

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 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

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。類似したタンデムリピート（TR）パターンを持つEHEC菌株が広域に蔓延することが、毎年、サーベイランスで確認されている。MLVA法が分子疫学的解析法として有効であるためには、蔓延が一定期間で終わる原因が、菌株の多様性増加によりMLVA法で同一クローン由来と判断できなくなったためでないことを示す必要がある。また、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、蔓延菌株に対するMLVA法の有効性を検証するために、長期的な継代培養を行い、蔓延菌株を模擬的に作成し、TR数の変化を観察した。継代培養したLB Brothを平板培地に画線培養し、得たコロニーについてMLVA法を行ったところ、培養30日目以降、TR数が変化していた。150日目まで継代培養を続けても、コロニーのTR数の変化は2領域以内であり、同一クローン由来と判定できる範囲内だった。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る。次に、全国の地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験を行ったところ、参加した37施設中30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設定が適切でなかった施設、電気泳動の際にDNAの添加を忘れた施設があった。これら施設に改善法を示したが、全地衛研の約3割は本研究で実施してきた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¹⁾。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¹⁾。近年、食品流通網の拡大・複雑化に伴い、食中毒の期間が長くなり、規模も拡大しており²⁾、PFGE法では対応しづらい状況下にある。

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³⁾。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⁴⁾。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の利点もある。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法がサーベイランスに用いられるようになってから、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⁵⁾。これら菌株が分離された感染者の間には疫学的関連性が確認されないことが多い。しかし、菌株間のTRパターンの違いは1～2領域であることから、これら菌株は同一クローンから発生したと思われる⁴⁾。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⁶⁾。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る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。

MLVA法が有効な分子疫学的解析法であったとしても、本法が持つ能力を公衆衛生分野で発揮するには、地衛研での検査精度が高くなければならない。本研究では、地衛研でのMLVA法の検査精度を担保するために、以前から精度管理試験を実施する準備を進めてきた。2020年度には、精度管理試験での配布に適したEHEC菌株を選定し、DNAの抽出法も決めた。2021年度には、精度管理試験での検証項目を決定するために、一部の地衛研にご支援いただいでプレ試験を実施した。プレ試験では検体としてEHECの菌株及びDNAを配布したが、一部の菌株検体でプラスミドの脱落が起こり、TR数が検出不能となった。全国規模で精度管理試験を実施した際、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と想定される。また、プレ試験では1施設からの回答が不正解であったが、不正解の原因はDNA抽出法でなく、フラグメント解析ソフトの使用法が正しくないことだった。そこで、本年度に実施予定の全国規模でのMLVA法の精度管理試験ではDNA検体を配布し、解析ソフトを正しく利用できるかを検証することにした。

本研究では、蔓延菌株に対するMLVA法の有効性を検証するために、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、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、地衛研での検査精度を評価した。

B. 研究方法

1. 蔓延菌株に対する MLVA 法の有効性の検証

蔓延菌株を模擬的に作成するために、2つの方法で4菌株を長期的・連続的に継代培養した(表1)。1つ目の継代培養方法では普通寒天平板培地を用いた。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、マイクロピペットでLB Brothを良く懸濁し、200 μ 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つのビーズを取り出し、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、泉谷らの方法に準じてMLVA法を実施した⁴⁾。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。

2. MLVA法の精度管理試験の参加施設

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、昨年度の本事業により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2)。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。

3. MLVA法の精度管理試験での問題内容

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9菌株のEHEC 0157、026及び0111から4菌株を選び（表1）、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 (Bio-Rad Laboratories) を用いて、EHEC菌株からDNAを抽出し、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) で20~25 ng/ μ Lに調製した。参加施設に検体を送付するまで-20°C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1）。4検体の内、検体4のみ1つの領域に非典型的なTR数を持っていた。検体4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ため、遺伝子産物はTR数が6と7の間で検出される。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。

4. MLVA法の精度管理試験の実施工程

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1）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。

5. MLVA法の精度管理試験における回答の評価

基本的に、各検体について全ての領域で表1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。回答用紙の表や備考欄において（図1）、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内に入らなかつ

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

1. 蔓延菌株に対する MLVA 法の有効性の検証

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3（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3（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

