

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 分担研究報告書
 中四国ブロックにおける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

研究分担者	狩屋 英明	岡山県環境保健センター
研究協力者	山根 拓也	鳥取県衛生環境研究所
	林 宏樹	島根県保健環境科学研究所
	三瀬 博也	岡山市保健所衛生検査センター
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	青田 達明	広島市衛生研究所
	尾羽根 紀子	山口県環境保健センター
	佐藤 豪	徳島県立保健製薬環境センター
	関 和美	香川県環境保健研究センター
	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	氏家 絢子	〃
	矢儀田 優佳	〃
	影山 温子	高知県衛生環境研究所
	尾崎 早矢香	〃
	河合 央博	岡山県環境保健センター
	岡田 達郎	〃
	中嶋 洋	〃

研究要旨

食品由来感染症の広域事例発生時には、症例間の関連性を明らかにするため、各症例由来株の分子疫学解析結果等を各自治体が共有し、病原体分離株の比較・解析を行うことが感染源特定や拡大防止のために有用である。そのためには、地方衛生研究所(地衛研)における病原体分離株の分子疫学解析手法の解析精度・解析能力の向上による精度管理体制の維持・強化が不可欠である。そこで、中四国ブロック内の地衛研を対象に、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 菌株を用いた IS-printing System、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) 及び multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA 法) による精度管理を実施した。その結果、一部の地衛研を除いて、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では技術の改善や工夫、検査結果の適正な点検が必要と思われた。また、MLVA 法については、近年、MLVA 法を導入する地衛研が増加しており、中四国ブロックにおける検査精度管理体制の強化のためには、MLVA 法で解析を行う地衛研に対して、本研究成果に基づく継続的な技術的支援が、必要であると考えられた。

令和2年度に中四国ブロックで発生した EHEC による感染事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し、食品保健総合情報処理システム (NESFD) の全国の MLVA 情報も参考としながら比較調査した。その結果、同一の MLVA 型の EHEC 菌株による感染事例が中四国ブロックを含む全国の複数の自治体で確認されたが、中四国ブロック内では同一汚染源による腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかった。

本研究によって EHEC 分子疫学解析手法である IS-printing System、PFGE 法、MLVA 法による中四国ブロックの地衛研のサーベイランス技術水準の向上に貢献したものと考える。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域的事例が発生した場合、事例や症例間の関連性を明らかにするためには、分離株の分子疫学解析結果の比較・解析が有用であり、適切に解析を行うには、検査技術の維持と解析能力・解析精度の向上が不可欠かつ重要である。このため、中四国ブロックで各種解析手法の精度管理を実施した。令和元年度に引き続き令和2年度も IS-printing System（以下、IS-PS と言う）、パルスフィールドゲル電気泳動法（以下、PFGE 法と言う）、multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis（以下、MLVA 法と言う）について、腸管出血性大腸菌（以下、EHEC と言う）O157 株を用いた精度管理を実施するとともに、検査手法の問題点や改善点の洗い出しなどを行うことにより解析技術の問題点等を考察した。また、ブロック内での EHEC 発生事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し、NESFD の全国の MLVA 情報も参考としながら、関連性や流行株等を調査し考察した。

B. 研究方法

1. 使用菌株（表 1）

精度管理：ヒト患者等由来 EHEC O157 菌株番号 1, 2, 3, 4 の計 4 株を使用した。

EHEC 感染事例調査：NESFD の全国の MLVA 情報と令和2年4月から令和3年1月までに中四国の地衛研で実施した IS-PS、PFGE、MLVA 法の結果を含む疫学情報を収集し、比較調査を行った。

2. 分子疫学解析法及び精度管理

(1) IS-PS

IS-PS (Version2:TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。本法の各プライマーにより増幅される産物は、プライマーセット (1st set 及び 2nd set primer) 毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット (Api) の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、

その数字を区分毎に足してコード化し（以下、IS コードと言う）、解析を行った。

(2) PFGE 法

PFGE 法は感染研ニュープロトコール（詳細は平成18年度の本報告書に準じた）に従って実施し、画像解析ソフト (BioNumerics) を使用して泳動像の解析を行った。

(3) MLVA 法及び型別

MLVA 法は、実施可能な 9 施設で、それぞれの施設のプロトコールにより実施した。菌株 3 の領域 EHC-5 はリピート数 8 と 9 のダブルピークが出現し、リピート数 8 でピークがより高い株を使用した。

(4) 精度管理

令和2年度は 9 施設 ((A) ~ (K), (A) 及び(D)を除く) が参加し、精度管理用の EHEC 菌株 4 株(表 1)を各施設に送付して、解析を行った。IS-PS は 8 施設 ((B) ~ (K), (D) 及び(F)を除く)、PFGE 法は 8 施設 ((C) ~ (K), (D)を除く)、MLVA 法は 9 施設 ((B) ~ (K), (D)を除く) で実施した。IS-PS は、各 primer set の増幅産物の有無から作成した IS コード及び泳動像を、PFGE 法は、泳動像と解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを回収し、解析した。また、MLVA 法は 17 遺伝子座のリピート数を比較解析した。

3. 疫学情報の収集と調査

中四国地域で発生した EHEC 感染事例について、患者等由来株の IS-PS や MLVA 法による解析結果又は PFGE 結果を疫学情報とともに収集し、NESFD の全国の MLVA 情報も参考として比較・調査した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) IS-PS による解析

IS-PS の精度管理は、8 施設が参加して実施した。各施設の IS コードによる解析結果は表 2 に、泳動像は図 1 に示した。いずれの施設も適正にバンドが認識できており、概ね良好であった。IS コードは多くの施設が一致したが、1 施設 (I) では菌株 4 で 1st Primer set の 1-13、1-14、1-15 の集計にミスがあり、IS コードの

判定に違いが見られた。

(2) PFGE 法による解析

PFGE 法の精度管理は、8 施設が参加して実施し、参加した全施設でデンドログラム解析を実施した。各施設の泳動像とデンドログラム解析結果は、図 2 に示し、結果をまとめたものを表 3 に示した。ほとんどの施設でおおむね良好な泳動像が得られた。

また、デンドログラム解析では、類似度の最大値は 100%、最小値は 72%であった。菌株 1 と 2 の類似度は、全施設が類似度 100% で一致していた。菌株 3 と 4 で類似度の順序が施設により異なっていた。

(3) MLVA 法による解析

MLVA 法は 9 施設で実施した。9 施設全て 0157 株の 17 か所の遺伝子座についてリピート数を解析した。その結果を、表 4 に示した。施設 J では各菌株の遺伝子座 0157-3 及び 0157-36 で他施設とは 1 リピートずつ異なる結果となった。菌株 3 では解析領域 EHC-5 はリピート数 8 と 9 のダブルピークが出現する株を使用したが、どの施設も正確にダブルピークを検出していた。

2. EHEC 感染事例の疫学情報の収集と調査結果

NESFD の全国の MLVA 情報と中四国の地衛研で実施した IS-PS、PFGE、MLVA 法の結果を含む疫学情報を収集し、比較調査を行った。

その結果（中四国の状況を表 5、表 6、表 7、表 8、表 9、図 3 に示す）、中四国ブロック内では同一汚染源による広域的な腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかった。しかし、同一の MLVA 型及び同一の MLVA complex の株が、中四国ブロック内及び他の複数の自治体で検出される事例も多く見られた。また、中四国ブロック内のある自治体では EHEC 届出数が令和 2 年 12 月末時点で 100 を超えていた。これは、令和 2 年 8 月から 10 月にかけて当該自治体で 22 名の 0157VT1,2 の MLVA 遺伝子型 20m0245 (20c038) を原因とする腸管出血性大腸菌感染症の多発が要因として考え

られたが、感染源は不明であった。さらに、症例多発時と同時期に、中四国以外の 3 自治体計 3 名に同じ遺伝子型菌による事例が見られた。中四国ブロックでは同一 IS コードだが MLVA 型が違う事例、同一 MLVA 型だが IS コードが違う事例も見られた。

