

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症及び予防接種政策推進 研究事業

「食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究」

令和2年度研究分担報告書
「EHEC 分離株の分子疫学解析について」

研究代表者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
研究分担者	伊豫田 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	李 謙一	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者		地方衛生研究所	

研究要旨 2020年に分離されたEHECについてMLVAおよびPFGE解析を行い、その型別結果に基づいて分離株の動向について調べた。PFGEを用いて231株の解析を行い、BioNumericsデータベースに登録した。MLVAを用いてEHEC 0157 1,295株、026 459株、0111 85株、0103 162株、0121 58株、0145 16株、0165 4株、091 31株、計2,110株を解析し、それぞれ、555、179、54、52、25、12、4、27の型が同定された。0121を除き、シンプソンの多様性指数(SDI)は0.944-1と比較的高かった。5機関以上で検出されたMLVAコンプレックスもしくはタイプに含まれる株は445株であった。当該コンプレックスは0157 13種類、0103 2種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは0157 7種類、026 1種類、0111 1種類、0103 1種類、0121 1種類であった。2018年6月29日に厚生労働省から発出された事務連絡に基づき地研から送付されたMLVAデータの解析を行い、送付された菌株の解析結果と併せて情報還元・共有を行った。送付されたMLVAデータ処理のため、VPSサーバにMLVAシステムの構築を行った。今後、MLVAをはじめとした分子疫学解析手法の手技的側面、データ解析、データの取り扱いといった側面における技術支援、並びにMLVAシステムの運用検証など、共有に向け、さらにシステムの検討・改良の必要があると考えられた。

A. 研究目的

食品由来感染症は病原体に汚染された食品を摂取することによって発生する。腸管出血性大腸菌は当該感染症の代表的な起原菌の一つである。EHEC感染症は3類感染症に含まれ、毎年3-4千名の感染者が発生している。これらの中には複数の自治体をま

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

EHEC 流行菌型の解析、すなわち分子疫学

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

平成30年6月29日に厚生労働省から発出された事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により、解析手法のMLVAへの統一およびMLVAデータの収集が図られることとなった。

上記のような技術的、また社会的背景の中、病原体情報という科学的エビデンスに基づく事例対応および感染症対策に資するため、病原体情報に関する解析手法並びに情報共有化システムの構築が本研究の目的である。

本研究では特にEHEC感染症の中でも発生頻度の高い主要3血清群（0157、026、0111）、並びに血清群0103、0121、0145、0165、091（追加5血清群）について、MLVA法を用いて解析し、類縁菌株の情報取得、複数の機関で検出される所謂広域株の解析、及び情報共有について検討を行った。

B. 研究方法

感染研に送付された腸管出血性大腸菌2020年分離株に対してMLVA法及びPFGEを用いた解析を行った。解析結果のデータベース化をBioNumerics（Applied Maths社）により行った。地方衛生研究所から送付されたMLVAデータについても同様にデータベース化を行い、菌株からのデータと合わせて比較解析を行った。結果については、電子メールにより菌株送付機関に還元した。

送付された菌株を解析したデータ、地衛研から直接送付されたMLVAデータについては定期的に食中毒調査支援システム（NESFD）において情報共有を行った。

MLVAについてはIzumiyaら（2008、2020）に記載の遺伝子座を用いて、PFGEについてはPulsenet Internationalに準拠した方法で解析した。

MLVAデータに関するシステム構築のため従来のWindowsサーバからVPSサーバに環境を移行した。

C. 研究結果

2020年分離株について、2021年2月24日現在の結果を示す。

1. PFGE

231株を解析した。菌株数が多かった0群（PCR法による0gを含む。）は0115が17株、05が15株、0186が15株、08が13株、0128が10株であった。得られた情報をBioNumericsデータベースに登録した。

2. MLVA

EHEC 0157 1,295株、026 459株、0111 85株、0103 162株、0121 58株、0145 16株、0165 4株、091 31株、計2,110株をMLVA法で解析した。それぞれ、555、179、54、52、25、12、4、27の型が同定された。各血清群におけるSimpson's Diversity Index (SDI) は表1に示すとおりであった。

表2に検出株数の多かった型上位15を示す。集団事例に関連し、1-2機関のみで検出された型が5種類（20m2053、18m0040、20m2094、20m0306、15m2189）あった。

