

厚生労働省科学研究費補助金 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情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」

(R2-新興行政-一般-001)

研究分担報告書

分担研究課題 「全ゲノム解析による O157 の分子疫学的解析」

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)、

地方衛生研究所等

## 研究要旨

集団感染調査における全ゲノム配列 (whole genome sequence : WGS) 解析の適応性評価と MLVA のゲノムレベルでの評価を目的に、WGS 解析環境の構築、および 2013 年から 2020 年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 を対象とした WGS 解析を行った。WGS 解析の結果、疫学関連のある株間では 4 か所以内の SNP のみが認められた。この数を基準として MLVA を評価すると、同一 MLVA 型では SNP 解析とはほぼ同一の型別能があったのに対して、1-3 か所以上の座位が異なる MLVA 型の株では、遺伝的に遠い株が含まれることが分かった。また、DNA 複製時のエラーを除去修復する蛋白質をコードする *mutS* に欠失がある場合は、SNP 数が過大に現れるために解析には注意を要することが確認された。以上の結果から、O157 の集団感染の検知能では、WGS と MLVA との間に大きな差は認められなかったものの、疫学関連が未知の菌株間など詳細な解析の際には、WGS がより高い型別能を有するため有用であることが明らかとなった。国内 O157 の網羅的 WGS 解析からは、解析した国内集団感染事例由来株の clade は 2, 3, 7, および 8 が大部分を占めた。このうち clade 7 においては、亜系統 (subclade) ごとに重症化率が異なっていたため、病原性の違いが示唆された。上記の解析結果をもとに、2019 年に報告された 2 件の国内集団感染事例について WGS 解析をおこなったところ、いずれの事例においても事例内での SNP は 5 か所以内となっていた。また、2020 年に菌株が多数分離された MLVA コンプレックス 3 件を詳細に解析したところ、そのうちの 1 種のコンプレックス (20c022) では、100 株以上の近縁株が抽出され、国内で近縁性の高い集団が流行型となっていることが判明した。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は食品を媒介として人へ感染し、感染菌量も少ないことから、しばしば広域食中毒の原因となる。現在、同菌

感染症の早期検知や原因の究明を目的としたサーベイランスでは、multilocus variable tandem repeat analysis (MLVA) やパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法といった分子型別手法を用いた菌株間の比較が行われ

ている。近年、高速シーケンサーの実用化により、集団感染等の調査に全ゲノム配列 (whole genome sequence : WGS) を用いた解析が取り入れられつつある。そこで、全国サーベイランスで得られた O157 菌株を対象に WGS 解析手法の確立を行った。確立した手法を用いて、まず、主要な集団感染事例の解析を行い、従来法である MLVA との比較を行うとともに、全国サーベイランスへの適応性を評価した。次に、2013 年から 2018 年に分離された主要な MLVA 型 (主に集団感染事例) および 2020 年に分離された MLVA 型 (散发事例株を含む) について、WGS 解析を行い、MLVA と WGS との関係性をより網羅的に究明するとともに、流行型と系統の関連性について解析した。さらに、2019 年および 2020 年に多数の感染者が認められた 5 種の事例について、WGS 解析を行い、実際の集団感染調査への WGS 解析の有効性を評価した。

## B. 研究方法

### 1. WGS 解析手法の確立および評価

2013 年から 2017 年に、大規模な集団感染で分離された MLVA 型および類似型の計 225 株の EHEC O157 株を用いた (表 1)。これらの菌株には、集団感染で得られた代表的な MLVA 型 (index type) およびそれらと 1-3 か所の MLVA 座位が異なる類似型 (single-, double-および triple-locus variants : SLV、DLV および TLV) が含まれる。

各菌株について、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) および Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina) を用いた DNA 抽出およびライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを使用して、MiSeq (illumina) に

よってペアエンドシーケンシング (300-mer×2) を行った。得られたショートリードは、SPAdes や BLAST+ を利用した in-house pipeline によって、*de novo* アセンブルおよび病原性遺伝子等の検出を行った。また、Varscan などを用いた系統解析パイプラインを利用し、single nucleotide polymorphism (SNP) を抽出し、MLVA 型別との比較を行った。

