

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」

平成 30-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 2018-2020 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 749 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 4819 株、026 1624 株、0111 338 株、0103 516 株、0121 298 株、0145 158 株、0165 12 株、091 109 株、計 7874 株を解析し、それぞれ、1824、576、189、140、105、52、12、90 の型が同定された。シンプソンの多様性指数 (SDI) は 0.923-1.00 であった。5 機関以上で検出された広域 MLVA コンプレックスもしくは MLVA 型は 3 年間で 87 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「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」に基づき地研から送付された MLVA データの解析を行い、3 年間で 32 機関からデータを受け、1636 株に型名を付与した。これらの送付データ並びに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因菌の一つである。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2018-2020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

2018-2020年分離株について、2021年2月24日現在の結果を示す。

1. PFGE

749株を解析した（MLVA対象株を除く）。菌株数が多かった血清群は05（8%）、0115（7%）、08（7%）、0113（6%）、0146（5%）、0128（4%）であった。5機関以上に跨る広域株は検出されなかった。2019年に0113及びOUT/0gGp5による、10株以上からなるクラスターがそれぞれ1件検出された。得られた病原体情報をBioNumericsデータベースに登録した。

2. MLVA

7874株を解析した。

各血清群における解析株数、検出された型数、Simpson's Diversity Index（SDI）は以下の通りであった：0157 4819株／1824型／0.998、026 1624株／576型／0.990、0111 338株／189型／0.986、0103 516株／140型／0.944、0121 298株／105型／0.964、0145 158株／52型／0.923、0165 12株／12型／1.00、091 109株／90型／0.996。2株以上を含むMLVA型の各年の検出頻度

は、2018 年が型数で 34%、株数で 74% ; 2019 年が同じく 33%、72% ; 2020 年が同じく 35%、72%であった。2 株以上を含む MLVA 型において、その構成株数の中央値はいずれの年も 3 であった。

主要 3 血清群について、各年に多く検出された型は表 1 に示すとおりであった。

3. 広域株 (5 機関以上で検出された) 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。表 2 に主要血清型において検出された広域 MLVA コンプレックスを、表 3 に同コンプレックスに含まれなかった広域 MLVA 型を示す。(コンプレックス解析は年度ごとに行っているため、以下の結果は年度当時のものである。)

平成 30 年度 : 広域 MLVA コンプレックスは 31 種類 (861 株)、広域 MLVA 型は 6 種類 (58 株) 検出された。集団事例を含む広域株としては、18c002、18c034、18c035 (いずれも 0157 VT1+VT2) があった。

令和 1 年度 : 広域 MLVA コンプレックスは 14 種類 (368 株)、広域 MLVA 型は 14 種類 (132 株) 検出された。集団事例を含む広域株としては 18m0541 (0157 VT1+VT2)、19c201 (026 VT2)、19c058 (0157 VT2) があった。

令和 2 年度 : 広域 MLVA コンプレックスは 13 種類 (291 株)、広域 MLVA 型は 9 種類 (89 株) 検出された。集団事例を含む広域株としては 20c022 (0157 VT1+VT2)、20c041 (0157 VT2) があった。

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 2018-2020 年の間に 32 機関から MLVA データの送付があり、1636 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 1636 株のうち、1016 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

2014 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、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、本法の事例解析における有

用性が示された。

2株以上検出された MLVA 型はいずれの年も全型の 35%前後であった。これは菌株数にして解析株の 70%以上に相当した。これは、その病原体情報から、大多数の株が互いに何らかの関連性を有する可能性を示唆している。

MLVA の結果は広域株の探知にもつながった。5地研以上から検出された MLVA コンプレックス/MLVA 型は 3年間で 87種類であった。広域株には集団事例関連株も含まれた。

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生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 型を付与するという新規システムである。本システムにより、より迅速に MLVA 型が付与され、情報共有に生かされることが期待される。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：2017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39巻、81-82、2018年5月

2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について。獣医公衆衛生研究、第20巻、6-11、2018年

3. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2018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40巻、81-82、2019年5月

4. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析 (MLVA 法) について。食品衛生学雑誌、第60号第1巻、J-7-8、2019年2月。

5. 泉谷秀昌：広域散発事例探知に向けた取り組み。日本食品微生物学会雑誌、第36巻第1号、10-12、2019年。

6. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌～分子疫学解析を利用した病原体サーベイランス。感染制御と予防衛生、第3巻第2号、75-80、2019年。

