厚生労働科学研究(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) 食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究

## 令和2年度分担研究報告書

関東ブロックで分離された食中毒起因菌の分子疫学解析法の検討と 精度管理に関する研究

研究分担者 東京都健康安全研究センター 鈴木 淳

研究協力者 茨城県衛生研究所 石川 加奈子

栃木県保健環境センター 江原 栞

群馬県衛生環境研究所 中野 剛志

埼玉県衛生研究所 佐藤 孝志

千葉県衛生研究所 間 京子

神奈川県衛生研究所 古川 一郎

横浜市衛生研究所 小泉 充正

山梨県衛生環境研究所 山上 隆也

長野県環境保全研究所 市川 奈緒

静岡県環境衛生科学研究所 森主 博貴

東京都健康安全研究センター 小西 典子, 齋木 大,

尾畑 浩魅

## 研究要旨

食中毒の散在的集団発生(Diffuse outbreak)を早期に探知し拡大防止を行うためには、共通原因食品を迅速に特定することが重要である。その手段として患者等から分離された菌株情報は非常に有用である。関東ブロックでは共通菌株 5 株 (O157: 4 株、O26: 1 株)を用いて PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理を行った結果、いずれも良好な成績であった。MLVA 法による精度管理においては、これまでで最も施設間の一致率が高い結果となり、年々各施設での手技が定着していることが確認できた。しかし近年、地方衛生研究所では担当者の異動が頻繁に行われていることから、今後も PFGE 法や MLVA 法の検査精度を一定に保つための精度管理が重要である。

東京都で検査を実施した O157 (203 株)、O26 (17 株)、0111 (8 株)の MLVA および PFGE を実施した結果、O26 および O111 は両者で全ての株が一致したが、O157 では PFGE が 91 種類の型に、MLVA は 112 種類の型に分類され、一部に両者で不一致であった菌株が存在した。両解析法どちらにおいても疫学調査と一致しない解析結果が得られる場合があったことから、菌株を対象とした分子疫学解析結果に加え、保健所等における聞き取り調査も必要不可欠であるといえることが確認できた。

#### A. 研究目的

感染症や食品媒介感染症発生時に最も重要なことは、感染源・感染経路の早期特定と感染拡大防止である。食品の広域流通が行われる現在は、同一食品を原因として散発的に異なる地域で食中毒が発生する散在的集団発生(Diffuse Outbreak)が起こる可能性が高く、これらを早期に探知することが健康被害の拡大防止に重要となる。原因食品、感染経路を特定するためには、患者や調理従事者、食品等から分離された病原体の詳細な解析が必要である。サルモネラや腸管出血性大腸菌(EHEC)による食中毒では症状も重篤に陥ることがあり、病原体の解析は特に重要となる。

一方、散発事例など広域に発生する事例では、異なる検査施設で実施した分子疫学解析結果を比較し判定する必要があることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが求められる。このことから、EHEC共通菌株を使用してPFGE法、IS法、MLVA法について各地研の精度管理を実施した。また、病原体解析に関するアンケートを実施し、解析の現状と今後の課題について調査した。

#### B. 研究方法

#### 1. 共通菌株を用いた精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株および O26 株 を関東ブロックの 9 施設に送付し、PFGE 法、 IS 法および MLVA 法の精度管理を行った。

## 1) 供試菌株

2017年に東京都内で分離された腸管出血性大腸菌として O157を4株および2020年に分離された026を1株の計5株を供試した。

#### 2) PFGE法

国立感染症研究所のプロトコルに従って実施した。

アガロースゲルの作製: 0.7mm プラグキャスターを使用し、1% SeaKem Gold Agarose (LONZA Japan) で作製した。

DNA 抽出法: Proteinase K(1mg/mL)、1% N-lauroylsarcosin-0.5M EDTA (pH8.0) で 50℃、 18~20 時間行った。

制限酵素処理:制限酵素 *Xba* I で 37℃、 4時間処理した。

電気泳動用アガロース:電気泳動用アガロースは SeaKem Gold Agarose (1%) を使用した。

電気泳動条件: 6 V/cm、2.2~54.2 秒、20~22 時間、buffer 温度 12 で行った。電気泳動時間は泳動後のバンドの先端がアガロースゲルの下から  $1.0\text{cm}\sim1.5\text{cm}$  になるように調整した。

