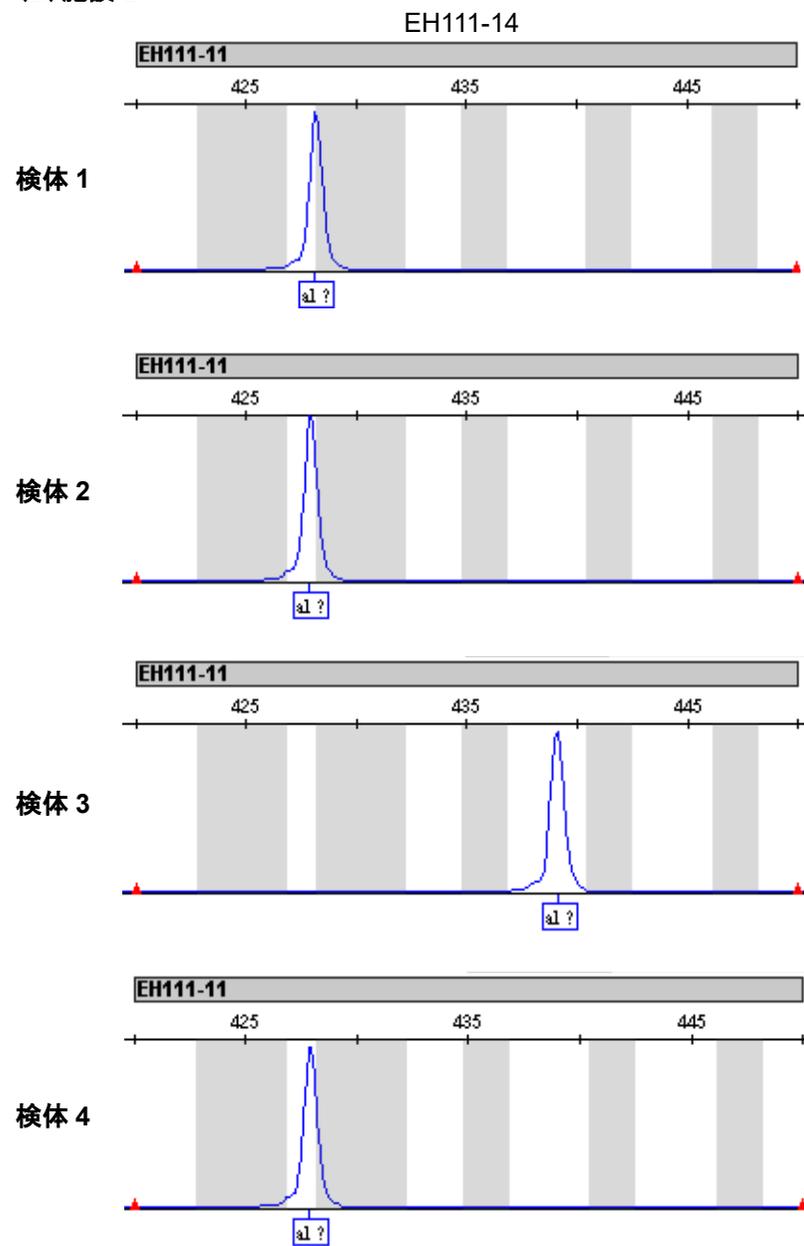


図 5(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(E)施設 F

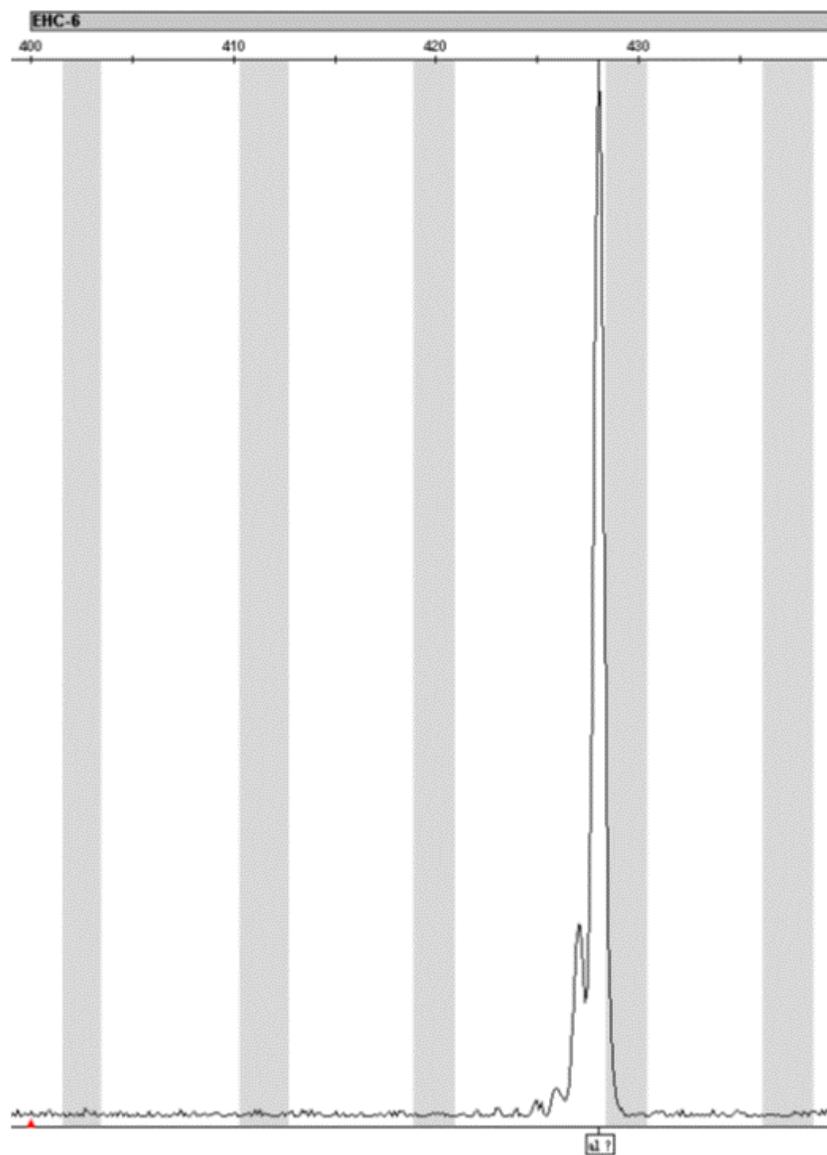


図 5(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

検体 4 の領域 EHC-6 における遺伝子増幅産物のピーク。

表1 本研究で用いられた腸管出血性大腸菌(EHEC)の詳細

No. <sup>a</sup>	菌株	血清型	反復配列多型解析 (MLVA) 法の各遺伝子領域におけるタンデムリピート (TR) 数																
			EH 111 -11 <sup>c</sup>	EH 111 -14 <sup>c</sup>	EH 111 -8 <sup>b</sup>	EH 157 -12 <sup>b</sup>	EH26 -7 <sup>c</sup>	EHC -1 <sup>b</sup>	EHC -2 <sup>b</sup>	EHC -5 <sup>b</sup>	EHC -6 <sup>c</sup>	O157 -3 <sup>b</sup>	O157 -34 <sup>b</sup>	O157 -9 <sup>b</sup>	O157 -25 <sup>b</sup>	O157 -17 <sup>c</sup>	O157 -19 <sup>c</sup>	O157 -36 <sup>c</sup>	O157 -37 <sup>c</sup>
1	co161058	O157:H7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
2	co161706	O157:H7	2	-2	1	4	-2	6	4	10	-2	7	11	14	5	15	6	7	8
3	co161729	O157:H7	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	5	4	7	9	6
4	co171440	O157:H7	2	-2	1	4	-2	6	4	-2	-2	10	12	6	5	7	5	6	7
5	co180453	O157:H7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	6	3	6
6	co181163	O157:H7	2	-2	1	3	-2	10	5	-2	-2	4	9	0	2	5	8	8	8
7	co190173	O157:H7	2	-2	1	4	-2	7	4	10	-2	11	12	7	7	6	6	6	7
8	co190176	O157:H-	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	12	9	11	5	5	7	4	6
9	co190191	O157:H7	2	-2	1	1	-2	7	5	-2	-2	7	9	11	3	3	5	7	6
10	co190892	O157:H7	2	-2	1	1	-2	6	7	-2	-2	-2	5	10	5	3	7	6	9
11	co150594	O26:H11	2	1	1	2	3	11	16	11	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
12	co170503	O26:H11	2	1	1	2	3	9	16	2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
13	co182152	O26:H11	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
14	co190202	O26:H11	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	6
15	co190205	O26:H-	2	1	1	2	3	8	13	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
16	co152166	O111:H-	4	1	5	2	-2	14	10	-2	3	-2	3	10	2	-2	1	-2	9
17	co152173	O111:H-	4	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
18	co173040	O111:H-	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	9
19	co182158	O111:H-	4	1	5	2	-2	8	6	10	3	-2	3	14	2	-2	1	-2	7