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4）。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4、表5（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つ目の問題点として、電気泳動の際にPCR産物の添加し忘れと思われた（図2（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4、表5（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2（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 026、検体3はEHEC 0111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、026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4、表5（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2（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4、表5（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2（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4、表5（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2（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の判断を惑わした可能性があると思われる。

D. 考察

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数が変化していたのに対して、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る。

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、優勢な菌体が置き換わることを示している。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。

本研究において全国規模での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¹⁾、更に、食中毒も広域化している²⁾。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、早急に改善を求める必要があった。

MLVA法精度管理試験での回答評価後に、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ことを伝えた。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。

MLVA法精度管理試験では、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¹⁾。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。

MLVA精度管理試験の実施は今後も必要と思われる。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。昨年度及び今年度に試験を実施し、合計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⁷⁾。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、本年度の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

長期的・連続的に継代培養したEHEC菌株をMLVA法で解析したところ、同一クローン由来と判定できる範囲内でのTR数の変化があった。これは、長期間に渡り変異が蓄積した菌株に対してもMLVA法が有効であることを示している。次に、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、未受験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、本年度のMLVA法の精度管理試験にご参加くださり、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) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40(5): 83-85, 2019
- 3) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 4) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 5) 泉谷ら, 病原微生物検出情報, 43(5): 108-109, 2022
- 6) Tanner, et al., Trends Microbiol. 26: 986-998, 2018
- 7) 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

別紙 1

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。

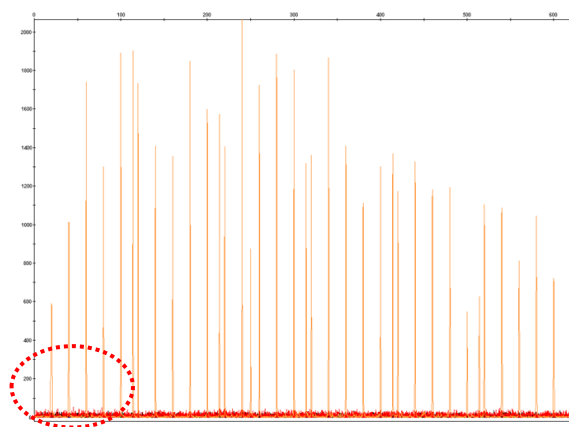
検体名	TR数（上段）及び遺伝子増幅産物のbp数（下段）																
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
記載例	5	2	6	3	-2	UN	7	-2	4	-2	4	10	3	-2	2	-2	7
	721																
検体1																	
検体2																	
検体3															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

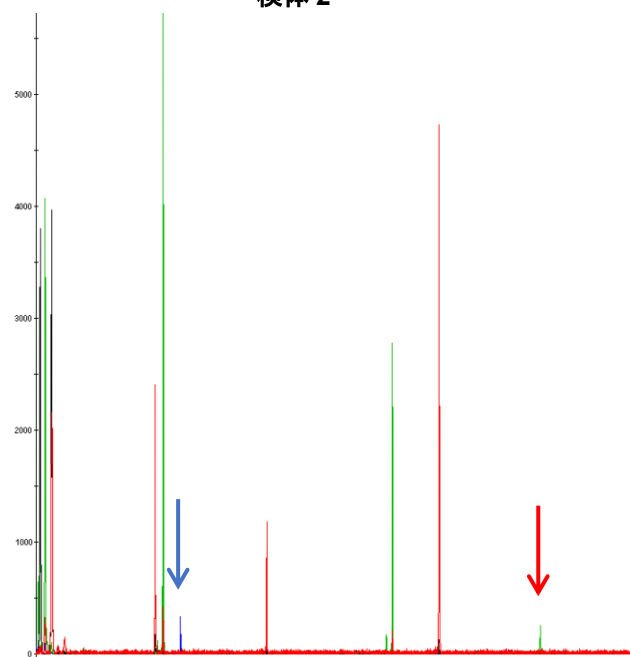
図1 腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法精度管理試験での回答用紙