サイズマーカー: S. Braenderup H9812 株 を Xba I で消化したものを用い、泳動用アガロースに入れた。

#### 3) IS-printing System 法

各施設で IS 法を実施し、想定されるサイズにバンドが認められた場合を「1」、認められない場合を「0」、判定が困難であった場合を「2」と記載し、その他のエキストラバンドが認められた場合には備考欄に記載した。これらのデータを比較することにより解析を行った。

#### 4) MLVA 法

共通菌株から DNA を抽出し、各施設の方法で MLVA 法を実施した。17 領域の繰り返し配列数を算出し、データを送付し比較することで解析を行った。また、MLVA 法に関わる供試菌株の培養方法と遺伝子解析を行

う上での遺伝子抽出方法、PCR 産物の希釈 倍率等のアンケート調査を実施した。

2. MLVA の解析結果の活用方法に関するアンケート

分離菌株の疫学解析に用いられる MLVA 法について、地方衛生研究所での実施状況 を把握する目的で、アンケート調査を実施 した。

3. 腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症 の発生状況と分子疫学解析が有用であった 事例

東京都で発生した EHEC による食中毒・ 感染症の発生状況をまとめた。また、分子疫 学解析が行政に活用された事例についてま とめた。

- C. 研究結果
- 1. 共通菌株を用いた精度管理結果
- 1) PFGE 法

関東ブロック 10 施設において、共通菌株 を用いた PFGE 解析を実施した。参加施設 数は昨年度より 1 施設増加した。

PFGE 画像ファイルを用いて各施設の比較を行った結果、O157の4株に関しては昨年同様にいずれの施設ともバンドの分離はおおむね良好であった。しかし、本年初めて実施したO26の1株に関しては、173.4Kb~398.4Kbの細かい分離(12本)の判定が困難な施設が認められた(写真1a、1b)。

#### 2) IS法

関東ブロック 10 施設において、O157 の 4 株に対して IS 解析を実施した。

1<sup>st</sup> primer set では、菌株 No.1、3、4の 結果は10施設すべてで一致した。その一方、 菌株 No.2 では、10 施設中 9 施設で 1-03 (742bp)をバンド「無」と判定したが、1施設は「有」と判定していた。

菌株 No.1 および 3 は、1.5kbp より大きいサイズにエキストラバンドが認められる株であるが、エキストラバンドの報告があった施設は 5 施設であった。菌株 No.2 の 1-2と 1-3 の間に存在するエキストラバンドを報告した施設は 8 施設、また 1-14 と 1-15 の間に存在するエキストラバンドの報告のあった施設は 7 施設であった (写真 2、表 2)。

 $2^{nd}$  primer set では、菌株 No.1~4 のいずれも、すべての施設で一致していた。一方、エキストラバンドの報告は施設によって異なっており、菌株 No.1、2、3 の 1.5kbp 付近にエキストラバンドが認められると報告した施設は 4 施設であった(写真 3、表 3)。

#### 3) MLVA 法

関東ブロック 10 施設で、共通菌株 5 株について MLVA を実施し、各領域のリピート数を比較した。その結果、リピート数が大きく外れていた施設は認められず、概ね一致した成績が得られた。

O157 菌株 No.1, 2, 3 および O26 菌株 No.5 に関しては、10 施設で同一の結果となった。その一方で、菌株 No.4 では、17 領域中 1 領域に複数のピークが認められることが 5 施設から報告された(表 4)。

各領域のピークの高さと PCR 産物の希釈 倍数を各施設に報告してもらい比較した。 菌株 1 と菌株 2 の主なピークの高さを表 5 に示した。いずれの菌株でも高いピーク値では 30,000 以上を示す施設がある一方、低いピーク値では 100 程度であった。この様に判定する際のピーク値の高さには施設間で違いが認められた。一般的に PCR 産物の希釈が高いほどピーク値は低い傾向が認められたが、いずれの菌株でもリピート数は

