

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¹⁾ 大西 真 国立感染症研究所 副所長
研究代表者²⁾ 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
1) 令和2-3年度研究代表者
2) 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、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²⁾。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³⁾。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³⁾、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⁴⁾。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⁵⁾。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⁶⁾。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⁷⁾。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⁸⁾。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⁹⁾、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¹⁰⁾。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¹¹⁾。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¹²⁾。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¹³⁾。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¹⁴⁾。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¹⁵⁾ (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¹⁶⁾。

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

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 Software¹⁷⁾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沫し、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沫した。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³⁾。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) に画線塗沫し、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枚の培地に画線塗沫し、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/ μ 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³⁾。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沫し、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/ μ 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 μ L、TaqMan Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を10 μ L、MLVA法のプライマーミックス1を2.0 μ L³⁾、プローブプライマー (10 μ M, FAM-CAGTTGATTTACGATTACGGA) を0.4 μ L、及び脱イオン蒸留水を6.6 μ L混合し、合計で25 μ 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/ μ 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/ μ 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/ μ 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¹⁷⁾。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¹⁸⁾。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¹⁸⁾。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¹⁹⁾。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/ μ 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 2×10^{-4} ng/ μ 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³⁾。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⁵⁾。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²¹⁾、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³⁾、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³⁾。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_t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¹⁾、更に、食中毒も広域化している⁴⁾。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。

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²²⁾。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

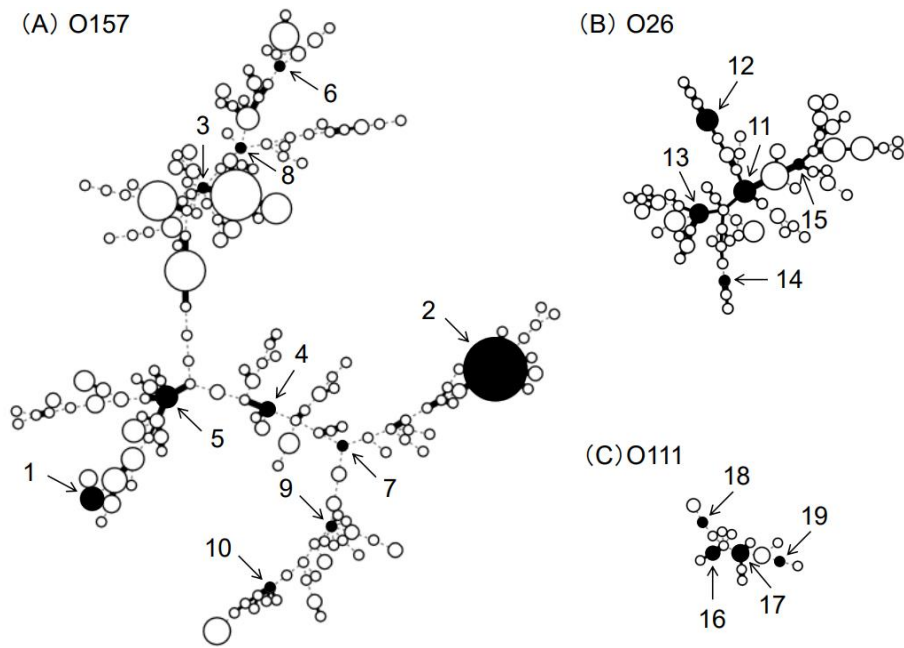


図1 腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法の結果から作成されたminimum spanning tree