D. 考 察

令和 2 年度に実施した IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による EHEC 0157 株を用いた精度管理では、一部の施設を除いて、多くの施設で解析結果は良好であった。一部の施設では他施設と異なる結果となり、技術の改善及び工夫が必要と思われた。中四国ブロック全体では、地衛研内での人事異動もあり、解析技術や解析精度の維持、向上が継続的に必要であると思われた。IS-PS では、IS コードは多くの施設が一致したが、1 施設 (I) では菌株 4 で 1st Primer set の 1-13、1-14、1-15 の集計の単純ミスによって、IS コードの判定に違いが見られたものと考えられた。PFGE 法はほとんどの施設でおおむね良好な泳動像が得られ、操作手技等の技術の習熟が進展しているものと考えられた。MLVA 法について、施設 J では各菌株の遺伝子座 0157-3 及び 0157-36 で他施設とは異なる結果となった。この原因について検討した結果、フラグメント解析の最適化のため通常のプライマーに数塩基を付加した Tailed Primer を使用しており、増幅産物がわずかに大きくなり、Tailed Primer を使用したという認識が不足していたことが原因ではないかと考えられた。菌株 3 の解析領域 EHC-5 はリピート数 8 と 9 のダブルピークが出現することを事前に確認していたが、どの施設も正確にダブルピークを検出していた。正確な検査のために、Bin の見直しや設定は適宜行い、適切に解析できる体制を維持・整備しておくことが重要であると考えられた。全国的な MLVA 法の導入に係る通知に基づいて、各地衛研でも導入が更に進んでいるが、MLVA 法の導入に関しては十分な研修、準備が必要であり、今後の導入時や

担当者の異動時に当たっては技術的支援や、導入後の精度管理の重要性が示された。

中四国ブロックで本年度発生した EHEC による感染事例における患者等由来株の IS-PS や MLVA 法による解析結果又は PFGE 結果を疫学情報とともに収集し、また、NESFD の全国の MLVA 情報も参考として比較調査を行った。その結果、同一の MLVA 型及び MLVAcomplex の株が、中四国ブロック内の複数の自治体で検出される事例も多く見られた。しかし、中四国ブロック内では共通の汚染源による広域的な腸管出血性大腸菌食中毒の発生はなかった。

IS コードが同じであっても MLVA 型が異なる事例や IS コードが異なっても MLVA 型が同じ事例もあった。これは IS-PS 法の鑑別能が MLVA よりも劣ることによるものと考えられる。同じ MLVA 型菌が検出されたものの、その疫学的関連性の不明な事例も多くみられた。以上のことから、集団事例の探知や感染源の特定のためには、MLVA 法等による病原体の解析のみでは、同一感染源による集団事例であるとの結論を出すには十分と言えず、患者等の喫食調査・行動調査等の疫学調査結果も十分検討した総合的判断が重要と思われた。

E. 結論

1. 腸管出血性大腸菌 0157 株を用いて、IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。PFGE 法では、参加したほとんどの施設では概ね良好な結果が得られたが、IS-PS 及び MLVA 法では一部の施設で結果が異なった。

2. IS-PS では、IS コードは多くの施設が一致したが、1 施設で集計の単純ミスによって、IS コードの判定に違いが見られたものと考えられた。

3. MLVA 法は、複数の遺伝子座で結果が他施設と異なる施設があり、この施設では、Tailed Primer を使用しており、遺伝子増幅産物が通常のプライマー使用時よりわずかに大きくなり、Tailed Primer を使用していたという認識不足が、その要因

と考えられた。MLVA 法導入に関して十分な研修、準備、技術的支援や導入後の精度管理の必要性が認められた。

4. 集団事例の探知やその感染源の特定のためには、病原体のゲノム解析のみならず、患者等の喫食調査・行動調査等の疫学調査結果も十分検討した総合的判断が重要と思われた。

F. 研究発表

なし。

表 1 精度管理使用 EHEC 菌株

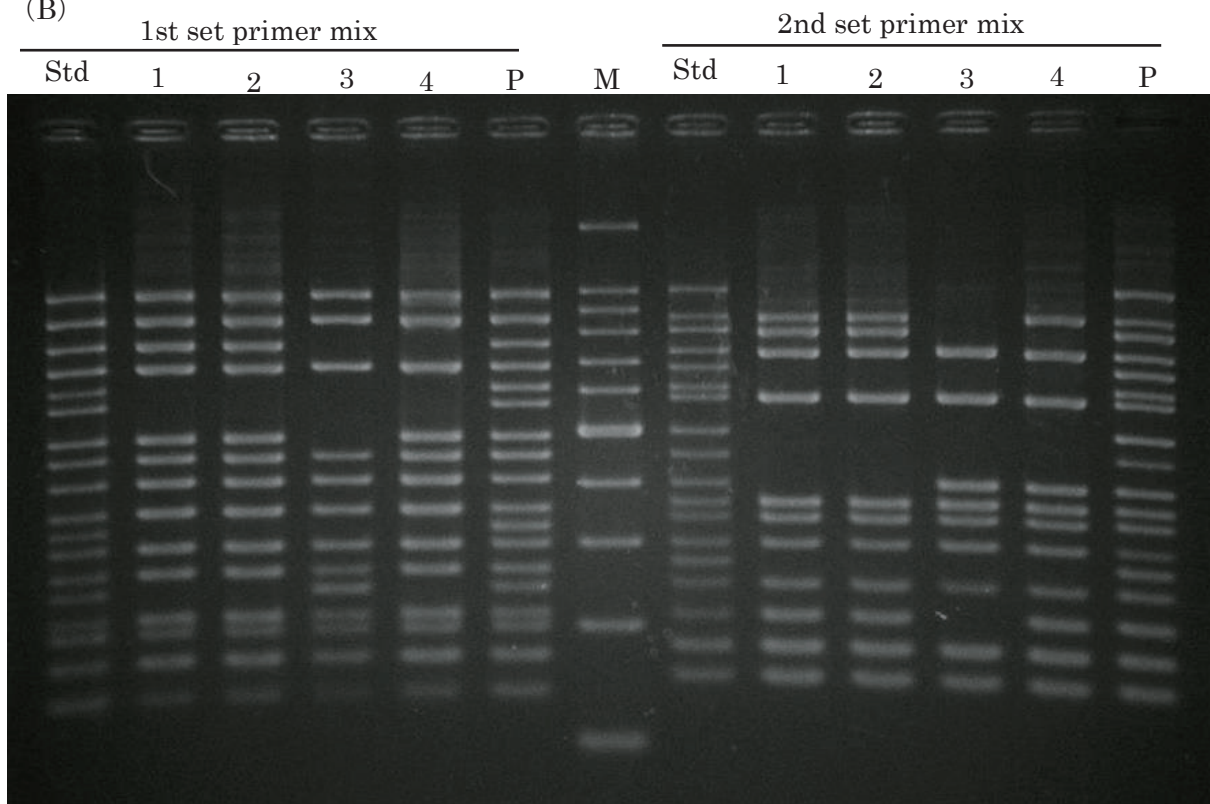
菌株 No.	血清型			由来
	O群	H型	STx型	
1	O157	7	1,2	2019 健康保菌者
2	O157	7	1,2	2019 患者
3	O157	7	1,2	2019 患者
4	O157	7	1,2	2020 患者

表 2 IS-PS による解析結果

施設名	菌株1		菌株2		菌株3		菌株4	
	1st Primer set	2nd Primer set	1st Primer set	2nd Primer set	1st Primer set	2nd Primer set	1st Primer set	2nd Primer set
A	-	-	-	-	-	-	-	-
B	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
C	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
D	-	-	-	-	-	-	-	-
E	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
F	-	-	-	-	-	-	-	-
G	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
H	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
I	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317577	211757
J	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757
K	717557	611657	717557	611657	316577	011756	317557	211757

図 1 IS-PS 泳動像

(B)