正しく判定されていた。

4) MLVA 法に関するアンケート

関東ブロック 11 施設を対象に、MLVA 法に供試するテンプレートの作製時の使用培地、遺伝子解析を行う上での DNA 抽出方法、PCR 産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。

供試菌株のテンプレートの作製時の使用 培地は、普通寒天培地が 4 施設、トリプト ソイ寒天培地が 1 施設、ミューラーヒント ンII 寒天培地が 1 施設、LB ブイヨンが 1 施 設、HI 寒天平板が 1 施設、TSB 培地が 1 施 設、そして CT-SMAC または非選択培地 (Mueller Hinton Agar など) が 1 施設であっ た。

DNA 抽出方法に関しては、アルカリ熱抽出を行っている施設が 6 施設、熱抽出による施設が 2 施設、市販のキットである InstaGene を用いている施設が 1 施設、コロニーダイレクトが 1 施設であった。

PCR 産物の希釈倍率は、10 倍が 1 施設、10 倍もしくは 20 倍が 1 施設、20 倍および40 倍が 1 施設、50 倍~100 倍が 4 施設、約100 倍が 1 施設、約300 倍が 1 施設となり、施設によりさまざまであった(表6)。

2. 疫学解析状況に関するアンケート結果 関東ブロック 11 施設を対象に、MLVA 法 による解析結果の活用に関してのアンケー ト調査を実施した。

保健所等へ MLVA 型を知らせる方法に関するアンケートでは、成績書を作成し報告との回答が 7 施設から得られ、このうち 2 施設は電話連絡も行っていた。また、それ以外に一覧表にまとめ随時還元している、MLVA 型の集積が見られた時にヒトの疫学

情報と合わせて報告、保健所との共通サーバに共有ファイルを入れているとの回答もあった。

MLVA 型を保健所等へ報告している場合の対象菌株についてのアンケートでは、収集した菌株は全て MLVA 型を報告しているとの回答が 7 施設と最多で、次に必要に応じて報告している施設が 3 施設、保健所等から依頼(問い合わせ)があった場合に報告との回答が 1 施設から得られた。

国立感染研から定期的に提供されるコンプレックス情報についての活用方法に関するアンケートでは、必要に応じて(一部の情報について)情報共有を図るとの回答が5施設から得られた一方で、特に情報提供はしていないという回答が3施設から得られた。また、一覧表にまとめて随時還元している、保健所との共有フォルダを利用しているとの回答もあった(表7)。

今後、取り組むべき課題について聞いたところ、3血清群以外はPFGEを実施していることや技術継承や結果判定における精度管理が必要、年に数回は集団事例等でPFGEを行う機会があること、担当者の手技によるところが大きく、平準化の必要性があるという理由から、MLVA以外にPFGEの精度管理も引き続き必要と考える施設が11施設全てから得られた(表 8)。

- 3. 腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症 の発生状況と分子疫学解析が有用であった 事例
- 1) 東京都で発生した腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症の発生状況

2020年に東京都内で分離されたヒト由来 の腸管出血性大腸菌は305株(2021年2月 現在)であった。血清群ごとの分離数は O157 が 203 株 (66.6%) と最も多く、次いでO26が18株(5.9%)、O103が16株(5.2%)等、合計 12 種類の O 血清群に分類されたが、血清型別不能となった菌株が 28 株 (9.2%) で認められた (表 9)。

食中毒と断定されたのは O157 が 1 事例、であった。O157 による食中毒事例はつけ物製造施設が原因であり、原因食品はキムチであった。O157 は VT1 および VT2 産生株で血清型が O157: H7 と典型的なものであった

## 2) 分子疫学解析が行政に活用された事例

2020年7月に東京都および名古屋市等で発生したのけ物製造施設で発生した腸管出血性大腸菌 O157による食中毒事例において、東京都では患者、漬物(キムチ)、調理従事者から O157が検出され、キムチおよび東京都と名古屋市の患者から分離したO157の MLVA パターンは一致したが、調理従事者から検出された MLVA パターンとは別なパターンを示した。このことから、本事例は調理従事者を介した感染事例ではなく、キムチに用いられていた食材が汚染されていた可能性が示唆され、MLVA 法が有効であった事例となった(表10)。