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

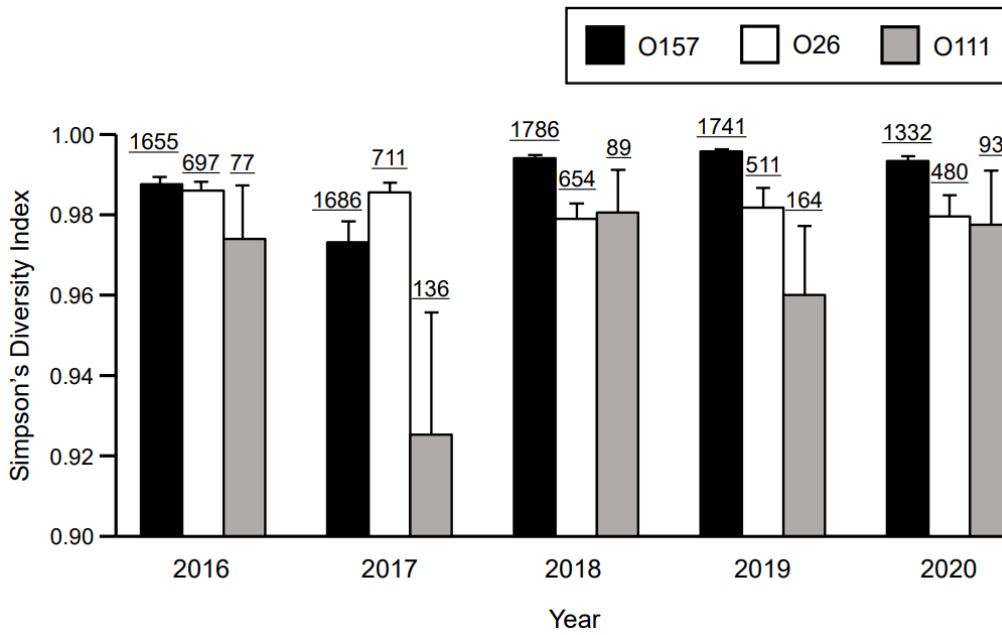
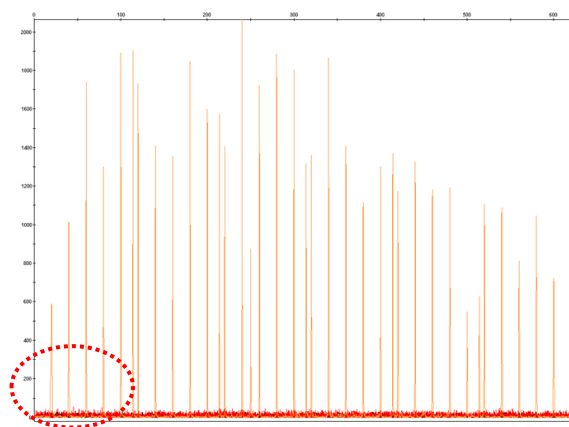


図4 EHEC菌株の各血清型におけるMLVA法遺伝子型の多様性

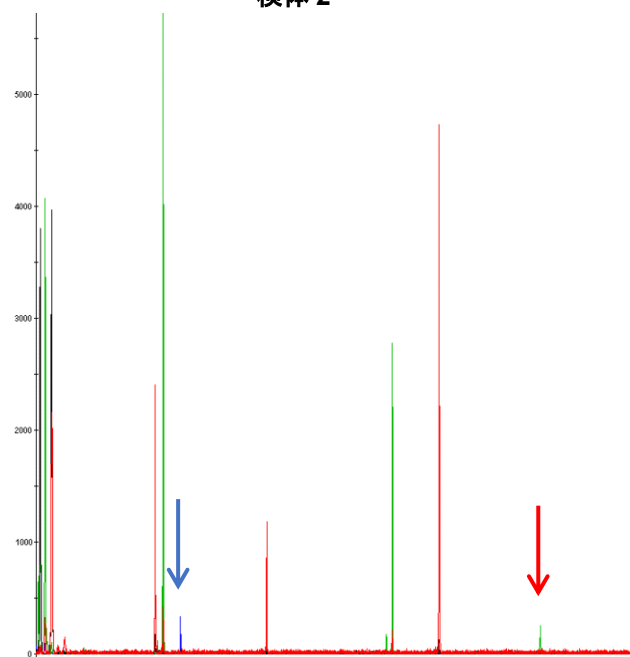
各血清型のSimpson's Diversity Indexを示す棒の上にかかれているアンダーバーがある数値は、各年に国立感染症研究所へ搬入された菌株数を示す。