<sup>a</sup> 図1のminimum spanning tree上の位置。

<sup>b</sup> MLVA法のプライマーミックス1で検出される領域。

◦ MLVA法のプライマーミックス2で検出される領域。

表2 本研究3年目で用いられたEHEC菌株のTRパターン

菌株 検体 <sup>a/</sup> <sup>b</sup>	No. <sup>c</sup>	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																
			EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -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	1	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
2	13	O26	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
3	17	O111	4	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
4	14	O26	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN <sup>d</sup>

<sup>a</sup> 蔓延菌株に対するMLVA法の有効性の検証実験での菌株。

<sup>b</sup> MLVA法の精度管理試験での検体。

<sup>c</sup> 表1のNo.を示す。

<sup>d</sup> 9つのTRを持つが、TR付近に遺伝子の欠損が起きている。MLVA法でPCR法を行うと、TR数が6及び7の間に相当する遺伝子増幅産物が確認される。

表3 MLVA法の精度管理プレ試験の参加施設に配布したEHEC菌株

(A) 菌株検体

検体 (No. <sup>a</sup> )	グル ープ	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	血清型
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -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 (No. 1)	I	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7	O157
1 (No. 8)	II	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	12	9	11	5	5	7	4	6	
2 (No. 15)	I	2	1	1	2	3	8	13	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2	O26
2 (No. 13)	II	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	
3 (No. 17)	I	4	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6	O111
3 (No. 18)	II	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	9	

<sup>a</sup> 表1のNo.を示す。

(B) DNA検体

検体 (No. <sup>a</sup> )	グル ープ	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	血清型
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -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	
4 (No. 6)	I、II	2	-2	1	3	-2	10	5	-2	-2	4	9	-2 <sup>b</sup>	2	5	8	8	8	O157
5 (No. 14)	I、II	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN <sup>c</sup>	O26
6 (No. 19)	I、II	4	1	5	2	-2	8	6	10 <sup>d</sup>	3	-2	3	14	2	-2	1	-2	7	O111

<sup>a</sup> 表1のNo.を示す。

<sup>b</sup> EHEC O157の中では、領域O157-9のTRが-2である菌株は少数派であるため。

<sup>c</sup> 9つのTRを持つが、TR付近に遺伝子の欠損が起きている。MLVA法でPCR法を行うと、TR数が6及び7の間に相当する遺伝子増幅産物が確認される。

<sup>d</sup> EHEC O111の中では、領域EHC-5のTRが-2ではない菌株は少数派であるため。

表4 MLVA法の精度管理試験の参加施設

支部 <sup>a</sup>	3年目に参加 <sup>b</sup>	2年目に参加 <sup>c</sup>	施設数 <sup>d</sup>	参加率(%) <sup>e</sup>
北海道・東北・新潟地区	7	1	11	72.7
関東・甲・信・静地区	5	4	17	52.9
東海・北陸地区	5	2	7	100.0
近畿地区	5	1	9	66.7
中国・四国地区	7	1	11	72.7
九州地区	8	1	11	81.8
全国	37	10	66	71.2

<sup>a</sup> 地方衛生研究所全国協議会の支部。

<sup>b</sup> 研究3年目に実施したMLVA法の精度管理試験に参加した施設数。

<sup>c</sup> 研究2年目に本研究で実施したMLVA法の精度管理プレ試験に参加した施設数。

<sup>d</sup> 地方衛生研究所全国協議会に加盟している地方衛生研究所等の内、都道府県及び政令指定都市に属する施設数。

<sup>e</sup> MLVA法の精度管理試験及びプレ試験のどちらかに参加した施設の割合。

表5 海外で発生したEHECによる集団食中毒事例または集団感染事例由来の菌株における*in silico*でのMLVA法

(A)カナダで発生した生殻付きクルミを原因とする集団食中毒事例<sup>17)</sup>

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 <sup>a</sup>	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 <sup>a</sup>	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>a</sup>	EHC -6 <sup>a</sup>	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	9	16	5	24	8	8	6	5
2	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	7 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	9	NF <sup>c</sup>	5	24	8	8	6	4
3	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	12	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	NF <sup>c</sup>	NF <sup>c</sup>	5	24	8	8	6	1
4	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	12	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	9	16	6 <sup>d</sup>	24	8	8	6	1