### 2. 国内分離 O157 菌株の網羅的 WGS 解析

2013 年から 2018 年に国内で分離された O157 計 319 株、および 2020 年に分離された計 202 株の WGS を新たに解読した。これらの菌株は、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) 等の重症例由来株や大規模集団感染事例由来株を中心に選んだ。2020 年分離株については、1 月から 8 月に分離された散发事例由来株も含めた。各菌株について、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行い、Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina) を用いてライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを使用して、HiSeq (illumina) によってペアエンドシーケンシング (150-mer×2) を行った。得られたショートリードは、これまでに感染研・細菌第一部で既に解読した計 944 株の WGS と合わせて解析を行った。まず、spades や BLAST+ を利用した in-house pipeline によって、*de novo* アセンブルおよび病原性遺伝子等の検出を行った。次に、系統解析パイプラインを利用し、SNP を抽出し、MLVA 型別との比較を行った。

### 3. 国内感染事例株の解析

2019 年に全国的に発生した集団感染事例

(事例 A および B、表 2) および 2020 年に多数の菌株が分離された MLVA コンプレックス (20c006、20c020、および 20c022) について上記の方法と同様に WGS 解析を行い、国内株との比較等を行った。

## C. 研究結果

### 1. WGS 解析手法の確立および評価

#### 1.1. *in silico* 型別結果

感染研・細菌第一部で確立されたパイプラインを用いることで、ショートリードの生データから 1 株あたり約 20 分でドラフトゲノムの作製や MLST 等の各種型別を行うことができた。型別の結果、同一集団感染由来株であっても一部の菌株で抗生物質耐性遺伝子の検出や病原プラスミドの脱落が認められた。

#### 1.2. 除去修復遺伝子 (*mutS*) 欠失による SNP への影響

これまでの研究によって、DNA 複製時のエラーを除去修復する蛋白質をコードする遺伝子 (*mutS*) 領域の欠損が数%の株で認められている。*mutS* の欠失や変異は塩基置換速度を速めることが知られている。そこで、全株のドラフトゲノムにおける *mutS* 周辺領域の塩基配列を精査したところ、5 株 (2.2%) で 2-28 kbp の領域が欠失していた (図 1)。これらの株のうち、4 株は疫学関連のある他の菌株が存在したため、それら菌株間の SNP を集計し、median joining tree を作製した (図 2)。この結果、いずれの事例においても、*mutS* 保有株間の SNP は 1-2 か所であったのに対し、*mutS* 欠失株においては 7-15 か所の SNP が存在した。この結果から、*mutS* 欠失株においては同遺伝子保有株に比べて SNP 蓄積速度が速いことが示唆

された。このため、詳細な SNP 解析においては *mutS* 欠失株を除いて行った。

#### 1.3. 疫学関連のある株間での SNP 数の集計結果

疫学関連のある株として、原因食品が共通である場合、同一施設内での集団感染である場合、または同一家族からの分離の場合と定義し、*mutS* 欠失株 5 株を除いた 220 株のうち、疫学関連のある株間での SNP を集計した。その結果、疫学関連のある株間ではすべて 4 か所以内の SNP のみ存在することが判明した。

#### 1.4. MLVA 型別にみた SNP 数の集計結果

*mutS* 欠失株 5 株を除いた 220 株について、MLVA 型の差異別に SNP を集計したところ、MLVA が同一および SLV の場合、中央値はいずれも 1 か所の SNP であり、大部分 (98.5%) の株間で 10 か所以内の SNP であった (図 3)。DLV および TLV では中央値はそれぞれ 5 及び 30 となり、SNP のばらつきも大きくなっていった。

MLVA グループごとに SNP を集計したところ、大部分の株は代表的な MLVA タイプ (index type) と 5 か所以内の SNP を示すクラスターを形成した。それぞれの MLVA グループでは 2-5 件の疫学関連事例が存在したが、いずれのグループにおいても全ての事例が同一クラスターとなり、相互に関連することが示された (表 1)。さらに多数の散发事例由来株との関連性が認められ、同一の原因由来であることが疑われた。一方で、それぞれのグループで次のような 6 か所以上の SNP を示す株が存在した：グループ G1、TLV の 6 株；グループ G2、SLV の 4 株および TLV の 2 株；グループ G3、なし；グループ G4、DLV の 2 株および TLV

の1株。

## 2. 国内株の網羅的 WGS 解析

### 2.1. 国内 EHEC O157 494 株の WGS 解析

計 494 株の O157 の SNP を抽出し、系統解析を行った結果、7 種の clade が認められ、それぞれ次のような株数 (割合) であった: clade 1, 1 株 (0.2%); clade 2, 137 株 (27.8%); clade 3, 169 株 (34.3%); clade 4/5, 2 株 (0.4%); clade 6, 1 株 (0.2%); clade 7, 62 株 (12.6%); clade 8, 119 株 (24.1%)。重症者 (HUS または血便) の割合を算出したところ、clade 間での差異が認められた (表 3)。clade 2 および 3 では 95% 以上が同一の *stx* 型 (*stx1a 2a*) であったが、clade 7 および 8 では多様性が認められたため、*stx* 型毎に重症化率を算出した。その結果、clade 7 (*stx1a* のみ, *stx2a* のみ, *stx2c* のみ, *stx1a 2c* の両方をそれぞれ保有する 4 つのタイプに分かれる; 表 2) では *stx* 型ごとに重症化率が大きく異なり、*stx2a* 保有株、*stx1a 2c* 同時保有株で重症化率が高い傾向であった。Clade 8 では *stx* 型との関連性は見られなかった。