(A)施設 A



(B)施設 B

検体 2



検体 4

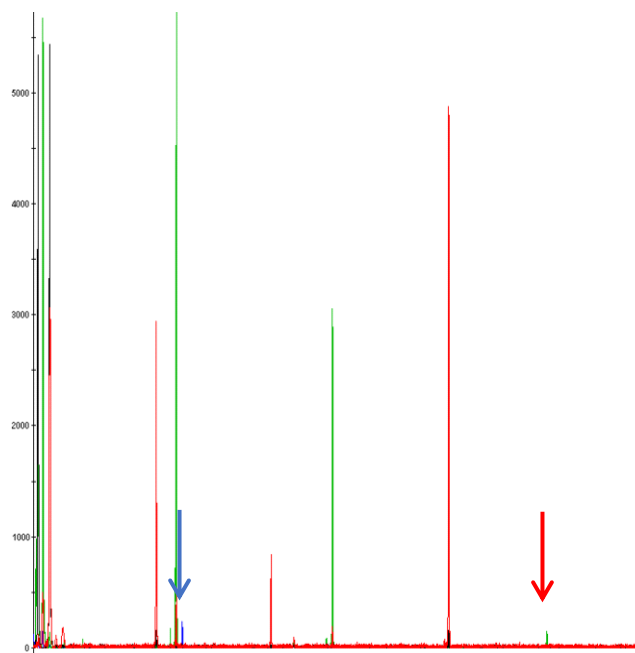


図 5 MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(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

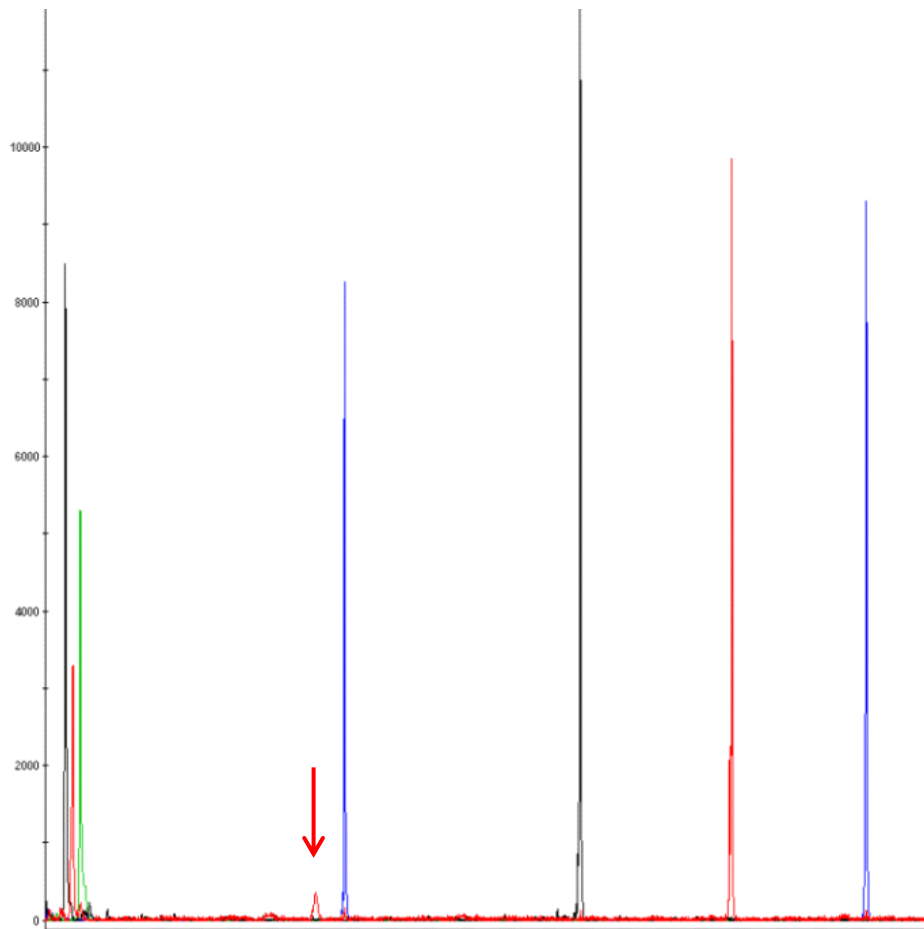


図 5(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(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