(A)施設 A



(B)施設 B

検体 2



検体 4

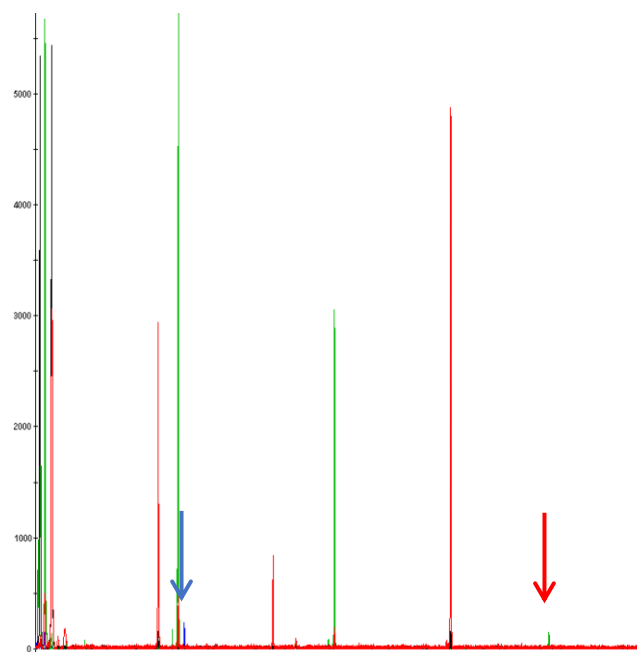


図 2 MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(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

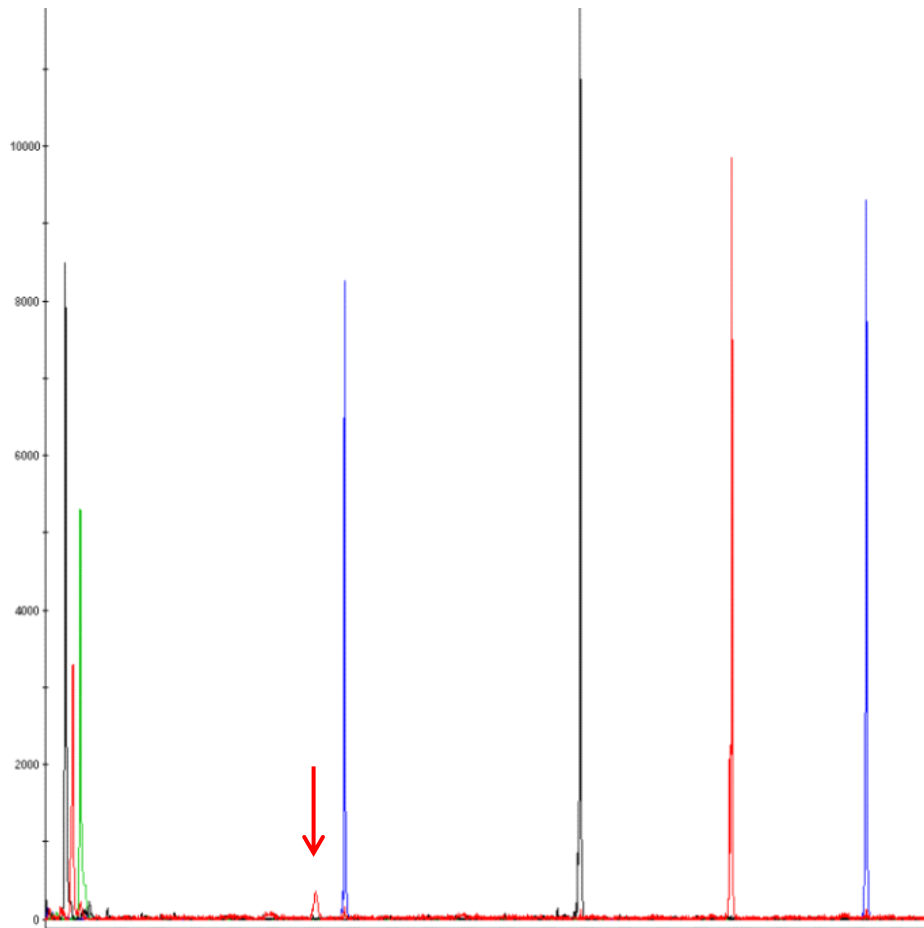


図 2(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(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