<sup>a</sup> EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCR法により遺伝子増幅が確認されない領域。

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>c</sup> 一部の菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>d</sup> 他の菌株とTR数が異なった。

(B)アメリカ合衆国で発生したクッキー生地を原因とする集団食中毒事例<sup>18)</sup>

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 <sup>a</sup>	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 <sup>a</sup>	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>a</sup>	EHC -6 <sup>a</sup>	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	3	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	12	8	12	4	6	11	NF <sup>b</sup>	5	3

<sup>a</sup> EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCR法により遺伝子増幅が確認されない領域。

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

(C) アメリカ合衆国で発生したピザを原因とする集団食中毒事例<sup>18)</sup>

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 <sup>a</sup>	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 <sup>a</sup>	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>a</sup>	EHC -6 <sup>a</sup>	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	7	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	5	NF <sup>b</sup>	2
2	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	8 <sup>d</sup>	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	5	NF <sup>b</sup>	1
3	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	7	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	6 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	1
4	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	6 <sup>d</sup>	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	4 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	1

<sup>a</sup> EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCRにより遺伝子増幅が確認されない領域。

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>d</sup> 他の菌株とTR数が異なった。

(D) イスラエルの保育園で発生した集団感染事例<sup>19)</sup>

パターン	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>e</sup>	EHC -6	O157 -3 <sup>e</sup>	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17 <sup>e</sup>	O157 -19	O157 -36 <sup>e</sup>	O157 -37 <sup>e</sup>	
1	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1	6 <sup>d</sup>	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
2	O26	2	1	1	2	3	6	5 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
3	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1	10 <sup>d</sup>	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
4	O26	2	1	1	2	3	6	NF <sup>c</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
5	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
6	O26	2	1	1	2	8 <sup>d</sup>	6	5 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>c</sup> 一部の菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>d</sup> 他の菌株とTR数が異なった。

<sup>e</sup> EHEC O26の菌株の大半において、MLVA法のPCRにより遺伝子増幅が確認されない領域。

表6 長期的・連続的な継代培養によるEHEC菌株のTRの変化

(A) 普通寒天平板

継代培養 日数	各継代数において TR 数が変化したコロニー数			
	菌株 1 (No. 1)	菌株 2 (No. 13)	菌株 3 (No. 17)	菌株 4 (No. 14)
30 日	0	- <sup>b</sup>	-	-
60 日	0	-	-	-
90 日	0	-	-	-
120 日	0	-	-	-
150 日	1 <sup>c</sup>	0	0	0

<sup>a</sup> 表1のNo.を示す。

<sup>b</sup> 未測定。

<sup>c</sup> 領域O157-9と領域O157-34のTR数が1増加し、TR数はそれぞれ20及び13。

(B) LB Broth

継代培養 日数	各継代数において TR 数が変化したコロニー数			
	菌株 1 (No. 1)	菌株 2 (No. 13)	菌株 3 (No. 17)	菌株 4 (No. 14)
30 日	- <sup>b</sup>	0	2 <sup>c</sup>	-
60 日	-	2 <sup>d</sup>	0	-
90 日	-	1 <sup>e</sup>	0	-
120 日	-	14 <sup>e</sup>	5 <sup>f</sup>	-
150 日	0	4 <sup>e</sup>	12 <sup>f</sup>	0