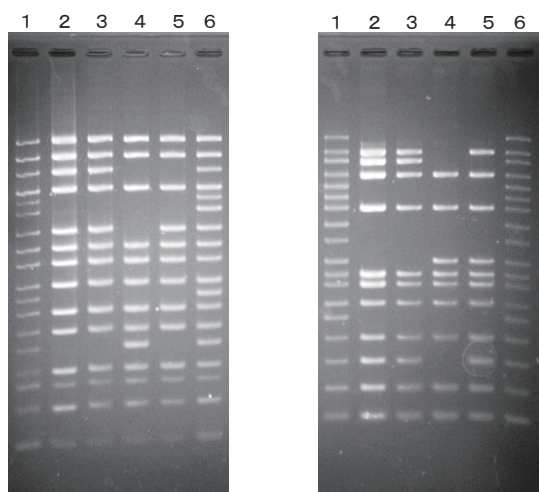


Std:Standard DNA, P:Template Mix, M:DNA marker
 1:STEC 1, 2:STEC 2, 3:STEC 3, 4:STEC 4

(C)

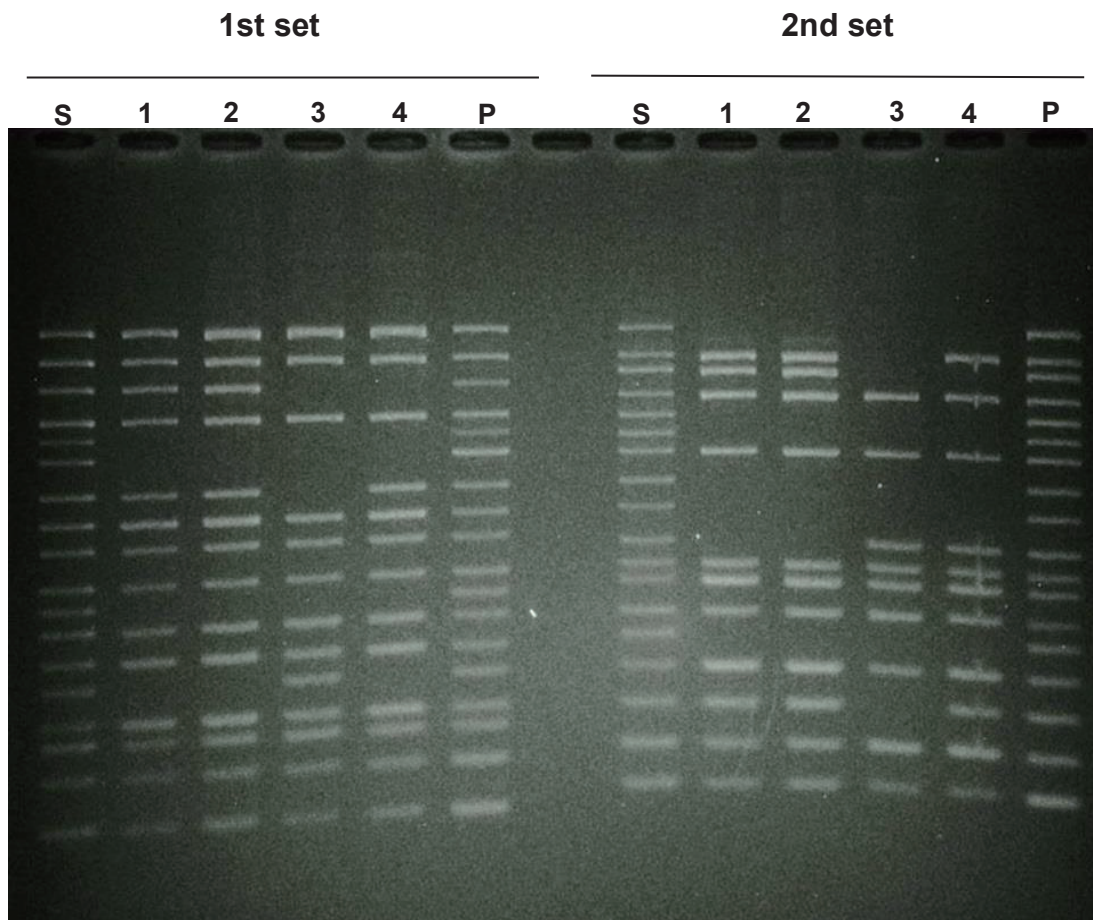
1st Primer Set

2nd Primer Set



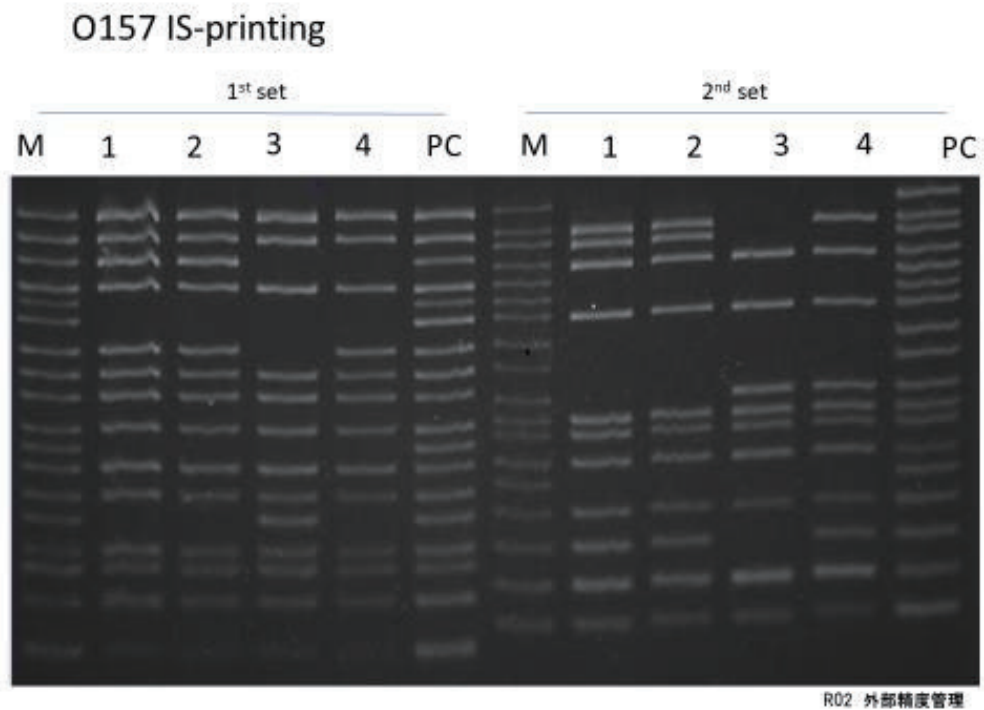
レーン
 1 Standard
 2 STEC1
 3 STEC2
 4 STEC3
 5 STEC4
 6 P.C.

(E)

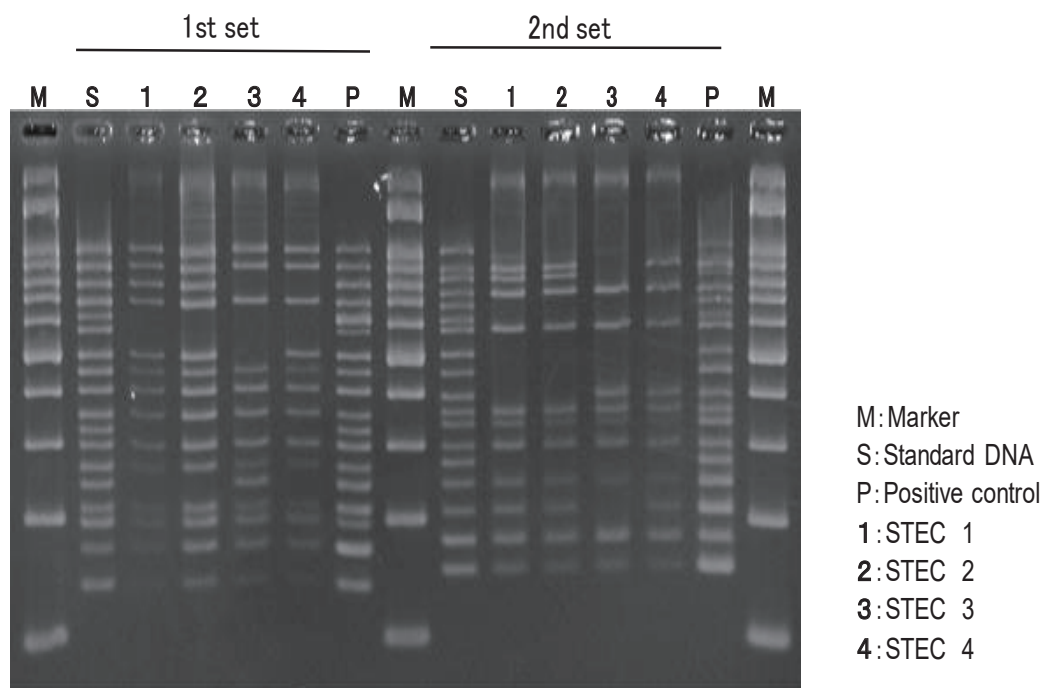


S : Standard DNA
1 : STEC1
2 : STEC2
3 : STEC3
4 : STEC4
P : PCR Template Mix

(G)