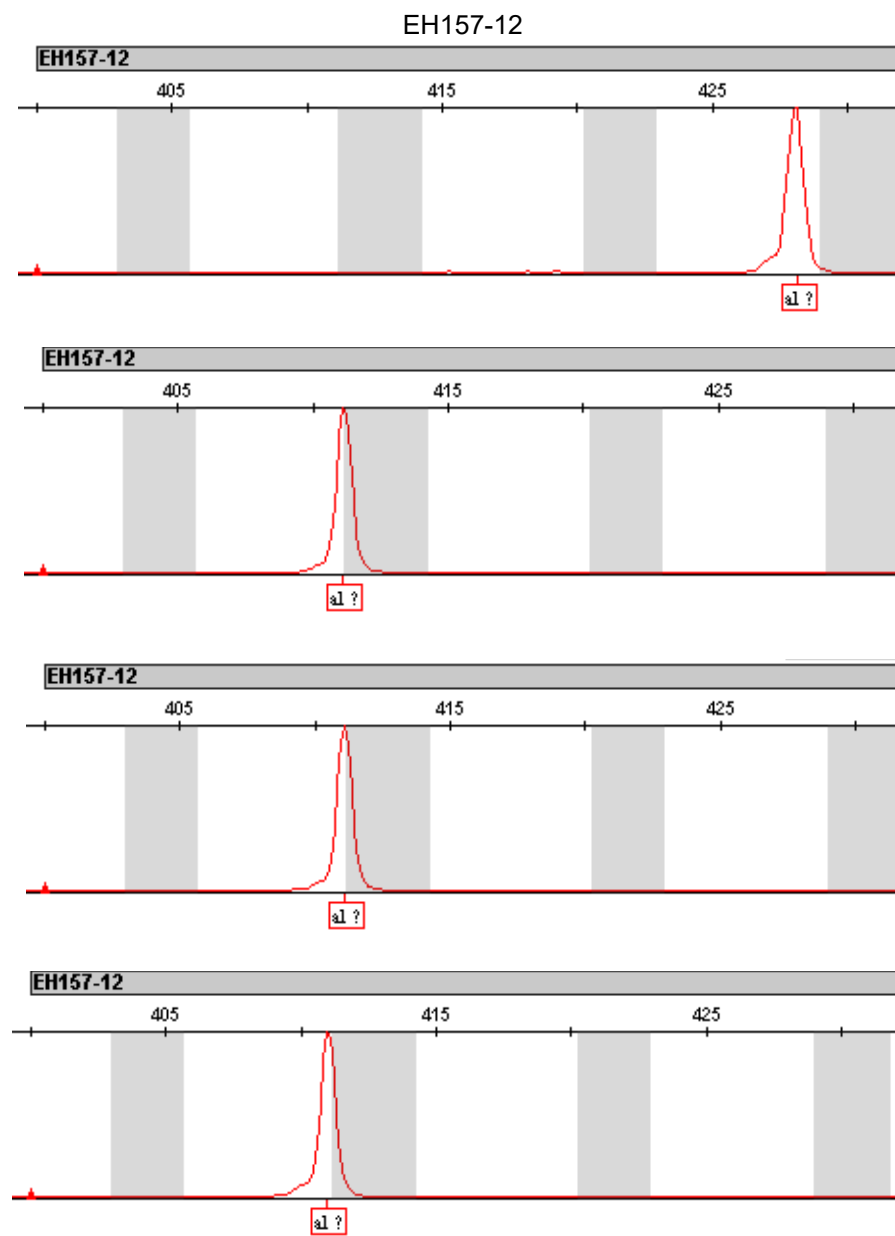