#### D. 考察

腸管出血性大腸菌やサルモネラによる食 中毒では、複数の自治体に患者が発生する 広域事例や、散在的集団発生が起きる可能 性が非常に高い。この様な事例では、分離株 の分子疫学解析が必須であり、各地方衛生 研究所で実施した検査結果をもとに食中毒 の断定を行うことも多い。

分子疫学解析手法としては、様々な方法 が報告されているが、これまで最も一般的 な方法は PFGE 法であった。分解能や再現 性が高く、多くの菌種に用いることができるという利点がある。一方、手技が煩雑で結果が出るまで時間を要することや、異なる機関で実施した成績を比較することが困難であるという欠点がある。

2018年6月、厚生労働省から事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」が発出され、腸管出血性大腸菌 O157、O26、O111を対象とした分子疫学解析手法は MLVA 法に統一することが明記された。全国で実施する分子疫学解析手法を統一し、国立感染研で付与される共通型番号で比較することになったことから、広域的に発生する Diffuse outbreak の探知をより迅速に行うことが可能となった。

令和 2 年度関東ブロックでは、共通菌株 5 株 (O157:4 株、O26:1 株) を用いて PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理を行った。 参加施設は関東ブロック 11 施設中 10 施設で、昨年度と比較すると 1 施設の増加であった。

PFGE 法はいずれの施設ともおおむねバンドの分離が良好で、比較しやすい写真が得られていた。しかし O26 に出現する細かいバンドの分離が不鮮明な施設や、染色ムラが認められた施設もあった。PFGE 法は腸管出血性大腸菌の分子疫学解析のみならず、サルモネラや毒素原性大腸菌、赤痢菌等広く用いることができる手法である。今後も精度管理等を通じて一定水準以上の技術の維持および技術の継承を続けていかなくてはならない。

IS 法は全体に良好な成績が得られたが、 菌株に特徴的なエキストラバンドの判定が 困難な施設も認められた。電気泳動の時間 が短いとバンドとバンドの間隔が狭くなっ てしまい、判定が困難になってしまう。できるだけ長く泳動しバンドとバンドの間を長くとることが重要である。

近年、IS 法による解析を実際の検体に用いることは非常に少なくなってきている。 今後も活用する機会は減少していくと考えられるが、分子疫学解析の1手法としてしばらくは維持していく必要はあると考えられた。

今回実施した MLVA 法の精度管理では、いずれの成績もほぼ一致したが、O157-37 領域では判定が異なる施設が認められた。すなわち、菌株 No.4 の O157-37 領域は複数のピークが出る株であったが、施設によって報告の仕方が異なっていた。しかし全ての施設がリピート数 3、7、15 に集約されており、大きく外れる結果は認められなかった。

各領域のピーク値の高さは施設ごとに異なっており、高いピーク値(30,000以上)が得られている施設と小さいピーク値(100程度)との差は非常に大きかった。今回の精度管理では、小さいピーク値でもリピート数は正確に判定されていた。しかしノイズとの区別が難しい場合もあることから、適切なピーク値(1000~10,000)になるように調整することも必要である。

MLVA 法は近年導入された新しい解析方法であるが、各施設、手技、入力等にも慣れ、安定した成績が得られるようになっていることが明らかとなった。

各自治体では、発生した散発事例や集団 事例を対象に分子疫学解析を実施しており、 行政対応へ活用された事例も数多く経験し ている。

近年、地方衛生研究所では担当者の異動 が頻繁に行われている。今後も PFGE 法や MLVA 法の検査精度を一定に保つための精 度管理が必要である。

#### E. 結論

今回実施した MLVA 法の精度管理では、いずれの成績もほぼ一致したが 1 菌株で判定が異なる施設が認められた。また、複数のピークが認められる株の判定は施設によって異なっていたが、いずれも大きく異なる判定ではなかった。しかし近年、地方衛生研究所では担当者の異動が頻繁に行われていることから、今後も PFGE 法や MLVA 法の検査精度を一定に保つための精度管理が重要である。