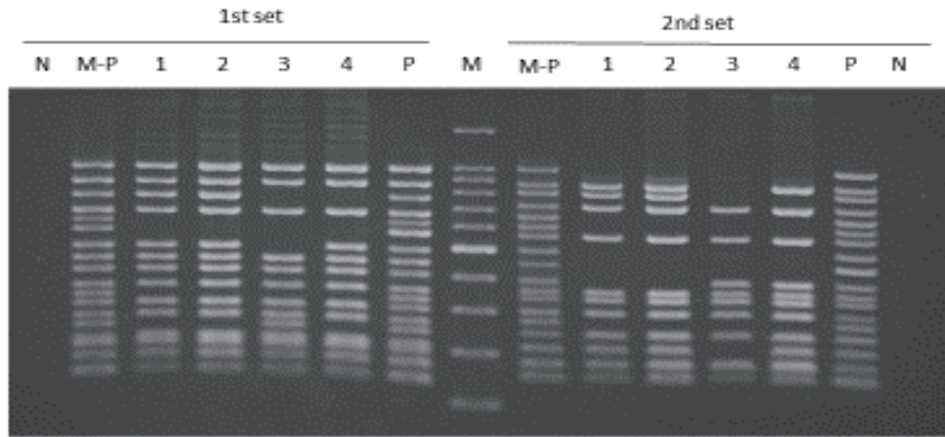


(I)



(J)

IS-printing泳動写真

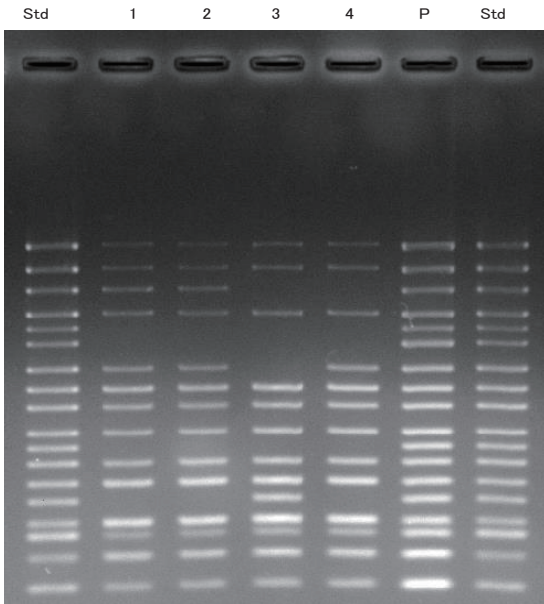


1 : STEC1
2 : STEC2
3 : STEC3
4 : STEC4

P: positive control
N: negative control (DW)
M-P: 1st/2nd marker
M: 100bp ladder marker

(K)

1st set



Std :Standard DNA
1 :STEC1
2 :STEC2
3 :STEC3
4 :STEC4
P :Positive control

2nd set

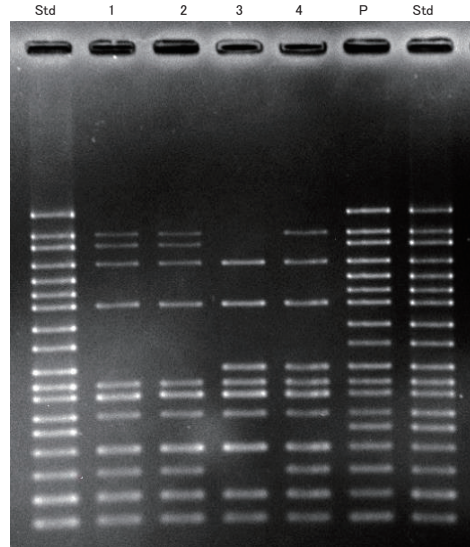
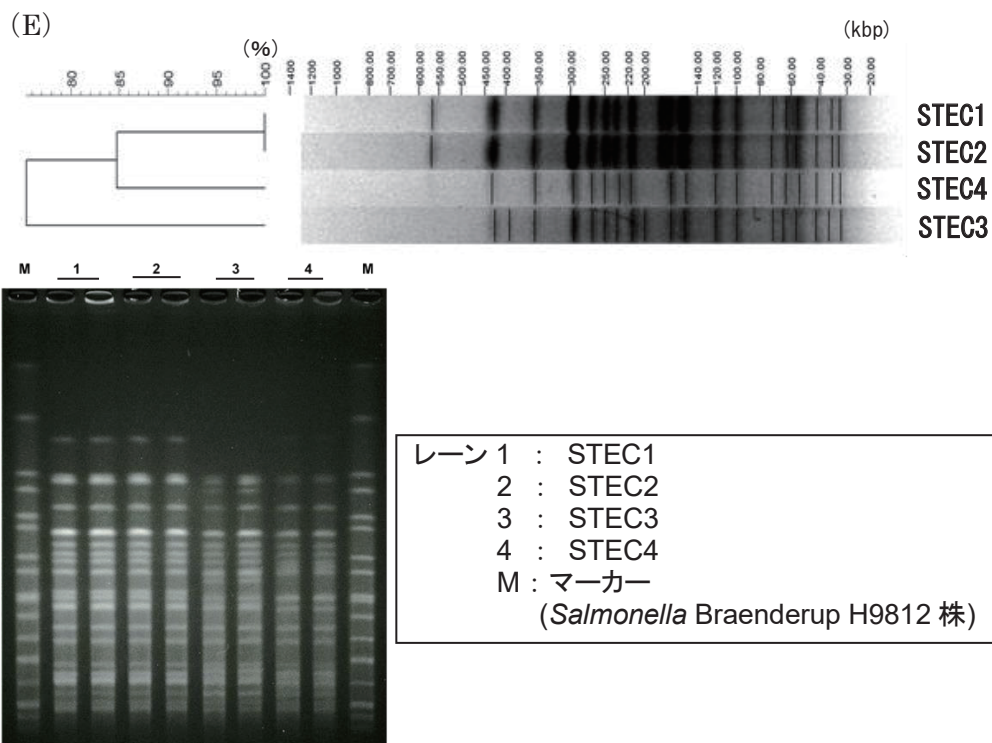
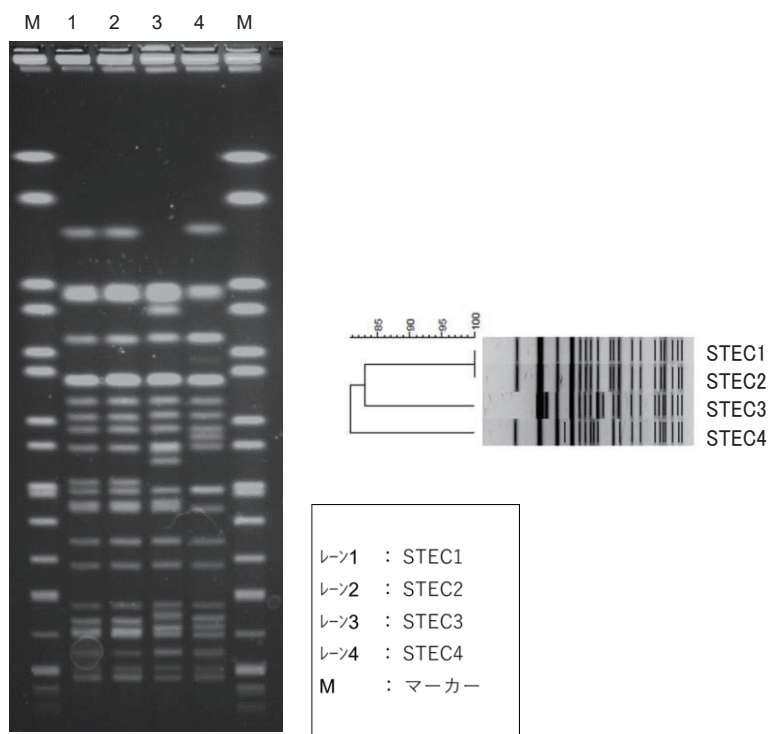
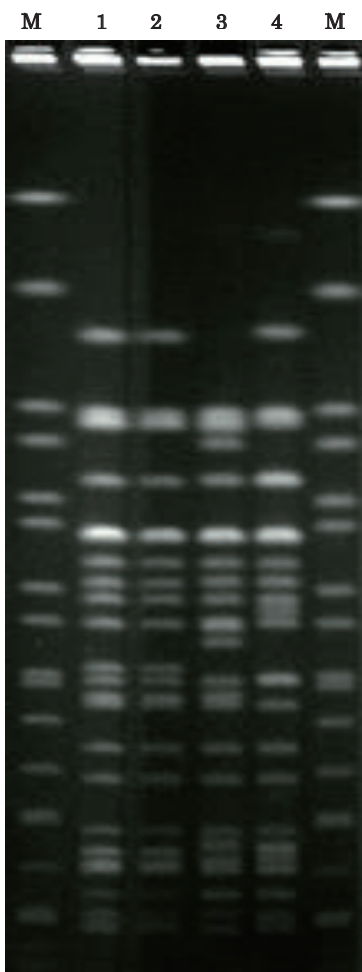