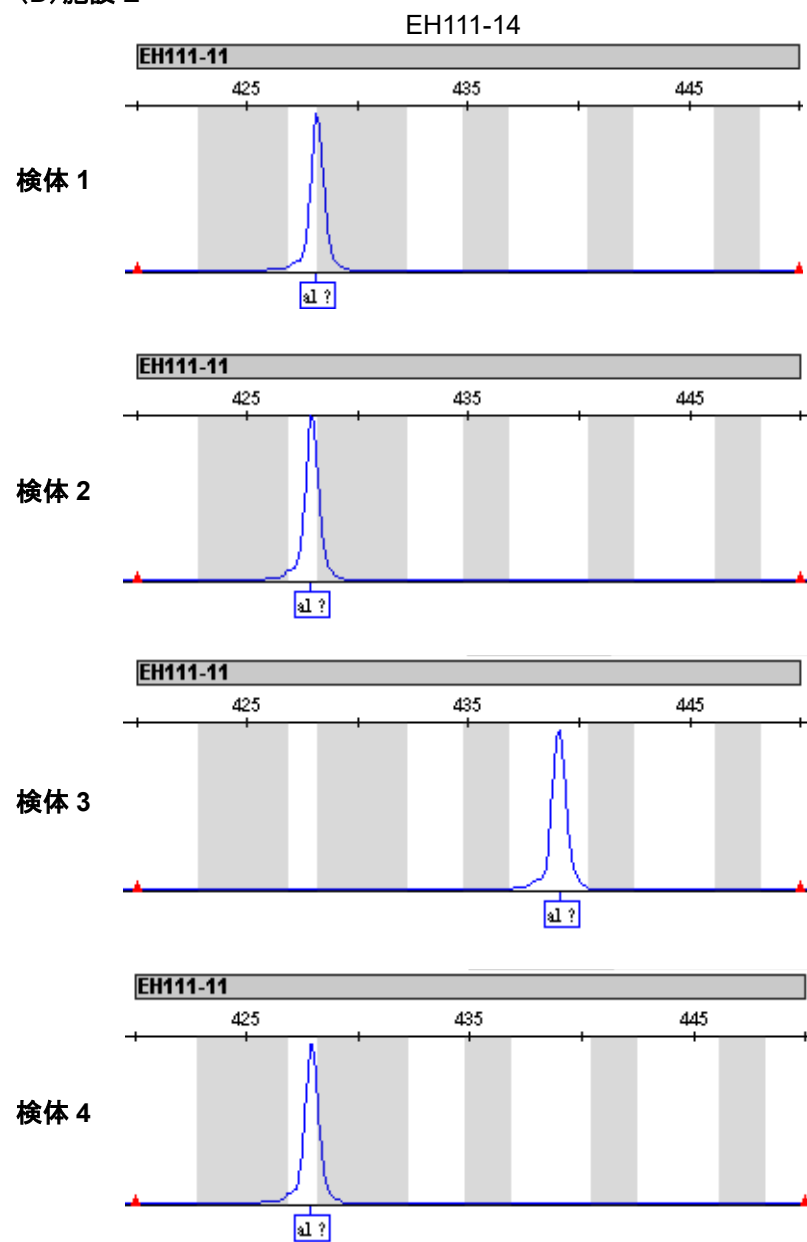