東京都で実施した O157 の 203 株を対象 とした MLVA および PFGE の比較結果から、 両解析法 どちらにおいても疫学調査と一致 しない解析結果が得られる場合があった。 菌株を対象とした分子疫学解析結果に加え、 保健所等における聞き取り調査も必要不可 欠である。

- F. 健康危険情報 なし
- G. 研究発表 なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1. 2020年度パルスネット研究班共通菌株

| No. | 菌株No.  | 血清型       | 毒素型     |
|-----|--------|-----------|---------|
| 1   | EH5664 | O157 : H7 | VT2     |
| 2   | EH5668 | O157: NM  | VT1+VT2 |
| 3   | EH5758 | O157 : H7 | VT2     |
| 4   | EH5890 | O157 : H7 | VT1+VT2 |
| 5   | EP2513 | O26 : H11 | VT1+VT2 |

No.1~4は2019年度と同じ菌株を配布

写真1a. 共通菌株のPFGE解析結果

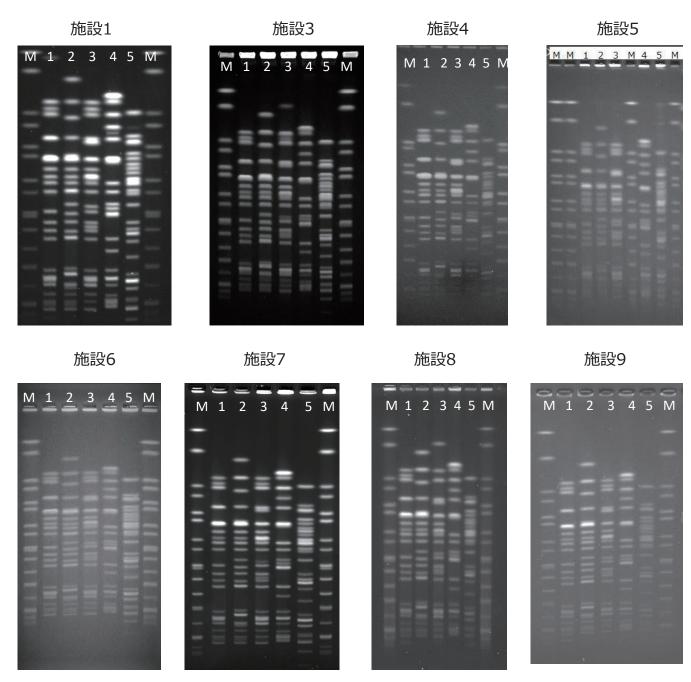
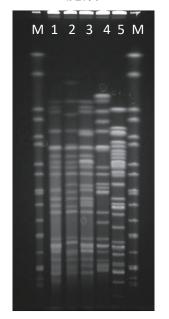


写真1b. 共通株のPFGE解析結果

施設10



施設11

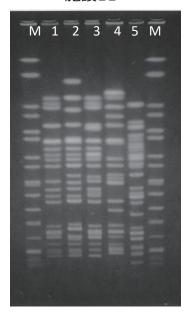
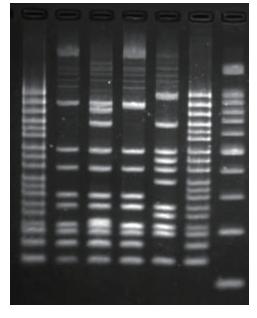


写真2. IS-printing System解析結果(1st primer set)

P 1 2 3 4 P M



**◆** 菌株1および3:1番目の上 5施設

★ 菌株2:2番目と3番目の間8施設

**◆** 菌株2:14番目と15番目の間 7施設

表2. 各施設で実施したIS-printing System 成績 (1st primer set)

|            |     | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16  | 17   | 18  |
|------------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|-----|
| Primer No. | 施設数 |     | 1-02 | 1-03 | 1-04 | 1-05 | 1-06 | 1-07 | 1-08 | 1-09 | 1-10 | 1-11 | 1-12 | 1-13 | 1-14 | 1-15 | eae | 1-16 | hly |
| Size(bp)   |     | 974 | 839  | 742  | 645  | 595  | 561  | 495  | 442  | 405  | 353  | 325  | 300  | 269  | 241  | 211  | 185 | 171  | 137 |
| 菌株1        | 10  | 0   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1   | 1    | 1   |
| 菌株2        | 9   | 0   | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1   | 1    | 1   |
| 菌株2        | 1   | 0   | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1   | 1    | 1   |
| 菌株3        | 10  | 0   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1   | 1    | 1   |
| 菌株4        | 10  | 1   | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1   | 0    | 1   |