### 2.2. 国内 EHEC O157 1,146 株における MLVA と SNP 解析の比較

国内で 2020 年までに分離された EHEC O157 計 1,146 株の比較結果を図 4 に示す。本解析では散発事例 (150 種の MLVA 型のうち、70 種は同一型が分離されていない散発事例) を含めた解析を行い、網羅的に MLVA と SNP 解析の比較を行った。MLVA の差異別に見た SNP の平均値は、同一型、SLV, DLV, TLV でそれぞれ 2, 6, 12, 20 であり、MLVA で異なる座位が増えるにつれて SNP が蓄積する傾向が見られた。一方で、SLV でも 100 か所以上の SNP が存在する例

や、11 か所の MLVA 座位が異なる場合にも SNP が存在しない例も認められた。今後、これらの株の関連性や特徴的な MLVA 座位等について、詳細に検討する必要がある。

## 3. 国内感染事例株の解析

### 3.1. 2019 年集団感染事例の解析

これまでに確立した WGS 解析パイプラインを利用し、2019 年に発生した 2 件の集団感染事例の解析を行った (表 2)。事例 A は、全国的にチェーン展開する飲食店で食中毒として認定された事例であり、食中毒事例以外にも同一 MLVA 型の株が関東以西の全国で分離されていた。これまでサーベイランスで集められた株からは 3 座位違い以内の近縁型は見つかっていなかった。そのため、本 MLVA 型 (18m0541) の 13 株について WGS を解読し、clade 等の *in silico* 解析および国内株との SNP 解析を行った。その結果、同 MLVA 型は *stx1a, 2c* を保有する clade 7 であった。SNP 解析の結果、既存の WGS 解読株との間に近縁な株は見つからず、最も系統的に近い株とは 160 か所以上の SNP が存在した。一方、同一 MLVA 型内では最大 4 か所の SNP が存在した (図 5)。事例 B は、食中毒と認定されなかったものの、飲食店との関連性が疑われる事例で、5 種の MLVA 型からなる MLVA コンプレックスを形成していた (表 2)。そこで、5 種の MLVA 型を含む 23 株について WGS を解読し、事例 A と同様の解析を行った。その結果、供試菌株はいずれも clade 8 に属し、*stx2a, 2c* を保有していた。最も近縁な株とは 40 か所以上の SNP が存在した。同一コンプレックス内での SNP は 0-5 か所であり、同一のクローンであると考えられた。(図 6)

### 3.2. 2020 年度事例の解析

2020 年に同一 MLVA 型が多数発生した 3 種の MLVA コンプレックス (20c006, 20c020, および 20c022) について、これまでに感染研で SNP 情報をデータベース化した O157 計 1178 株から近縁な株を抽出した。先行研究では、集団感染由来株は 0-7 か所の SNP が存在することが知られているため、20c006 および 20c020 では SNP が 10 か所以内の株を抽出した。一方、20c020 では中心となる MLVA (16m0039) において、同一型でも 14 か所の SNP が存在したことから、2020 年に分離された 16m0039 の株から 14 か所以内の SNP が存在する株を抽出した。

コンプレックス 20c006 は、岡山県および栃木県で計 12 株が報告され、20m0067 および SLV、DLV からなるコンプレックスを形成していた。そこで、20m0067 の株 (J2020-1) を基準として、SNP が 10 か所以内の株を抽出した。その結果、抽出された株はいずれも 20c006 に含まれる SLV または DLV であり、株間の SNP は最大で 2 か所であった (図 7)。

コンプレックス 20c020 は、主な MLVA 型を 20m0041 とし、SLV である 20m0198 から構成され、全国的に 17 株が報告されている。20m0041 の菌株を基準に、SNP が 10 か所以内の株を抽出したところ、20m0041 の 2 株を含む計 6 株が抽出された。20m0041 の菌株間の SNP は 0 または 1 か所と、非常に近縁であった。その他の近縁株は、2019 年以前に分離された MLVA で 1 から 3 座位が異なる株であったが、18 か所以上の SNP が存在した (図 8) (近縁株で再解析を行ったために 10 か所以上の SNP が抽出されている)。