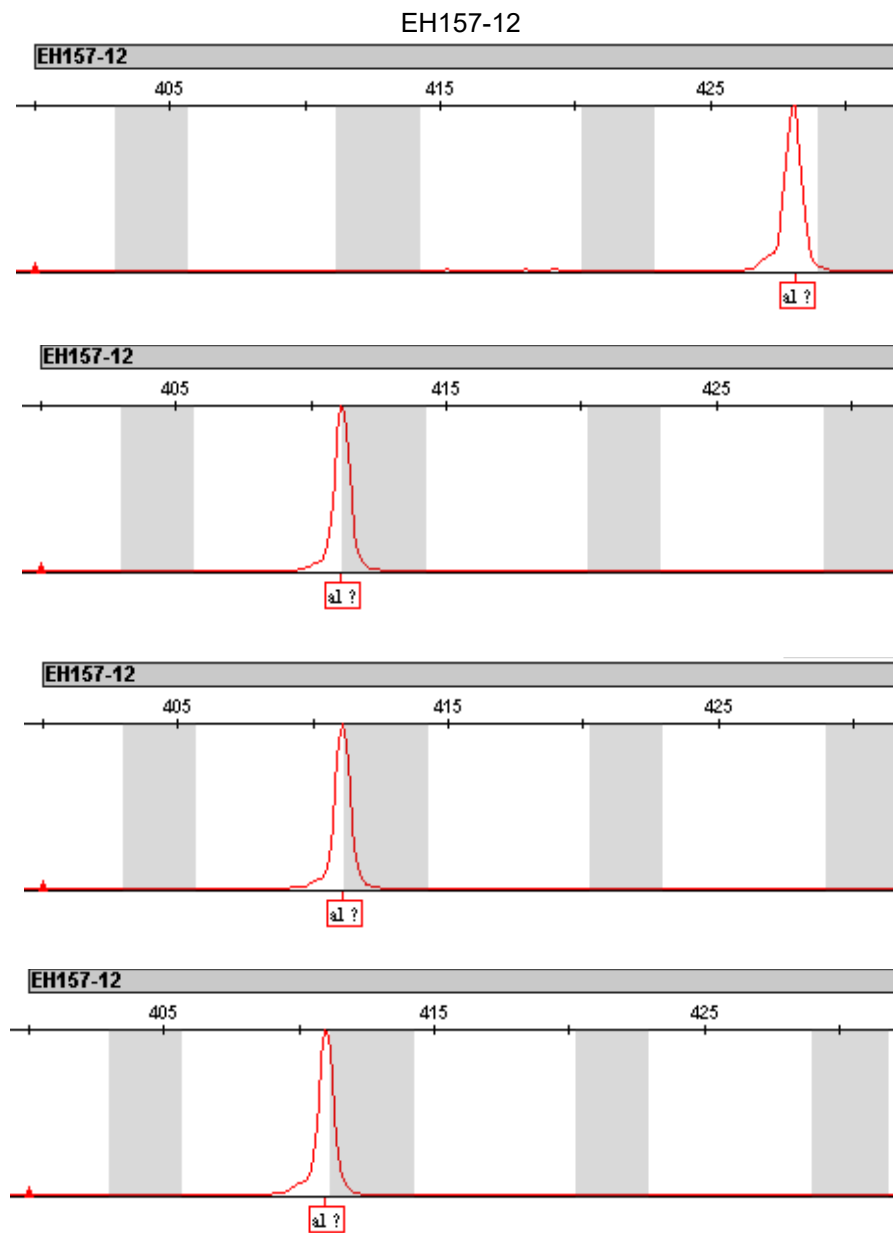