7. 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

8. 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

1. 泉谷秀昌：広域散発事例探知に向けた取り組み。第39回日本食品微生物学会学術総会、2018年9月、大阪府大阪市。

2. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 株の MLVA 解析について。平成30年度地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2018年10月、東京都。

3. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：腸管出血性大腸菌分離株の分子疫学解析状況について、2018年。第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018年11月、東京都。

4. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学。日本防菌防黴学会第45回年次大会、2018年11月、東京都。

5. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA について。平成30年度関東甲信静ブロック地域専門家会議、2018年12月、埼玉県。

6. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA 解析。平成30年度 希少感染症診断技術研修会、2019年2月、東京都

7. 泉谷秀昌：基礎から分かる MLVA について。平成30年度 杉並区「食品衛生監視員研修会」、2019年2月、東京都

8. 李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真：WGS 解析による MLVA の評価と効率的腸管出血性大腸菌 0157 サーベイランス手法の確立。第92回日本細菌学会総会、2019年4月、北海道札幌市

9. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について。衛生微生物技術協議会第40回研究会、2019年7月、熊本県熊本市。

泉谷秀昌：MLVA 法の概要について。令和元

年度特別区専門研修「検査技術」、2019年9月、東京都。

10. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 株の MLVA 解析について。令和元年度地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2019年11月、東京都。

11. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2018年における腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析。第40回日本食品微生物学会学術総会、2019年11月、東京都。

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. 主要 3 血清群検出数上位の MLVA 型と検出株数 (2018-2020 年)

2018		2019		2020	
18m0241	58	19m2033	45	19m0513	64
18m0126	56	19m2103	37	20m2053	47
17m2165	49	19m0046	35	18m0040	28
15m0436	44	19m0080	34	20m0368	27
16m2062	39	16m0103	32	20m2094	25
18m0192	39	19m0169	32	20m0105	24
13m2040	38	19m0488	25	20m0245	24
18m2062	33	19m3035	24	20m0243	21
18m0196	32	19m0112	23	20m0306	20
16m0039	30	18m0249	22	15m2189	19
		18m0541	22	18m0450	19
				20m0148	19
				20m0186	19

表 2. 広域コンプレックス (2018-2020)

2018			2019			2020年		
コンプレッ クス	株数	機関	コンプレ ックス	株数	機関	コンプレ ックス	株数	機関
18c016	66	29	19c058	60	27	20c030	66	24
18c035	44	27	19c010	38	20	20c022	31	13
18c010	32	18	19c030	32	16	20c041	29	13
18c041	27	17	19c026	24	15	20c019	26	13
18c002	45	15	19c028	34	13	20c023	22	13
18c034	59	14	19c033	17	12	20c028	27	11
18c012	36	12	19c051	13	12	20c010	27	10
18c022	19	12	19c024	17	9	20c026	11	9
18c036	18	11	19c027	16	9	20c036	13	7
18c031	61	9	19c025	12	8	20c020	14	6
18c028	18	9	19c201	47	7	20c034	12	6
18c025	14	9	19c011	32	7	20c045	8	6
18c008	14	9	19c053	14	5	20c003	5	5
18c029	29	8	19c302	12	5			
18c202	28	8						
18c024	20	8						
18c006	16	8						
18c017	15	8						
18c026	13	8						
18c042	10	7						
18c050	9	7						
18c205	89	6						
18c021	18	6						
18c019	15	6						
18c215	40	5						
18c063	33	5						
18c214	30	5						
18c057	17	5						
18c220	12	5						
18c023	8	5						
18c001	6	5						

表 3. 広域 MLVA 型 (2018-2020 年) (上記コンプレックスに含まれるものは除く)

2018			2019			2020		
型	株数	機関	型	株数	機関	型	株数	機関
17m0109	17	9	18m0541	22	13	16m0093	12	10
17m0121	9	6	13m2132	19	8	20m2052	13	6
18m0139	11	5	18m0448	10	7	20m0032	12	6
18m0222	8	5	16m0093	10	6	20m0176	10	6
16m0317	7	5	19m0287	6	6	17m0435	9	6
18m0209	6	5	19m0317	6	6	20m0197	9	6
			19m0128	6	6	20m3009	9	5
			18m0127	6	6	20m0169	9	5
			18m0025	10	5	20m0060	6	5
			18m0442	10	5			
			15m2113	10	5			
			19m0358	6	5			
			19m0152	6	5			
			13m0662	5	5			