図2 PFGE法による泳動像とデンドログラム解析結果
(C)



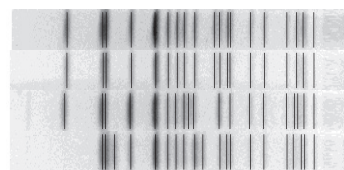
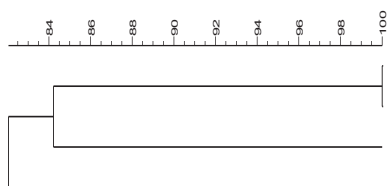
(F)



1 : STEC1
 2 : STEC2
 3 : STEC3
 4 : STEC4
 M : Marker

PFGE-XbaI

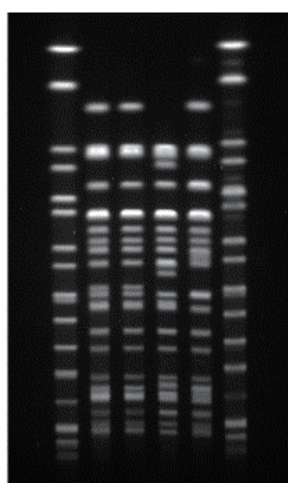
PFGE-XbaI



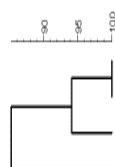
STEC1
 STEC2
 STEC4
 STEC3

(G)

PFGE(Xba1)



デンドログラム(UPGMA法、係数;Dice)

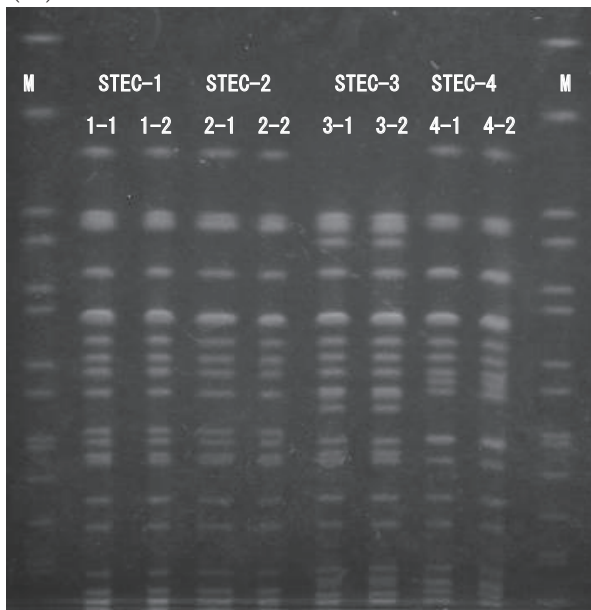


STEC1
 STEC2
 STEC4
 STEC3

R02 外部精度管理

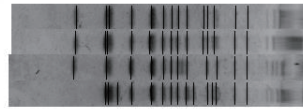
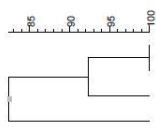
R02 外部精度管理

(H)



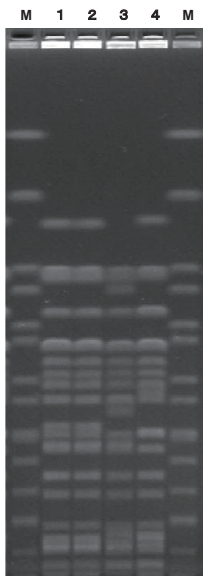
E.coli PFGE

E.coli PFGE

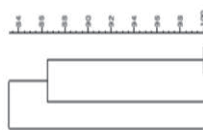


2020PulseNet STEC2-1
2020PulseNet STEC1-1
2020PulseNet STEC4-1
2020PulseNet STEC3-1

(I)



M: Marker (S. Braenderup)
1: STEC 1
2: STEC 2
3: STEC 3
4: STEC 4

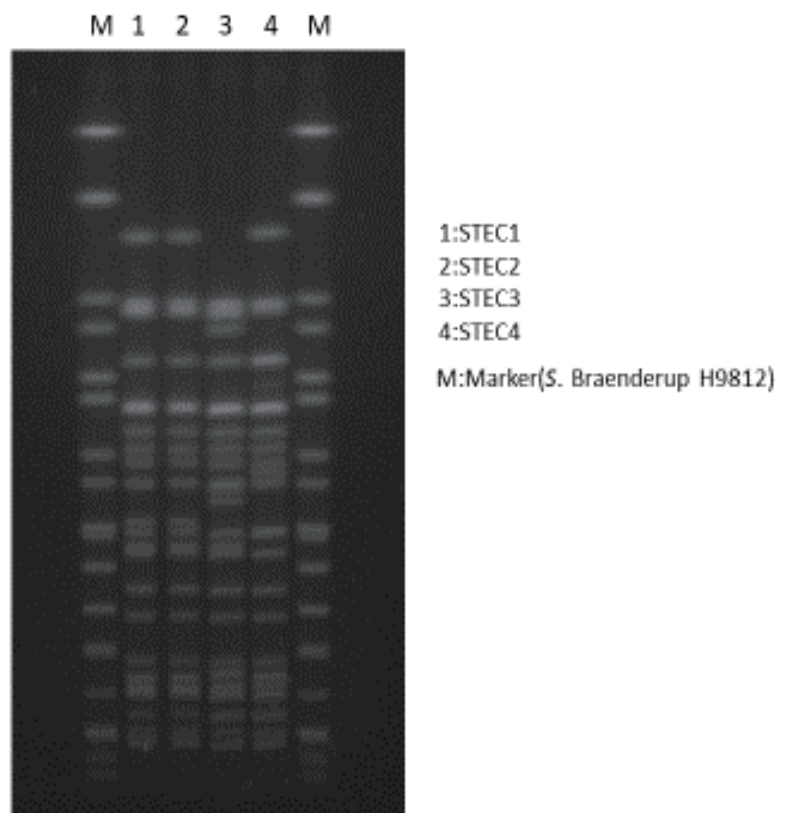


STEC1
STEC2
STEC4
STEC3

(J)



PFGE泳動写真



(K)