<sup>a</sup> 表1のNo.を示す。

<sup>b</sup> 未測定。

<sup>c</sup> 領域 EHC-1 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 13。

<sup>d</sup> 領域 EH111-8 の TR 数が不検出。

<sup>e</sup> 領域 EHC-2 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 24。

<sup>f</sup> 領域 EHC-6 の TR 数が不検出。

表7 継代培養によるEHEC菌株のTRの変化

No. <sup>a</sup>	菌株	O 血清型	各継代数において TR 数が変化、または、 非特異的な遺伝子増幅があったコロニー数			
			5 継代	10 継代	15 継代	20 継代
1	co161058	O157	0	0	0	0
2	co161706		0	0	0	1 <sup>b</sup>
3	co161729		0	0	0	0
4	co171440		0	0	0	0
5	co180453		0	0	0	0
6	co181163		0	0	0	0
7	co190173		0	1 <sup>b</sup>	0	2 <sup>c</sup>
8	co190176		0	0	0	0
9	co190191		0	0	0	0
10	co190892		0	0	1 <sup>d</sup>	1 <sup>b</sup>
11	co150594	O26	0	0	1 <sup>d</sup>	0
12	co170503		0	2 <sup>e</sup>	1 <sup>e</sup>	1 <sup>e</sup>
13	co182152		0	0	0	0
14	co190202		5 <sup>f</sup>	5 <sup>f</sup>	5 <sup>f</sup>	5 <sup>f</sup>
15	co190205		0	0	0	0
16	co152166	O111	1 <sup>g</sup>	0	0	0
17	co152173		0	0	0	0
18	co173040		0	0	0	0
19	co182158		0	0	0	0
計		-	6	8	8	10

<sup>a</sup> 表1のNo.を示す。

<sup>b</sup> 領域O157-10においてTR数が変化。

<sup>c</sup> 領域EHC-2においてTR数が6から7に増加。

<sup>d</sup> 領域O157-3においてTRと誤って判定される非特異的な遺伝子増幅が出現。

<sup>e</sup> 領域EHC-1においてTR数が9から2に減少。

<sup>f</sup> 領域O157-37においてTR数を判定できない遺伝子増幅が検出される。

<sup>g</sup> 領域EHC-1においてTR数が15から14に減少。

表8 継代培養による各領域でのTRの変化

領域	プライマーセット	TR 数の変化、または、非特異的な遺伝子増幅が 検出された菌株(継代数)
EHC-2	ミックス 1	co190173(20)
O157-25		-
O157-9		-
EH157-12		-
EH111-8		-
EHC-1		co152166(5)、co170503(10、15、20) <sup>a</sup>
EHC-5		-
O157-3		co190892(15) <sup>b</sup> 、co150594(15) <sup>b</sup>
O157-34		-
EH26-7	ミックス 2	-
O157-19		-
EH111-11		-
EHC-6		-
O157-37		co190202(5、10、15、20) <sup>c</sup>
O157-17		-
O157-36		-
EH111-14		-
O157-10		co190173(5)、co161706(20)、co190892(20)

<sup>a</sup> TR数が9から2に減少。

<sup>b</sup> TRと誤って判定されうる非特異的なピークが出現。

<sup>c</sup> リピート数を判定できないピークが検出される。

表9 DNAの保存温度・期間と領域O157-34におけるTRの増幅効率の関係

温度	DNA 2 ng/μL の C <sub>T</sub> 値 (検出限界濃度)		
	1 日間	2 日間	3 日間
冷凍	21.84 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)	22.13 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)	20.74 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)
冷蔵	21.86 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)	21.03 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)	20.51 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)
常温	21.75 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)	21.80 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)	21.61 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μL)

表10 MLVA法の精度管理プレ試験において参加施設間で回答に違いが見られた検体及び遺伝子領域

(A) 検体3の領域EH111-11

施設	TR 数	遺伝子増幅産物	備考欄の概要
G	UN	437 bp	TR 数が 2 及び 4 の間に相当する遺伝子増幅産物が見られた。
F、H、I、J	3	記載なし	記載なし。

(B) 検体5の領域O157-37

施設	TR 数	遺伝子増幅産物のサイズ	備考欄の概要
A、D、E、H、J	UN	約 120 bp	記載なし。
F、G	UN	約 120 bp	フラグメント解析ソフト GeneMapper の Bin には含まれない遺伝子増幅産物のピークが見られた。 TR 数が 6 及び 7 の間に相当する遺伝子増幅産物のピークが見られた。
B	7	記載なし	TR 数が 6 と 7 の Bin の間に遺伝子増幅産物(120.61bp)のピークが見られた。 所属の判定基準から TR 数を 7 と判定した。
I	6.5	記載なし	GeneMapper の Bin には含まれない遺伝子増幅産物のピークが見られた。 シングル PCR 法により非特異的な増幅でないことを確認した。 遺伝子増幅産物についてサンガーシーケンスを実施し、サイズを 123 bp と決定した。 PCR 法ではオフセット 84 bp、1 個の TR は 6 bp であることから、計算により TR 数を 6.5 とした。
C	9	記載なし	TR 数が 6 及び 7 の間に相当する遺伝子増幅産物が見られた。 サンガーシーケンスにより塩基配列を確認したところ TR 数を数えて 9 と判定した。 なお、オフセット領域で 15 bp (TR 数 2.5 個相当) の欠落が起きていた。