3. 広域株の解析

MLVAでは、得られた型から関連が疑われ

るタイプ同士をコンプレックスとして包括している。2020年分離、解析したEHEC株のうち、5機関以上で検出されたMLVAコンプレックスもしくはMLVA型に含まれる株は445株であった。このうちコンプレックスは15種類（0157が13種類、0103が2種類）であり、コンプレックスに含まれない広域タイプとしては11種類（0157が7種類、026が1種類、0111が1種類、0103が1種類、0121が1種類）であった。

主要な広域株について、週別の検出状況を図1に、地理的な分布を図2に示す。

4. MLVA データ共有に関する活動

複数地研で共通のMLVAタイプもしくはコンプレックスが検出された場合には、検出菌株リストおよびMLVA型間の関係を示すminimum spanning tree (MST)をまとめ、関係機関に還元した。上記広域集団事例が疑われた株についてはMLVAに関する情報を全国6ブロックの研究分担者を通じて情報共有を行った

2018年6月の事務連絡に基づき2020年は24機関からMLVAデータの送付があり、590株のデータに型名を付与した。菌株解析で得られたMLVAデータおよび地研から送付されたMLVAデータについては、定期的に厚生労働省と共有しNESFDの掲示板に供された。

上記590株のうち、307株については後日菌株が送付され、MLVAの結果を還元するとともに、精度確認についても情報提供した。地研でのMLVA導入に向け、データ提供、データの照会、フラグメント解析設定ファイルの配布などを行った。

従来の感染研内Windowsサーバの環境を

VPSサーバに移行した。移行に伴い、BioNumericsサーバならびにIS-PSシステムを終了した。当該環境においてIS-PSシステムの一部を利用したMLVAシステムの構築を検討した。本システムは、Webを介してMLVAデータを登録、処理し、型名を付与するための試験システム環境として設計した。研究分担者に当該システムのIDを配布し、システムの試行及び検討を行った。

D. 考察

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

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

2014年度から稼働し始めたEHEC主要3血清群、並びに2017年度から導入した追加5血清群のMLVAの結果から、広域株探知に加え、集団事例、家族内事例における病原体情報の一致もしくは類似が認められ、個々の事例においても有用性が示された。

MLVAを活用することで迅速に病原体情報を共有することが期待されている。2018年6月の事務連絡に基づき、地研で実施したMLVAデータを使用した解析、並びに共有が

開始された。迅速なデータおよび菌株のやり取りが広域事例の対応に活かされた事例も見られた。

VPS サーバに構築中の MLVA システムは、Web ベースでデータを登録、MLVA 型を付与する。今後データを受け付けるユーザーを増やし、その運用を試験し、当該システムをさらに検証する必要がある。

E. 結論

EHEC 感染症における MLVA 法を活用することで、より迅速に病原体情報が獲得され、その情報還元および共有が図られることが期待される。

2018 年 6 月の事務連絡により、MLVA 法に基づく病原体解析手法の統一化、情報共有に向けた方向性が示された。今後、各地研における導入に向けた支援、試験結果の精度維持にかかる支援、データ授受に関する検討、データ共有のあり方などを含め、検討及び改良を重ねていく必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2019年に分離された腸管出血性大腸菌のMLVA法による解析。IASR、第41巻、71-72、2020年5月
2. Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, Ohnishi M. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Scheme for Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Focus on Serogroups O103, O121, O145, O165, and O91. *Jpn J Infect Dis.* 2020 Nov 24;73(6):481-490.

2) 学会発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

表 1. 2020 年株における MLVA 試験菌株数、型数及び Diversity Index

0 群	株数	型数	SDI
0157	1295	555	0.993
026	459	179	0.978
0111	85	54	0.975
0103	162	52	0.944
0121	58	25	0.877
0145	16	12	0.958
0165	4	4	1.000
091	31	27	0.989

表 2. 2020 年検出数上位 MLVA 型

MLVA 型	0 群	VT 型	株数	機関	コンプレックス
19m0513	0157	VT1+VT2	64	24	20c030
20m2053	026	VT1	47	1	20c210
18m0040	0157	VT1+VT2	28	2	
20m0368	0157	VT2	27	13	20c041
20m2094	026	VT1	25	1	20c209
20m0245	0157	VT1+VT2	24	4	20c038
20m0105	0157	VT2	24	10	20c010
20m0243	0157	VT1+VT2	21	9	20c028
20m0306	0157	VT2	20	1	20c032
16m4013	0103	VT1	20	7	20c403
20m0148	0157	VT2	19	10	20c019
20m0186	0157	VT1+VT2	19	13	20c023
18m0450	0157	VT1+VT2	19	4	
17m5022	0121	VT2	19	3	
15m2189	026	VT1	19	1	
18m4005	0103	VT1	19	9	