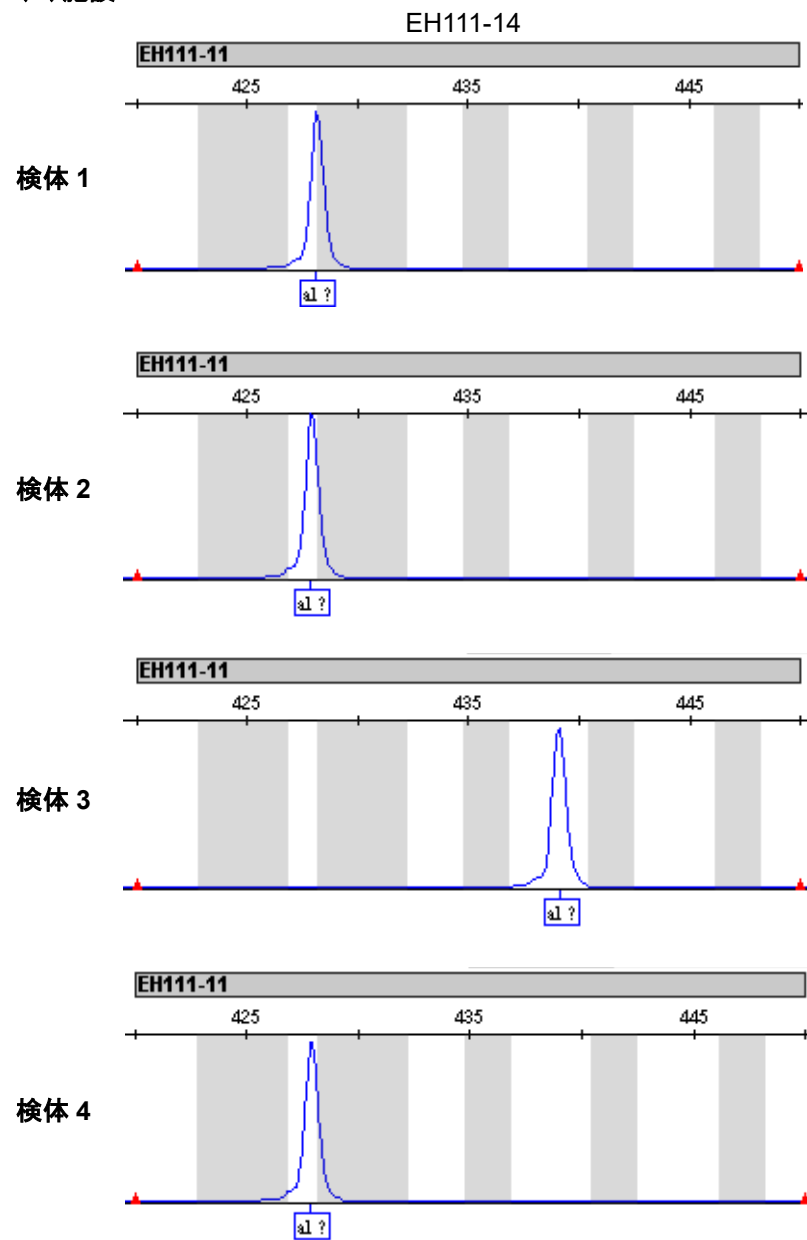