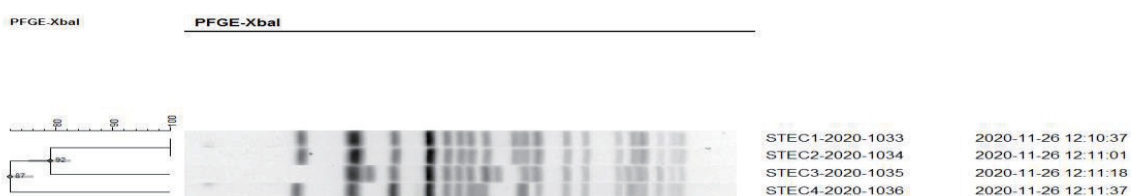
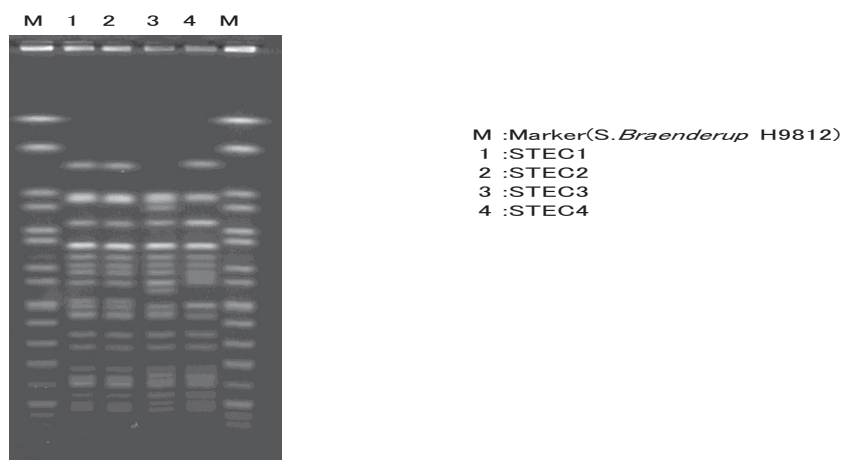


表3 PFGE法によりデンドログラム解析結果

施設名	デンドログラム解析結果
(A)	PFGE実施せず
(B)	PFGE実施せず
(C)	菌株1=菌株2－菌株3⇒>菌株4(100－80%)
(D)	PFGE実施せず
(E)	菌株1=菌株2－菌株4⇒>菌株3(100－76%)
(F)	菌株1=菌株2－菌株4⇒>菌株3(100－82%)
(G)	菌株1=菌株2－菌株4⇒>菌株3(100－85%)
(H)	菌株1=菌株2－菌株4⇒>菌株3(100－82%)
(I)	菌株1=菌株2－菌株4⇒>菌株3(100－83%)
(J)	菌株1=菌株2－菌株3⇒>菌株4(100－87%)
(K)	菌株1=菌株2－菌株3⇒>菌株4(100－72%)

= :左右の菌株で100%一致
 - :左右の菌株でグループ形成
 ⇒> :矢印の方向へ類似度が低くなる

表4 MLVA法による解析結果

菌株	施設名	遺伝子座																
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH187-12	EH28-7	EHO-1	EHO-2	EHO-5	EHO-8	O187-3	O187-34	O187-9	O187-25	O187-17	O187-19	O187-36	O187-37
STEC1	B	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	O	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	E	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	F	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	G	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	H	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	I	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	J	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	11	12	12	8	8	7	4	8
	K	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
	B	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8
O	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8	
E	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8	
F	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8	
G	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8	
H	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8	
I	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8	
J	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	11	12	12	8	8	7	4	8	
K	2	-2	1	4	-2	5	4	9	-2	10	12	12	8	8	7	3	8	
B	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
C	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
E	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
F	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
G	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
H	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
I	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
J	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	11	12	7	5	11	5	6	7	
K	2	-2	1	4	-2	7	4	8*	-2	10	12	7	5	11	5	5	7	
B	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	
C	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	
E	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	
F	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	
G	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	
H	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	
I	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	
J	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	11	12	10	5	7	6	8	7	
K	2	-2	1	4	-2	6	4	2	9	10	12	10	5	7	6	7	7	

* リポート数「9」にもピークがあったが、「8」のピークが高い

表5

施設F

県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	VT型	感疫研 PFGE型	感疫研 MLVA型	感疫研 MLVA complex	備考(疫学的関連など)
F	20008	6月	O ₆ H ₂₅	H ₂₅	1	解析済			
F	20009	6月	111	H-	1・2		20m3009		
F	20010	6月	157	7	1・2		16m0034		
F	20015	6月	103	2	1		16m4003	20c401	菌株No.20017の家族内事例
F	20016	6月	103	2	1		16m4003	20c401	菌株No.20017の家族内事例
F	20017	6月	103	2	1		16m4003	20c401	家族内事例
F	20018	6月	157	7	1・2		20m0047	20c003	
F	20020	7月	26	11	1		13m2015	20c203	菌株No.20017の家族内事例
F	20033	8月	26	11	1		20m2064	20c204	菌株No.20035の家族内事例
F	20034	8月	26	11	1		20m2065	20c204	菌株No.20035の家族内事例
F	20035	8月	26	11	1		20m2040	20c204	家族内事例
F	20039	9月	157	7	2		20m0041	20c020	
F	20040	9月	121	19	2		20m5009		
F	20041	10月	26	11	1		20m2126		菌株No.20042の家族内事例
F	20042	10月	26	11	1		20m2126		家族内事例
F	20043	10月	103	11	1		20m4035		
F	20048	9月	128	H ₂	1・2	解析中			
F	20049	11月	121	19	2		20m5015		
F	20050	11月	128	45	2	解析中			
F	20051	12月	1	20	1	解析中			
F	21001	1月	103	2	1	未送付	未送付	未送付	

表6

施設G

県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	VT型	ISコード(1st)	ISコード(2nd)	感染研 PFGE型	感染研 MLVA型	感染研 MLVA complex	備考(疫学的関連など)
G	20Y01	3月	0128	H2	1			解析済み			
G	20Y02	5月	0157	H7	1+2	015457	311656		20m0048		
G	20Y03	5月	026	H11	1				15m2067		
G	20Y04	6月	0157	H7	2	305457	211642		20m0058		家族
G	20Y05	6月	0157	H7	2	305457	211642		20m0058		
G	20Y06	6月	026	H11	1				20m2039		20Y09と家族
G	20Y07	6月	0157	H7	2	305457	211642		20m0058		
G	20Y08	6月	026	H11	1				20m2039		20Y15と家族
G	20Y09	6月	026	H11	1				20m2039		20Y06家族
G	20Y10	5月	026	H11	1				20m2046		20Y14と家族
G	20Y11	6月	026	H11	1				19m2117		
G	20Y12	6月	026	H11	1				20m2039		
G	20Y13	6月	026	H11	1				20m2039		
G	20Y14	6月	026	H11	1				20m2046		20Y10と家族
G	20Y15	6月	026	H11	1				20m2039		20Y08と家族
G	20Y16	6月	026	H11	1				13m2027		
G	20Y17	6月	026	H11	1				20m2052		
G	20Y18	7月	0157	H7	2	145047	301443		20m0167		
G	20Y19	7月	0g172	H25	2			解析済み			
G	20Y20	7月	0157	H7	1+2	317577	211756		20m0180		家族
G	20Y21	7月	0157	H7	1+2	317577	211756		20m0180		
G	20Y22	7月	0157	H7	1+2	317577	211756		20m0180		
G	20Y23	8月	0157	H7	1+2	317157	211756		20m0230		20Y27の家族
G	20Y24	8月	0157	H7	1+2	013057	214447		20m0228		同居家族
G	20Y25	9月	0157	H7	1+2	013057	214447		20m0228		
G	20Y26	9月	0157	H7	1+2	217577	211547		20m0229		
G	20Y27	8月	0157	H7	1+2	317157	211756		20m0230		20Y23と家族
G	20Y28	8月	0157	H7	1+2	011057	310047		20m0207	20c026	
G	20Y29	8月	0157	H7	1+2	317577	211757		17m0160		
G	20Y30	8月	0157	H7	1+2	215457	311656		17m0487		
G	20Y31	8月	0157	H7	1+2	317577	211756		16m0093		
G	20Y32	10月	0115	H25	2			解析済み			
G	20Y33	10月	0103	H2	1				20m4032		
G	20Y34	10月	026	H11	1				20m2111		
G	20Y35	11月	091	H14	1+2				20m8012		