写真3. IS-printing System解析結果 (2nd primer set)

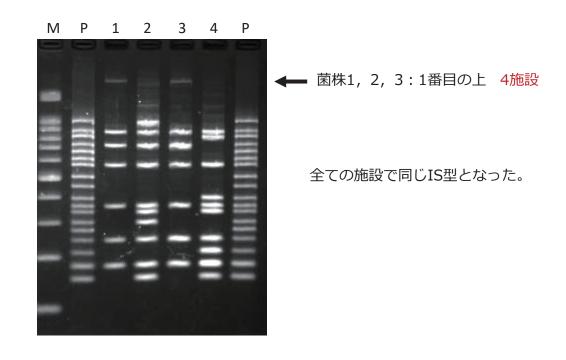


表3. 各施設で実施したIS-printing System 成績 (2<sup>nd</sup> primer set)

|            |     | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   |
|------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Primer No. | 施設数 | 2-01 | 2-02 | 2-03 | 2-04 | 2-05 | 2-06 | 2-07 | 2-08 | 2-09 | 2-10 | 2-11 | 2-12 | 2-13 | 2-14 | 2-15 | 2-16 | stx2 | stx1 |
| Size(bp)   |     | 987  | 861  | 801  | 710  | 642  | 599  | 555  | 499  | 449  | 394  | 358  | 331  | 301  | 278  | 240  | 211  | 181  | 151  |
| 菌株1        | 10  | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    |
| 菌株2        | 10  | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    |
| 菌株3        | 10  | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    |
| 菌株4        | 10  | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    |

表4. 共通菌株5株を用いたMLVAの標準化:主なリピート数

| No. | 血清型  | EH111<br>-11 | EH157<br>-12 | EHC<br>-1 | EHC<br>-2 | O157<br>-3 | O157<br>-34 | O157<br>-9 | O157<br>-25 | O157<br>-17 | O157<br>-19 | O157<br>-36 | O157<br>-37 | 施設数 |
|-----|------|--------------|--------------|-----------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| 1   | 0157 | 2            | 6            | 11        | 5         | 11         | 9           | 13         | 4           | 4           | 7           | 9           | 6           | 10  |
| 2   | 0157 | 2            | 4            | 5         | 5         | 18         | 10          | 9          | 2           | 12          | 7           | 4           | 7           | 10  |
| 3   | O157 | 2            | 6            | 11        | 5         | 11         | 9           | 12         | 4           | 4           | 7           | 9           | 6           | 10  |
| 4   | 0157 | 2            | 4            | 5         | 4         | 9          | 12          | 17         | 5           | 8           | 6           | 7           | 3           | 5   |
| 4   | 0157 | 2            | 4            | 5         | 4         | 9          | 12          | 17         | 5           | 8           | 6           | 7           | 15*         | 1   |
| 4   | 0157 | 2            | 4            | 5         | 4         | 9          | 12          | 17         | 5           | 8           | 6           | 7           | 3,15        | 3   |
| 4   | 0157 | 2            | 4            | 5         | 4         | 9          | 12          | 17         | 5           | 8           | 6           | 7           | 3,7,15      | 1   |
| 5   | O26  | 2            | 2            | 8         | 15        | -2         | 1           | 9          | 2           | -2          | 1           | -2          | -2          | 10  |