図 5(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(E)施設 F

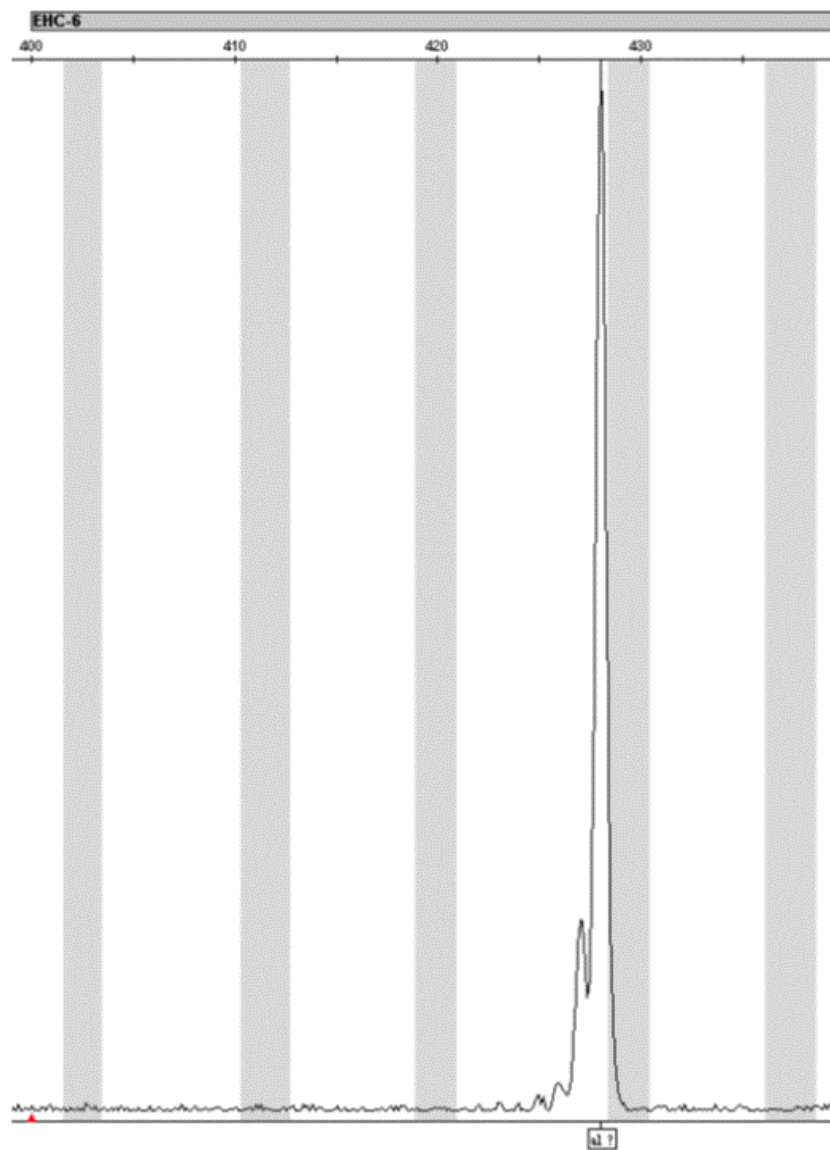


図 5(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

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. ^a	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 ^c	EH 111 -14 ^c	EH 111 -8 ^b	EH 157 -12 ^b	EH26 -7 ^c	EHC -1 ^b	EHC -2 ^b	EHC -5 ^b	EHC -6 ^c	O157 -3 ^b	O157 -34 ^b	O157 -9 ^b	O157 -25 ^b	O157 -17 ^c	O157 -19 ^c	O157 -36 ^c	O157 -37 ^c
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

^a 図1のminimum spanning tree上の位置。

^b 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	No. ^c	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 ^d

^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 表1のNo.を示す。

^d 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. ^a)	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	

^a 表1のNo.を示す。

(B) DNA検体

検体 (No. ^a)	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 ^b	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 ^c	O26
6 (No. 19)	I、II	4	1	5	2	-2	8	6	10 ^d	3	-2	3	14	2	-2	1	-2	7	O111

^a 表1のNo.を示す。

^b 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。

^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。

^d 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 ^a	3年目に参加 ^b	2年目に参加 ^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 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。