コンプレックス 20c022 は、16m0039 を主な MLVA とし、全国的に 26 株が報告されている。同 MLVA 型では、同一型でも 14 か所の SNP が存在する場合があったことから、データベースから 14 か所以内の SNP が存在する菌株を抽出した。その結果、計 106 株が近縁株として抽出された (図 9)。これらの菌株には、2013 年分離株から 2020 年分離株までが含まれており、最大で MLVA が 5 座位異なる株が含まれていた。

### D. 考察

WGS を用いた EHEC 調査の既報では、同一集団事例内では 4-7 か所以内の SNP であることが報告されており、本研究結果と一致した。このことから、O157 ではおおよそ 10 か所以内の SNP の違いであれば、同一の感染源が疑われることが示唆された。ただし、解析方法やサンプルサイズ等によって SNP の数は変動する可能性があり、疫学情報とも併せて判断することが重要であると考えられた。

また、SNP 解析を行う際には *mutS* の有無を確認することが重要であることが判明した。今回用いた株では *mutS* 内の非同義塩基置換や、MutS と協同して除去修復を行う MutL および MutH 遺伝子の変異は認められなかったが、これらの変異についても確認が必要であると考えられる。

MLVA 型別に SNP 数を集計した結果から、一部の例外を除き、同一型および SLV である際にはゲノムレベルでも 10 か所以内の SNP に収まり、遺伝的に非常に近縁であることが明らかとなった。DLV および TLV については、遺伝的に近縁な株と遠縁な株とが混在することが判明した。多数の SNP が

認められたのは、いずれも疫学関連が未知の株間であった。このように、SLV、DLV および TLV のような類似 MLVA 型であっても疫学関連が未知の株間では、WGS 解析によってサーベイランスの精度を向上させる可能性がある。しかしながら、SLV でも数十か所の SNP が存在する事例や、10 座位以上の MLVA 座位が異なっているにもかかわらず SNP が存在しない事例等の例外的な事例が多く見られた。これらの事例については、特定の座位が関与している可能性や、異なる座位のリピート数の差などをより詳細に検討する必要がある。

系統解析の結果からは、国内流行株の主な clade は 2, 3, 7, および 8 であることが示された。これは、過去の報告 (Iyoda ら *Open Forum Infect Dis.* 2014 Sep;1(2):ofu061.) と一致している。Clade 7 内には 4 種類の *stx* 型が存在し、clade 内亜系統と関連していた。このうち、clade 7 は比較的病原性が低いとされているが、本解析では clade 7 内の亜系統によって病原性が異なる可能性が示唆された。今後は、亜系統間の病原性の差異を明らかにする必要がある。

2019 年に発生した集団感染事例の解析では、いずれの事例でも同一型または同一コンプレックスの株は SNP 上も同一のクラスターを形成することが示された。先行研究から、疫学関連のある株間での SNP はおよそ 0-7 か所とされており、今回の事例でも供試菌株間の関連性は非常に高いと考えられる。

2020 年に流行した MLVA コンプレックスの解析では、20c006 および 20c020 の事例では、コンプレックスとなった株のみが SNP でも近縁株となった。これらの結果は、

MLVA で差異の大きい株間や、類似 MLVA であっても分離日が離れている株間では、SNP が多数存在する場合がある、というこれまでの知見と一致するものであった。

一方 20c022 の事例では、ごく少数の SNP (<14 か所) のみ存在する近縁な集団が、少なくとも 2013 年から国内で継続的に分離されていることが明らかとなった。本集団は、今回の解析株の約 9% を占めることから、国内 EHEC 制御の上で重要であることが示唆された。また、本集団の菌株については MLVA が類似していても SNP が多数存在する場合があります、MLVA の変異速度が遅い可能性がある。

## E. 結論

本研究によって、WGS による SNP 解析がより高精度なサーベイランスに寄与することが明らかとなった。一方で、MLVA が同一の菌株ではごく少数の SNP のみが認められたことから、MLVA も高い型別能を有することが判明した。MLVA は迅速性や費用面では WGS より有利な点があり、両者を組み合わせた運用を行うことでサーベイランス全体の効率向上に寄与できると考えられた。また、一部で遺伝的近縁性の高い集団が継続的に国内で流行していることが明らかとなった。今後、このような流行型が他に存在するか探索するとともに、流行型の由来や分布について明らかにすることで、より効果的な EHEC 制御につながると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 誌上発表

1. Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M.  
Effective surveillance using multilocus  
variable-number tandem-repeat analysis and  
whole-genome sequencing for  
enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157.  
Appl Environ Microbiol. 2019 Sep 1;85(17).