表11 MLVA法の精度管理試験の回答における正解、不正解及び保留の内訳

支部 <sup>a</sup>	参加 施設数	正解 施設数	不正解 施設数	保留 施設数	不正解施設名(不正解検体 No.)
北海道・東北・新潟地区	7	5	0	2 <sup>c</sup>	-
関東・甲・信・静地区	5 <sup>b</sup>	2	3	0	施設 A(2-4)、施設 B(2、4)、施設 C(4)
東海・北陸地区	5	4	1	0	施設 D(2)
近畿地区	5	5	0	0	-
中国・四国地区	7 <sup>b</sup>	6	1	0	施設 E(1-4)
九州地区	8	6	1	1 <sup>d</sup>	施設 F(4)
全国	37	28	6	3	-

<sup>a</sup> 地方衛生研究所全国協議会の支部。

<sup>b</sup> 関東・甲・信・静地区と中国・四国地区の各 1 施設がテイルドプライマーを使用していたため、検体 4 の領域 O157-37 の遺伝子増幅産物のサイズが約 127 bp だった。

<sup>c</sup> 2 施設が検体 4 の領域 O157-37 の TR 数をそれぞれ 7 及び 6 と回答し、「電気泳動すると TR 数 6 と 7 の間に遺伝子増幅産物のピークが確認された。」等の記載が無かった。

<sup>d</sup> 1 施設が問題の意図を理解できず、ノイズと分かっているピークを UN と判定した。

表12 MLVA法の精度管理試験で不正解だった回答の詳細

(A)施設 A

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) <sup>a</sup>																
	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
1	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
2	2	<u>2</u>	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
3	4	<u>2</u>	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
4	2	<u>2</u>	<u>-2</u> <sup>b</sup>	<u>-2</u> <sup>b</sup>	3	<u>-2</u> <sup>b</sup>	<u>-2</u> <sup>b</sup>	<u>-2</u> <sup>b</sup>	5	<u>-2</u> <sup>b</sup>	<u>-2</u> <sup>b</sup>	<u>-2</u> <sup>b</sup>	<u>-2</u> <sup>b</sup>	-2	1	-2	UN
																	120

<sup>a</sup> 不正解の回答を下線で表示した。

<sup>b</sup> 同一のプライマーミックスで検出された領域。

(B)施設 B

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) <sup>a</sup>																
	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
2	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	<u>-2</u>	2	-2	1	-2	-2
4	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	<u>-2</u>	2	-2	1	-2	UN
																	120

<sup>a</sup> 不正解の回答を下線で表示した。

**(C)施設 D**

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) <sup>a</sup>																
	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
2	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	<u>10</u>

<sup>a</sup> 不正解の回答を下線で表示した。

**(D)施設 E**

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) <sup>a</sup>																
	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
1	<u>UN</u>	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
	<u>427.72</u>																
2	<u>UN</u>	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
	<u>427.60</u>																
3	<u>UN</u>	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
	<u>438.75</u>																
4	<u>UN</u>	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN
	<u>427.47</u>																120.12

<sup>a</sup> 不正解の回答を下線で表示した。

(E)施設 F

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) <sup>a</sup>																
	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
4	2	1	1	2	3	12	14	-2	<u>UN</u>	-2	1	-2	2	-2	1	-2	UN
									<u>428</u>								121

<sup>a</sup> 不正解の回答を下線で表示した。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

1. Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Naoshi Ando, Junji Seto, Kyoko Hazama, Keigo Enomoto, Hidemasa Izumiya, Yukihiro Akeda, Makoto Ohnishi, Another advantage of multi-locus variable-number tandem repeat analysis that can putatively subdivide enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains into clades by *maximum a posteriori* estimation, PLOS ONE, 18(3): e0283684, 2023
2. Yano B., Taniguchi I., Gotoh Y., Hayashi T., & Nakamura K.: Dynamic changes in Shiga toxin (Stx) 1 transducing phage throughout the evolution of O26:H11 Stx-producing *Escherichia coli*, Scientific Reports, 13(1):4935, 2023.
3. Nakamura K., Seto K., Lee K., Ooka T., Gotoh Y., Taniguchi I., Ogura Y, Jacques Georges Mainil, Denis Piérard, Harata T., Etoh Y., Ueda A, Hamasaki M., Isobe H., Kimata K., Narimatsu H., Yatsuyanagi J., Ohnishi M., Iyoda S., Hayashi T.: Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25, Microbial Genomics, 9:000959, 2023.
4. Miyata T., Taniguchi I., Nakamura K., Gotoh Y., Yoshimura D., Itoh T., Hirai S., Yokoyama E., Ohnishi M., Iyoda S., Ogura Y., Hayashi T.: Alteration of a Shiga toxin-encoding phage associated with a change in toxin production level and disease severity in *Escherichia coli*. Microbial Genomics, 9:0009935, 2023.
5. Ikeda R., Nakamura K., Saulmont M., Habets A., Duprez JN, Korsak N., Hayashi T., Thiry D., Mainil JG.: *Escherichia coli* O80 in Healthy Cattle: Absence of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *E. coli* O80:H2 and (Phylo) Genomics of Non-Clonal Complex 165 *E. coli* O80, Microorganisms, 11(2):230, 2023.
6. Nakamura K., Seto, K., Isobe J., Taniguchi I., Gotoh Y., Hayashi T.: Insertion Sequence (IS)-Excision Enhancer (IEE)-Mediated IS Excision from the lacZ Gene Restores the Lactose Utilization Defect of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

0121:H19 Strains and Is Responsible for Their Delayed Lactose Utilization Phenotype, *Applied Environmental Microbiology*, 88(16):e0076022, 2022.

7. Nakamura K, Ogura Y, Gotoh Y, Hayashi T.: Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in *Escherichia coli*, *PLoS Pathogens*, 17(4):e1009073, 2021.

8. Nakamura K, Tokuda C, Arimitsu H, Etoh Y, Hamasaki M, Deguchi Y, Taniguchi I, Gotoh Y, Ogura Y, Hayashi T.: Development of a homogeneous time-resolved FRET (HTRF) assay for the quantification of Shiga toxin 2 produced by *E. coli*. *PeerJ*, 9:e11871, 2021.

9. Nishida R, Nakamura K, Taniguchi I, Murase K, Ooka T, Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Toyoda A, Mainil JG, Piérard D, Seto K, Harada T, Isobe J, Kimata K, Etoh Y, Hamasaki M, Narimatsu H, Yatsuyanagi J, Kameyama M, Matsumoto Y, Nagai Y, Kawase J, Yokoyama E, Ishikawa K, Shiimoto T, Lee K, Kang D, Akashi K, Ohnishi M, Iyoda S, Hayashi T.: The global population structure and evolutionary history of the acquisition of major virulence factor-encoding genetic elements in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0121:H19, *Microbial Genomics*, 7(12):000716, 2021.

10. Kimata K, Lee K, Watahiki M, Isobe J, Ohnishi M., Iyoda S. Global distribution of epidemic-related Shiga toxin 2 encoding phages among enteroaggregative *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2020 Jul 16;10(1):11738. doi: 10.1038/s41598-020-68462-9.

11. Kato H, Yahata Y, Hori Y, Fujita K, Ooura N, Kido T, Yoshimoto K, Matsui T, Izumiya H, Ohnishi M., Oishi K. A shigellosis outbreak associated with a sports festival at a kindergarten in Kitakyusyu City, Japan. *J Infect Chemother.* 2020 Jul 2:S1341-321X(20)30191-4. doi: 10.1016/j.jiac.2020.06.005.

12. Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, Ohnishi M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for non-0157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: focus on serogroups 0103, 0121, 0145, 0165, and 091. *Jpn J Infect Dis.* 2020 Nov 24;73(6):481-490. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.095.

13. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2020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42巻、96-97、2021年5月

14. 李謙一、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：国内で分離された腸管出血性大腸菌の全ゲノム配列データベース化と食中毒事例の解析。IASR、第 42 巻、97-98、2021 年 5 月

15. 泉谷秀昌，李 謙一，伊豫田 淳，大西 真．2021 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 43 巻、108-109、2022 年 5 月