図 2(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(E)施設 F

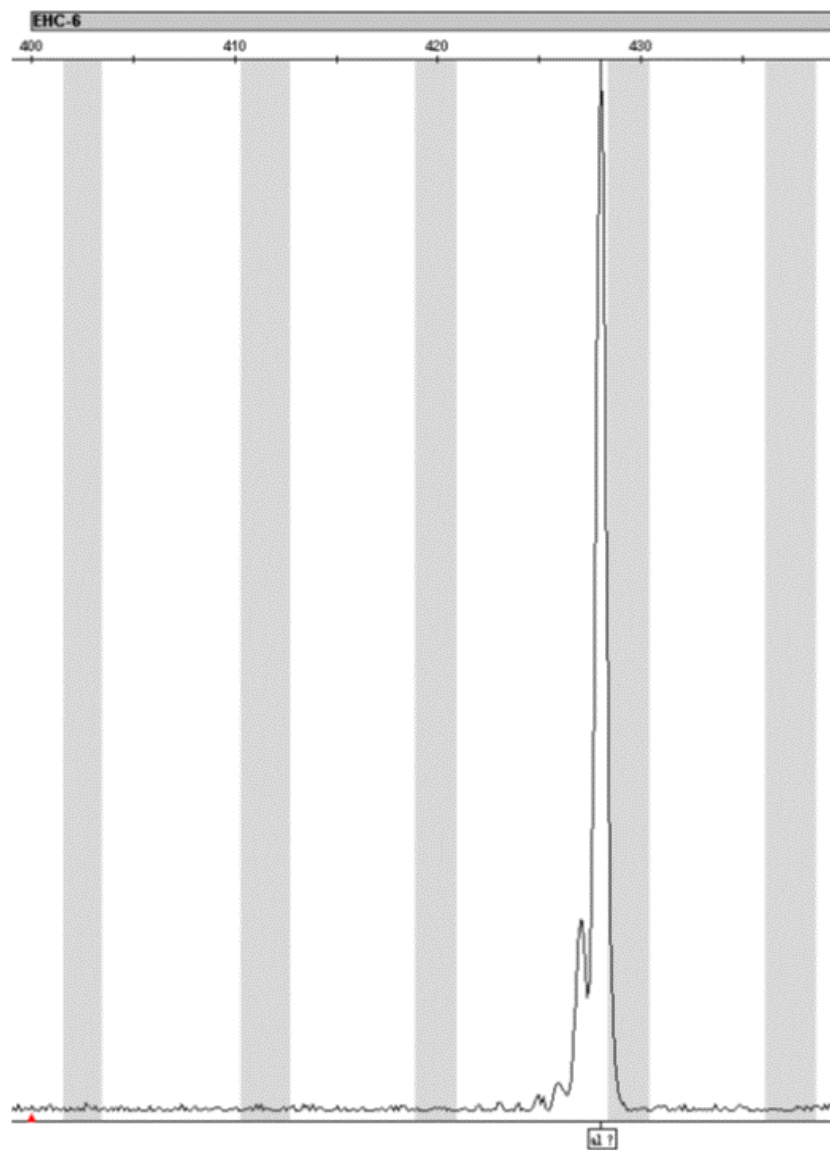


図 2(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

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 本研究で用いたEHEC菌株のMLVA法におけるTRパターン

菌株 検体 ^{a/} ^b	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	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
2	O26	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
3	O111	4	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
4	O26	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN ^c

^a 蔓延菌株に対するMLVA法の有効性の検証実験での菌株。

^b MLVA法の精度管理試験での検体。

^c 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2 MLVA法の精度管理試験の参加施設

支部 ^a	今年度に 参加 ^b	昨年度に 参加 ^c	施設数 ^d	参加率 (%) ^e
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

^a 地方衛生研究所全国協議会の支部。

^b 本年度に本研究で実施したMLVA法の精度管理試験に参加した施設数。

^c 昨年度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。

^d 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の内、都道府県及び政令指定都市に属する施設数。

^e 本年度及び昨年度に実施した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3 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	菌株 2	菌株 3	菌株 4
30 日	0	- ^a	-	-
60 日	0	-	-	-
90 日	0	-	-	-
120 日	0	-	-	-
150 日	1 ^b	0	0	0

^a 未測定。

^b 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	菌株 2	菌株 3	菌株 4
30 日	- ^a	0	2 ^b	-
60 日	-	2 ^c	0	-
90 日	-	1 ^d	0	-
120 日	-	14 ^d	5 ^e	-
150 日	0	4 ^d	12 ^e	0

^a 未測定。

^b 領域 EHC-1 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 13。

^c 領域 EH111-8 の TR 数が不検出。

^d 領域 EHC-2 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 24。

^e 領域 EHC-6 の TR 数が不検出。

表4 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 ^a	受験 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 ^c	-
関東・甲・信・静地区	5 ^b	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 ^b	6	1	0	施設 E(1-4)
九州地区	8	6	1	1 ^d	施設 F(4)
全国	37	28	6	3	-

^a 地方衛生研究所全国協議会の支部。

^b 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。

^c 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。

^d 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5 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) ^a																	
	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> ^b	<u>-2</u> ^b	3	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	5	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	-2	1	-2	UN	
																		120

^a 不正解の回答を下線で表示した。

^b 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) ^a																	
	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

^a 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) ^a																
	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>

^a 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) ^a																
	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

^a 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) ^a																
	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

^a 不正解の回答を下線で表示した。