\*3,7にもピーク有り

# 表5. 各領域のピークの高さ

## 菌株No.1

| 施設 | 希釈倍数    | EH111<br>-11 | EH111<br>-8 | EH157<br>-12 | EHC-1 | EHC-2 | O157-3 | O157<br>-34 | O157-9 | O157<br>-25 | O157<br>-17 | O157<br>-19 | O157<br>-36 | O157<br>-37 |
|----|---------|--------------|-------------|--------------|-------|-------|--------|-------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1  | 10~20倍  | 14202        | 5453        | 11057        | 14867 | 23846 | 19455  | 6545        | 15862  | 8643        | 14402       | 16483       | 15080       | 8122        |
| 3  | 50~100倍 | 2548         | 4062        | 2853         | 5678  | 6546  | 5693   | 2925        | 3771   | 2596        | 2937        | 4019        | 4213        | 2228        |
| 4  | 20倍     | 7163         | 15193       | 12794        | 6391  | 21450 | 7999   | 11279       | 18740  | 3231        | 13552       | 8449        | 18529       | 5474        |
| 4  | 40倍     | 1468         | 2272        | 4132         | 1768  | 6402  | 3045   | 3194        | 5906   | 943         | 2540        | 1156        | 2591        | 1094        |
| 5  | 約10倍    | 12555        | 25955       | 25955        | 6237  | 32514 | 7921   | 17143       | 7312   | 32282       | 21559       | 5613        | 32507       | 32297       |
| 6  | 300倍    | 1062         | 118         | 2889         | 3189  | 5647  | 3888   | 583         | 154    | 1613        | 1470        | 2793        | 3776        | 1612        |
| 7  | 50~100倍 | 11932        | 9301        | 13952        | 13865 | 26356 | 21027  | 7838        | 9084   | 11316       | 14884       | 15004       | 19003       | 11915       |
| 8  | 50~100倍 | 23464        | 6883        | 6903         | 9987  | 14426 | 11642  | 7165        | 11505  | 5608        | 32649       | 32800       | 32830       | 23000       |
| 9  | 約100倍   | 4322         | 2627        | 6263         | 3841  | 6290  | 5573   | 5057        | 6358   | 4319        | 2072        | 1843        | 3265        | 4140        |
| 10 | 約500倍   | 2324         | 573         | 1558         | 1815  | 2187  | 2087   | 567         | 2416   | 903         | 3924        | 4893        | 5989        | 3192        |
| 11 | 100倍    | 1328         | 1895        | 2651         | 2728  | 4540  | 3823   | 2116        | 4398   | 1424        | 1826        | 2228        | 2329        | 1188        |

## 菌株No.2

|    | EH111 | EH111 | EH157 | EHC   | EHC   | O157  | O157- | O157  | O157  | O157  | O157  | O157  | O157  |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | -11   | -8    | -12   | -1    | -2    | -3    | 34    | -9    | -25   | -17   | -19   | -36   | -37   |
| 最大 | 14181 | 25750 | 18634 | 16610 | 31672 | 18580 | 14684 | 18775 | 32412 | 20560 | 17653 | 19878 | 32523 |
| 最小 | 653   | 156   | 2175  | 2208  | 3848  | 2480  | 455   | 144   | 1170  | 949   | 1660  | 1606  | 983   |

表6. MLVA法に関するアンケート

対象:10施設

1. テンプレート作製時の使用培地について 3. PCR産物の希釈倍率を教えて下さい。 教えて下さい。

| 培地              | 施設数 |
|-----------------|-----|
| 普通寒天培地          | 4   |
| トリプトソイ寒天培地      | 1   |
| ミューラーヒントンⅡ寒天培地  | 1   |
| LBブイヨン          | 1   |
| HI寒天平板          | 1   |
| TSB培地           | 1   |
| CT-SMACまたは非選択培地 | 1   |

| 希釈倍率     | 施設数 |
|----------|-----|
| 10倍      | 1   |
| 10または10倍 | 1   |
| 20および40倍 | 1   |
| 50~100倍  | 4   |
| 約100倍    | 1   |
| 約300倍    | 1   |
| 約500倍    | 1   |

2. DNA抽出方法を教えて下さい。

| DNA抽出方法   | 施設数 |
|-----------|-----|
| アルカリ熱抽出   | 6   |
| 熱抽出       | 2   |
| InstaGene | 1   |
| コロニーダイレクト | 1   |