表 7

施設 H

(R2年度)STEC事例

県名	菌株No	発生月	分類	年代	O型	H型	VT型	感染研MLVA型	備考
H	1	2020年5月	患者	80歳代	121	19	2	18m5007	
H	2	2020年6月	患者	40歳代	156	-	1		
H	3	2020年7月	患者	30歳代	157	7	1,2	20m0184	
H	4	2020年8月	患者	70歳代	157	7	1,2	18m0297	
H	5	2020年8月	接触者	60歳代	157	7	1,2	18m0297	
H	6	2020年8月	接触者	40歳代	157	7	1,2	18m0297	
H	7	2020年8月	患者	10歳代	157	7	1,2	17m0160	
H	8	2020年8月	患者	20歳代	157	7	1,2	20m0233	
H	9	2020年8月	患者	40歳代	157	7	1,2	20m0233	
H	10	2020年8月	患者	70歳代	157	7	1,2	20m0234	
H	11	2020年10月	患者	20歳代	157	7	1,2	17m0160	
H	12	2020年9月	患者	10歳代	157	7	1,2	17m0160	
H	13	2020年10月	患者	30歳代	157	7	1,2	20m0348	
H	14	2020年10月	患者	20歳代	157	7	1,2	20m0169	
H	15	2020年10月	接触者	20歳代	157	7	1,2	20m0169	
H	16	2020年10月	患者	10歳代	111	-/g8	1	20m3039	

表 8

施設 I

中四国ブロック患者由来STEC株 (2020年度)

県名	菌株番号	発生日	O血清群	H型	VT型	ISコード (1st)	ISコード (2nd)	感染研 PFGE型	感染研 MLVA型	感染研 MLVA complex	備考 (疫学的関連など)
I	EH20-8	4月	156	25	1	/	/	解析済	/	/	保菌者
I	EH20-9	6月	26	11	1	/	/	/	15m2113	20c203	患者
I	EH20-10	7月	103	2	1	/	/	/	20m4022	/	患者
I	EH20-11	7月	103	2	1	/	/	/	20m4023	/	患者
I	EH20-12	7月	26	11	1	/	/	/	20m2070	/	患者 (EH200012, 13, 18は家族)
I	EH20-13	7月	26	11	1	/	/	/	20m2070	/	患者 (EH200012, 13, 18は家族)
I	EH20-14	8月	26	11	1	/	/	/	13m2015	20c203	患者
I	EH20-15	8月	26	11	1	/	/	/	13m2015	20c203	患者
I	EH20-16	8月	157	-	1, 2	011057	310047	/	20m0207	20c026	患者 (EH200016, 20は姉弟)
I	EH20-17	8月	113	21	1, 2	/	/	解析済	/	/	保菌者
I	EH20-18	7月	26	11	1	/	/	/	20m2070	/	患者 (EH200012, 13, 18は家族)
I	EH20-19	8月	157	7	1, 2	141047	302447	/	14m0486	/	患者
I	EH20-20	8月	112ab	19	2	/	/	解析済	/	/	保菌者 (EH200016, 20は姉弟)
I	EH20-21	9月	157	7	1, 2	717555	611657	/	20m0169	/	患者
I	EH20-22	10月	26	11	1	/	/	/	20m2105	/	患者
I	EH20-23	11月	157	-	1, 2	717557	611657	/	20m0169	/	患者
I	EH20-24	11月	OUT	(H _g 8)	1	/	/	解析済	/	/	保菌者
I	EH20-25	11月	157	7	2	005457	211242	/	20m0427	/	患者 (EH200025, 26は親子)
I	EH20-26	12月	157	7	2	005457	211242	/	20m0427	/	保菌者 (EH200025, 26は親子)
I	EH20-27	12月	109	21	2	/	/	解析中	/	/	保菌者
I	EH21-1	12月	63	6	2	/	/	解析中	/	/	保菌者

表 9

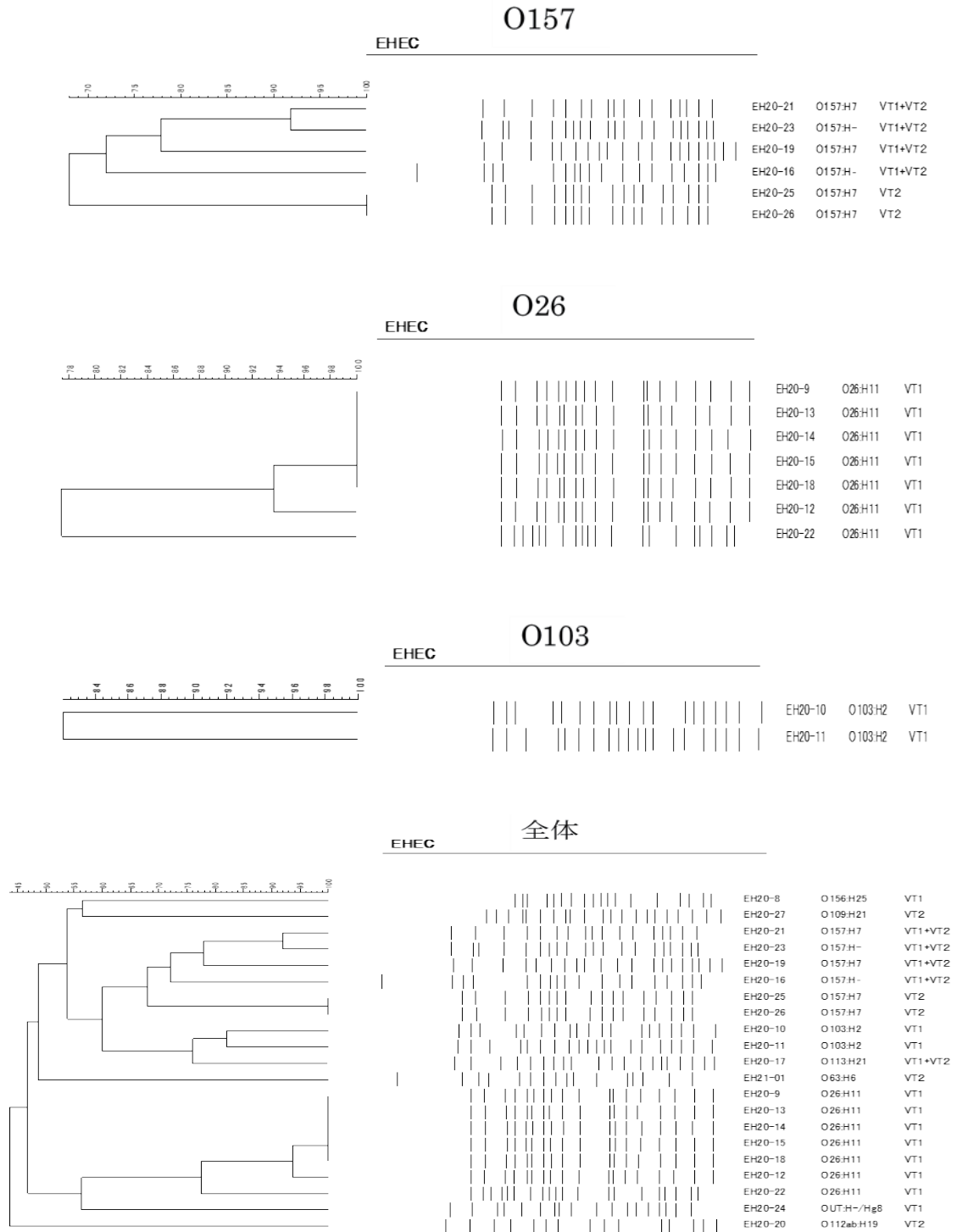
施設 I

中四国ブロック患者由来STEC株 (2020年度)