^c 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。

^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内、都道府県及び政令指定都市に属する施設数。

^e 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¹⁷⁾

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 ^a	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 ^a	EHC -1	EHC -2	EHC -5 ^a	EHC -6 ^a	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF ^b	1	6 ^d	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	9	16	5	24	8	8	6	5
2	O157	2	NF ^b	1	7 ^d	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	9	NF ^c	5	24	8	8	6	4
3	O157	2	NF ^b	1	12	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	NF ^c	NF ^c	5	24	8	8	6	1
4	O157	2	NF ^b	1	12	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	9	16	6 ^d	24	8	8	6	1

^a 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。

^b 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 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。

^d 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¹⁸⁾

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 ^a	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 ^a	EHC -1	EHC -2	EHC -5 ^a	EHC -6 ^a	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	3	4	NF ^b	NF ^b	12	8	12	4	6	11	NF ^b	5	3

^a 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。

^b 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¹⁸⁾

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 ^a	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 ^a	EHC -1	EHC -2	EHC -5 ^a	EHC -6 ^a	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	7	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	5	NF ^b	2
2	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	8 ^d	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	5	NF ^b	1
3	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	7	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	6 ^d	NF ^b	1
4	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	6 ^d	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	4 ^d	NF ^b	1

^a 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。

^b 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。

^d 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¹⁹⁾

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 ^e	EHC -6	O157 -3 ^e	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17 ^e	O157 -19	O157 -36 ^e	O157 -37 ^e	
1	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1	6 ^d	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
2	O26	2	1	1	2	3	6	5 ^d	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
3	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1	10 ^d	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
4	O26	2	1	1	2	3	6	NF ^c	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
5	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
6	O26	2	1	1	2	8 ^d	6	5 ^d	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1

^b 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 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。

^d 他の菌株とTR数が異なった。

^e 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	- ^b	-	-
60 日	0	-	-	-
90 日	0	-	-	-
120 日	0	-	-	-
150 日	1 ^c	0	0	0

^a 表1のNo.を示す。

^b 未測定。

^c 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	- ^b	0	2 ^c	-
60 日	-	2 ^d	0	-
90 日	-	1 ^e	0	-
120 日	-	14 ^e	5 ^f	-
150 日	0	4 ^e	12 ^f	0

^a 表1のNo.を示す。

^b 未測定。

^c 領域 EHC-1 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 13。

^d 領域 EH111-8 の TR 数が不検出。

^e 領域 EHC-2 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 24。

^f 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. ^a	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 ^b
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 ^b	0	2 ^c
8	co190176		0	0	0	0
9	co190191		0	0	0	0
10	co190892		0	0	1 ^d	1 ^b
11	co150594	O26	0	0	1 ^d	0
12	co170503		0	2 ^e	1 ^e	1 ^e
13	co182152		0	0	0	0
14	co190202		5 ^f	5 ^f	5 ^f	5 ^f
15	co190205		0	0	0	0
16	co152166	O111	1 ^g	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

^a 表1のNo.を示す。

^b 領域O157-10においてTR数が変化。

^c 領域EHC-2においてTR数が6から7に増加。

^d 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。

^e 領域EHC-1においてTR数が9から2に減少。

^f 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。

^g 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) ^a
EHC-5		-
O157-3		co190892(15) ^b 、co150594(15) ^b
O157-34		-
EH26-7	ミックス 2	-
O157-19		-
EH111-11		-
EHC-6		-
O157-37		co190202(5、10、15、20) ^c
O157-17		-
O157-36		-
EH111-14		-
O157-10		co190173(5)、co161706(20)、co190892(20)

^a TR数が9から2に減少。

^b TRと誤って判定されうる非特異的なピークが出現。

^c 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 _T 値 (検出限界濃度)		
	1 日間	2 日間	3 日間
冷凍	21.84 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)	22.13 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)	20.74 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)
冷蔵	21.86 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)	21.03 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)	20.51 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)
常温	21.75 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)	21.80 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μL)	21.61 (2 x 10 ⁻⁴ 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 ^a	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 ^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) ^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。