図1. 広域株の検出状況（週別）。点線は送付株全体（縦軸右）。

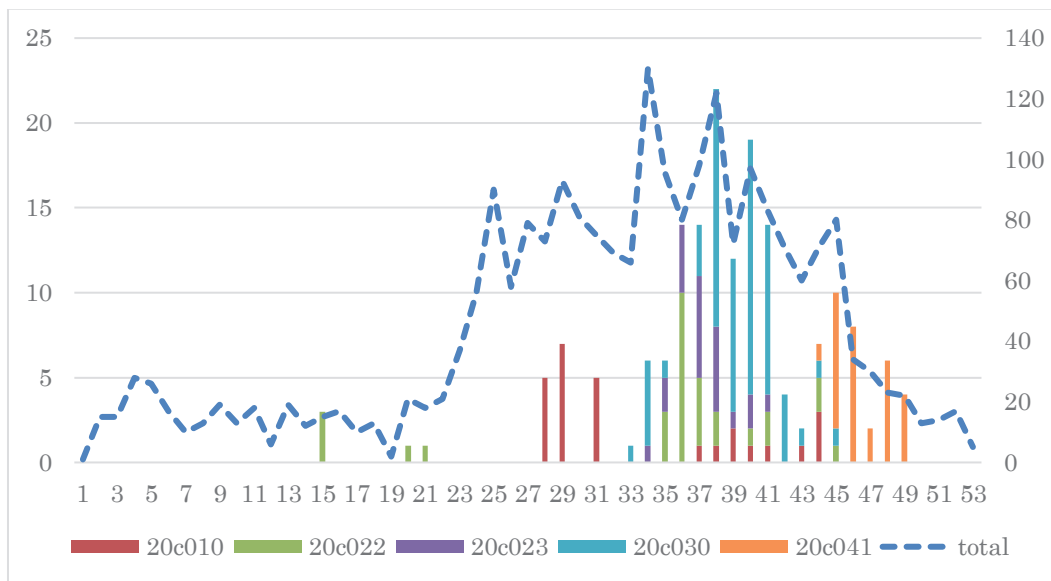
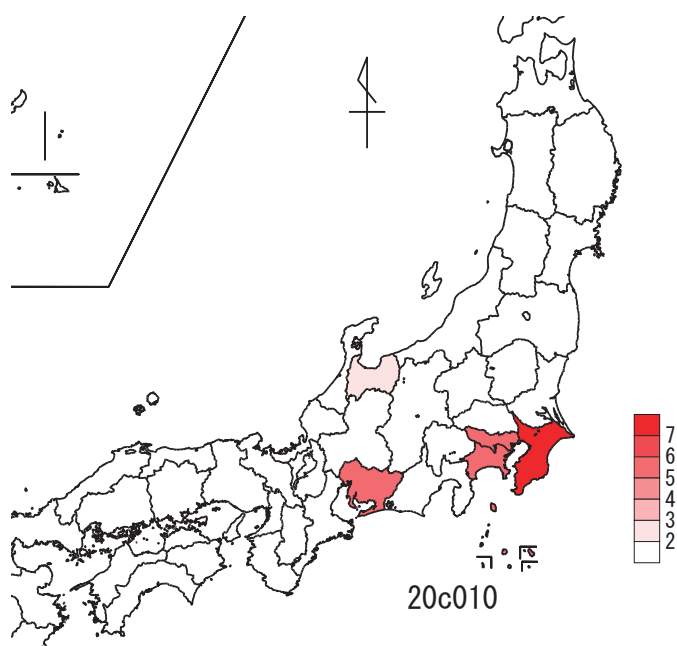
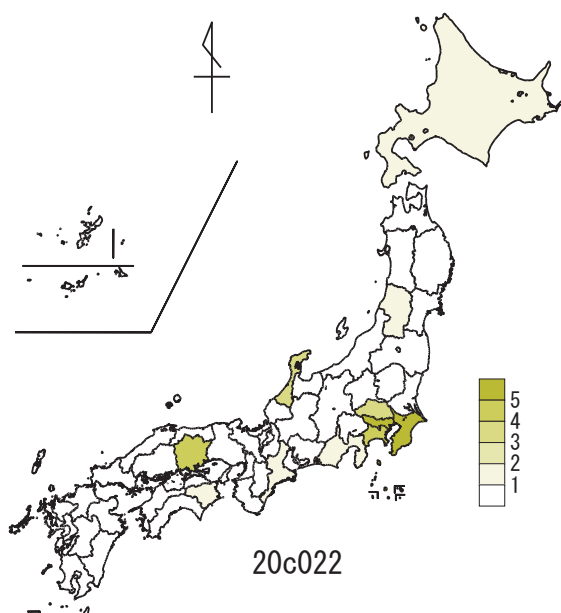