## 表7. 疫学解析結果の活用方法に関するアンケート

- 1. 保健所等へMLVA型を知らせる方法について教えて下さい。
  - ・成績書を作成し報告 7施設(うち2施設は電話連絡も実施)
  - ・一覧表にまとめ随時還元
  - ・MLVA型の集積が見られた時にヒトの疫学情報と併せて報告
  - ・保健所との共通サーバに共有ファイルを入れている。
  - ・本庁が各保健所へ連絡している。

#### 2. MLVA型報告対象の菌株は?

| 報告方法           | 施設数 |
|----------------|-----|
| 収集した菌株は全て報告    | 7   |
| 必要に応じて報告       | 3   |
| 問い合わせがあった場合に報告 | 1   |

## 3. コンプレックス情報の還元方法は?

| 報告方法                                  | 施設数 |
|---------------------------------------|-----|
| 必要に応じてメールをそのまま転送<br>あるいは一部の内容について情報提供 | 5   |
| 一覧表にまとめて随時還元                          | 1   |
| 保健所との共有フォルダを利用                        | 1   |
| 本庁が各保健所へ情報を還元                         | 1   |
| 特に情報提供はしていない                          | 3   |

## 表8. 分子疫学解析を実施する上での課題について

- 1. 今後、分子疫学解析を実施する上での課題はありますか?
  - ・広域散発を早期に探知するためのネットワークの構築
  - ・PFGE法の精度管理
    - ・O157、O26、O111以外EHECあるいは他の菌種ではPFGEを用いるため。
    - ・結果が担当者の手技によるところが大きく、平準化の必要性があるため。
    - ・技術伝承には精度管理が必要。
  - ・MLVAの実践と情報共有の場
  - ・次世代シーケンサーに関する細菌分野での解析への利用方法の検討。

表9. 東京都で分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌(2020年)

| 血清群  | 菌株数 | (%)    | 血清群  | 菌株数 | (%)   |
|------|-----|--------|------|-----|-------|
| 0157 | 203 | (66.6) | 0146 | 4   | (1.3) |
| 026  | 18  | (5.9)  | 0145 | 3   | (1.0) |
| 0103 | 16  | (5.2)  | O55  | 1   | (0.3) |
| 0121 | 11  | (3.6)  | 0115 | 1   | (0.3) |
| 0111 | 8   | (2.6)  | 0124 | 1   | (0.3) |
| 091  | 6   | (2.0)  | OUT  | 28  | (9.2) |
| 0128 | 5   | (1.6)  | 合計   | 305 |       |

表10. 分子疫学解析が行政に活用された事例

つけ物製造施設で発生した腸管出血性大腸菌O157による食中毒事例(東京都)

利用日 : 2020年7月2~4日 (インターネット購入を含む)

菌検出者数:3名(患者),1名(調理従事者)

原因食品 : 白菜キムチ

原因菌 : O157:H7 (VT1+VT2産生)

## 1. 事例の探知

7月10日M区保健所に1名の腸管出血性大腸菌感染症発生届が提出された。 患者は別の区にある施設で製造、販売されたキムチを7月2日から4日にかけて喫食していた。 (第1グループ)

## 2. 発生状況

| グループ       | 1               | 2                      | 3                          | 4              |
|------------|-----------------|------------------------|----------------------------|----------------|
| キムチ<br>購入日 | 7月1日友人が購入 患者へ譲渡 | 7月3日                   | インター <sup>2</sup><br>(7月2日 | ネット購入<br>∃,3日) |
| 喫食日        | 7月2日~4日         | 7月3日昼食および夕食            | 7月4日                       | 7月3日~4日        |
| 喫食者数       | 1名              | 4名(同居の家族3名<br>および別居の母) | 3名                         | 3名             |
| 発症日        | 7月6日            | 7月4日~7日                | 7月6日~7日                    | 7月7日~9日        |
| 発症者数       | 1名              | 3名                     | 3名                         | 3名             |
| O157検出者    | 1名              | 1名(別居の母)               | 1名                         | 無              |
| 居住地        | 東京都             | 東京都                    | 名古屋市                       | 埼玉県            |

## 3. 疫学解析結果

患者由来株2株(東京都分離株および名古屋市分離株) グループ2に残っていた白菜キムチ分離株



MLVA型が一致 食中毒と断定された

調理従事者由来株とはMLVA型は異なっていた。