県名	菌株番号	O血清群	H型	MLVA 遺伝子座																
				EH11-11T	EH11-14BB	EH11-80	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	0157-3W	0157-34Y	0157-9M	0157-25J	0157-17Z	0157-19L	0157-36AA	0157-37V
I	EH20-9	26	11	2	1	1	2	3	12	15	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-12	26	11	2	1	1	2	3	14	14	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	4
I	EH20-13	26	11	2	1	1	2	3	14	14	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	4
I	EH20-14	26	11	2	1	1	2	3	12	14	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-15	26	11	2	1	1	2	3	12	14	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-16	157	-	2	-2	1	3	-2	8	5	-2	11	18	10	14	4	3	11	4	5
I	EH20-18	26	11	2	1	1	2	3	14	14	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	4
I	EH20-19	157	7	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	10	4	3	5	5	-2
I	EH20-21	157	7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	7	3	6
I	EH20-22	26	11	2	1	1	2	2	8	14	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
I	EH20-23	157	-	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	7	3	6
I	EH20-25	157	7	2	-2	1	6	-2	8	4	-2	-2	17	9	7	6	4	6	10	6
I	EH20-26	157	7	2	-2	1	6	-2	8	4	-2	-2	17	9	7	6	4	6	10	6

図 3

PFGE 解析結果 (施設 I)



島根県における腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所
林 宏樹

研究要旨

令和 2 年度に島根県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 (以下、「O157」という。) 感染症 6 事例 7 株について、IS-printing system (以下、「IS」という。) 法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (以下、「MLVA」という。) 法を実施し、分子疫学解析としての有用性を検討した。その結果、3 事例で MLVA type が一致した。また、他の 1 事例では、この 3 事例と同一の IS コードを示した一方、MLVA 法では single-locus variant であった。これらの 4 事例には疫学的関連性は認められず、同一感染源の暴露を受けたとの判断はできなかった。

このように散発的に同一タイプの遺伝子型が検出される場合は、詳細な疫学情報の収集や、より識別能の高い分子疫学解析法について検討が望まれる。

A. 研究目的

令和 2 年度に島根県内で発生した O157 感染症事例について、IS 法と MLVA 法による解析結果を比較し、分子疫学解析としての有用性を検討した。

増幅なしを「0」と判定、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化 (IS コード) した (表 1)。

B. 研究方法

1. 供試菌株

令和 2 年度に島根県で届出のあった (令和 2 年 7 月 17 日から令和 2 年 11 月 13 日の届出まで) O157 感染症 6 事例 7 株を用いた。

(2). MLVA 法

Izumiya らの方法²⁾に従い実施した。18 領域のうち locusO157-10 を除く領域について解析した。QIAGEN multiplex PCR kit (QIAGEN) を使用した PCR 反応後、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 及び Gene Mapper Software ver. 5.0 (Applied Biosystems) を使用してフラグメント解析を行った。

2. 方法

(1). IS 法

IS-printing System (東洋紡) の説明書に記載された方法に準じて実施した。結果は、プライマーセットごとにスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、

size marker は、GeneScan 600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) を用いた。

また、MLVA 情報集計・可視化システ

ム MLVA-mate により Minimum Spanning Tree (MST) を作成し²⁾、クラスター解析を行った。

C. 研究結果

島根県における令和 2 年度の O157 感染症の発生は、6 事例 7 件であった。IS 法による解析では、事例 B, C, D 及び F で同一の IS コードを示し、その他の事例ではそれぞれ異なる IS コードを示した (表 2)。

MLVA 法による解析では、事例 B, C, D で同一の MLVA type を示し、その他の事例ではそれぞれ異なる MLVA type を示した (表 2, 3)。MST 解析について図 1 に示す。

D. 考察

令和 2 年度に島根県で発生した O157 感染症 6 事例のうち、事例 B, C, D 及び F は IS 法では同一の IS コードを示していた。また、MLVA 法では事例 B, C 及び D で MLVA type が一致しており、これらの事例は同一クローン由来の菌株である可能性が示唆された。

事例 B, C 及び D の発生時期は、1 ヶ月以内と比較的近かったが、疫学調査では関連性は認められなかった。また、事例 F の発生時期はこれらの事例とは 2-3 ヶ月離れていた。事例 F の株は、MLVA 法による解析で、事例 B, C 及び D の株と single-locus variant (EHC-1) であったことから、同一の IS コードを示した可

能性が考えられた。本県以外でも、これら 3 事例の株と同一 MLVA type の株が散見されたが、疫学的な関連性は認められなかった。

散発事例間の関連性を見るうえで、IS 法や MLVA 法は優れたシステムであるが、このような散発事例が発生した際には十分な疫学情報を入手できない場合があり、同一感染源の暴露を受けたかどうかを判断するのは難しい。これらの課題を解決するには、IS 法や MLVA 法よりも識別能の高い次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析について検討が望まれる。

E. 結論

1. IS 法や MLVA 法は、疫学的背景の不明な散発事例間の関連性を見るうえで有用な手法である。
2. IS 法は、迅速かつ簡便に実施できる有用なタイピング法ではあるが、MLVA 法よりも識別能力が低いことを考慮して用いる必要がある。
3. 今後、次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析について検討が望まれる。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Izumiya H, et al. Microbiol Immunol. 2010;54 (10) :596-77.
- 2) 南須原亮, 他. 東京都健康安全研究センター年報 2018;69:279-84.

表 1 IS 法の増幅バンドサイズ及び判定のコード変換

1st set primer																		
primer No.	1-01	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	hlyA
size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
判定例	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	7			1			7			5			5			5		

2nd set primer																		
primer No.	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
判定例	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	2			1			1			6			5			7		

表 2 供試菌株及び IS 法及び MLVA 法の解析結果

事例 No.	届出年月日	VT	ISコード		MLVA type	疫学情報	症状の有無
			1st set	2nd set			
A 1	2020/7/17	2	145047	301142	20m5002		無
B 2	2020/8/15	2	002057	214442	17m0435		有
C 3 4	2020/8/17 2020/8/20	2	002057	214442	17m0435	No.3-4は家族	有 無
	D 5	2020/9/1	2	002057	214442		17m0435
E 6	2020/9/12	1&2	215457	311656	20m0323		無
F 7	2020/11/13	2	002057	214442	20m0223		有

図 1 MLVA 法による Minimum Spanning Tree

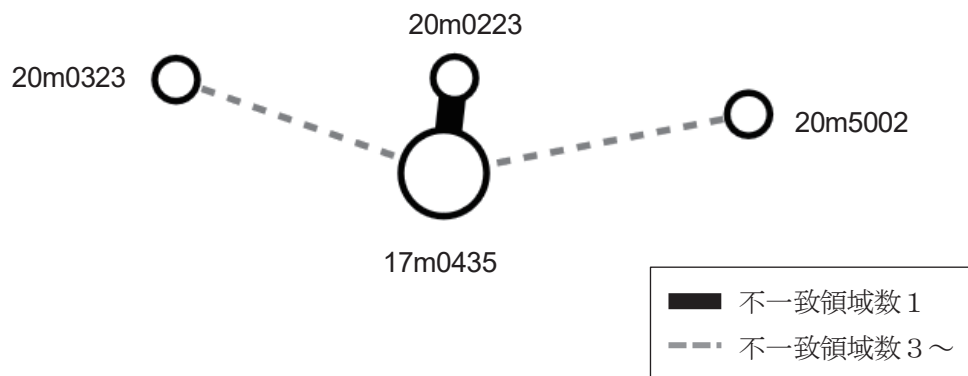


表3 供試菌株のリポーター数

事例 No.	リポーター数 (-2:増幅産物なし)														MLVA type				
	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	
A	2	-2	1	1	-2	6	8	-2	-2	-2	4	5	12	3	3	8	6	8	20m5002
B	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	9	-2	3	5	7	6	6	17m0435
C	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	9	-2	3	5	7	6	6	17m0435
D	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	9	-2	3	5	7	6	6	17m0435
E	2	-2	1	4	-2	8	5	-2	4	12	10	10	13	2	16	7	4	6	20m0323
F	2	-2	1	4	-2	16	5	-2	-2	4	9	9	-2	3	5	7	6	6	20m0223