図2. 広域株の地理的分布

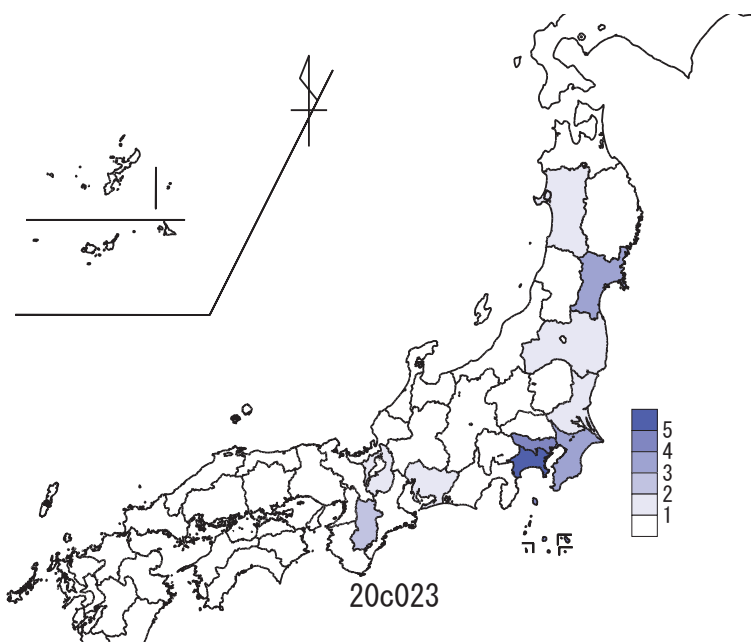
a) 0157 VT2 20c010 (27株、10機関)



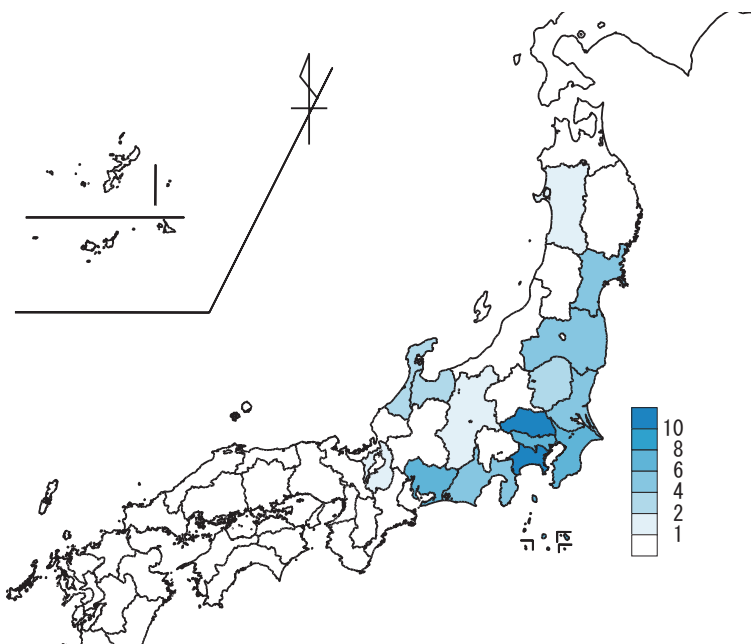
b) 0157 VT1+VT2 20c022 (31 株、13 機関)



c) 0157 VT1+VT2 20c023 (22 株、13 機関)



d) 0157 VT1+VT2 20c030 (66 株、24 機関)



e) 0157 VT2 20c041 (29 株、13 機関)