### 2) 学会発表

1. 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 第22回腸管出血性  
大腸菌感染症研究会、東京、2018年

## 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. 使用菌株数と MLVA 型**

| MLVA group | Index MLVA type | No. of epi-linked cases | No. of isolates   |     |     |     |
|------------|-----------------|-------------------------|-------------------|-----|-----|-----|
|            |                 |                         | Same <sup>a</sup> | SLV | DLV | TLV |
| G1         | 13m0551         | 4                       | 56                | 10  | 1   | 7   |
| G2         | 15m0278         | 3                       | 39                | 9   | 0   | 2   |
| G3         | 16m0110         | 2                       | 26                | 2   | 0   | 0   |
| G4         | 17m0121         | 5                       | 41                | 6   | 24  | 2   |

<sup>a</sup>Same, same MLVA type as the index type; SLV, single locus variant; DLV, double locus variant; TLV, triple locus variant

**表 2. 使用菌株**

| 事例  | ID  | 疫学情報 | MLVA型   |
|-----|-----|------|---------|
| 事例A |     |      |         |
|     | A01 | 散発   | 18m0541 |
|     | A02 | 散発   | 18m0541 |
|     | A03 | 散発   | 18m0541 |
|     | A04 | 散発   | 18m0541 |
|     | A05 | なし   | 18m0541 |
|     | A06 | 散発   | 18m0541 |
|     | A07 | 店舗A  | 18m0541 |
|     | A08 | 店舗A  | 18m0541 |
|     | A09 | 店舗A  | 18m0541 |
|     | A10 | 散発   | 18m0541 |
|     | A11 | 散発   | 18m0541 |
|     | A12 | 散発   | 18m0541 |
|     | A13 | 店舗A  | 18m0541 |
| 事例B |     |      |         |
|     | B01 | 店舗B  | 19m0506 |
|     | B02 | 店舗B  | 19m0506 |
|     | B03 | 店舗B  | 19m0488 |
|     | B04 | 店舗B  | 19m0487 |
|     | B05 | 店舗B  | 19m0488 |
|     | B06 | 店舗B  | 19m0487 |
|     | B07 | 店舗B  | 19m0506 |
|     | B08 | 店舗B  | 19m0488 |
|     | B09 | 店舗B  | 19m0508 |
|     | B10 | 店舗B  | 19m0509 |
|     | B11 | 食品   | 19m0488 |
|     | B12 | 店舗B  | 19m0487 |
|     | B13 | 店舗B  | 19m0506 |
|     | B14 | 店舗B  | 19m0506 |
|     | B15 | 店舗B  | 19m0487 |
|     | B16 | 散発   | 19m0488 |
|     | B17 | 店舗B  | 19m0487 |
|     | B18 | 店舗B  | 19m0487 |
|     | B19 | 散発   | 19m0487 |
|     | B20 | 散発   | 19m0487 |
|     | B21 | 散発   | 19m0508 |
|     | B22 | 散発   | 19m0488 |
|     | B23 | 散発   | 19m0506 |

**表 3. 解析菌株の clade および stx 型と重症化率の関連性**

| Clade | stx type | 株数  | BD_HUS |      |
|-------|----------|-----|--------|------|
|       |          |     | 株数     | %    |
| 1     |          | 1   | 1      | 100  |
| 2     |          | 137 | 78     | 56.9 |
| 3     |          | 171 | 108    | 63.2 |
| 4/5   |          | 2   | 0      | 0    |
| 6     |          | 1   | 1      | 100  |
| 7     |          | 62  | 27     | 43.5 |
|       | 1a2c     | 21  | 13     | 61.9 |
|       | 2a       | 14  | 8      | 57.1 |
|       | 2c       | 26  | 5      | 19.2 |
|       | 1a       | 1   | 1      | 100  |
| 8     |          | 115 | 80     | 69.6 |
|       | 2a       | 68  | 44     | 64.7 |
|       | 2c       | 32  | 22     | 68.8 |
|       | 1a2c     | 1   | 0      | 0    |
|       | 2a,2c    | 18  | 14     | 77.8 |

BD: Bloody diarrhea

HUS: Hemolytic uremic syndrome

図 1. *mutS* 周辺領域の欠失状況

矢印は遺伝子の方向、番号は菌株番号を示す。矢印の白抜き部分は該当領域の欠失を示す。

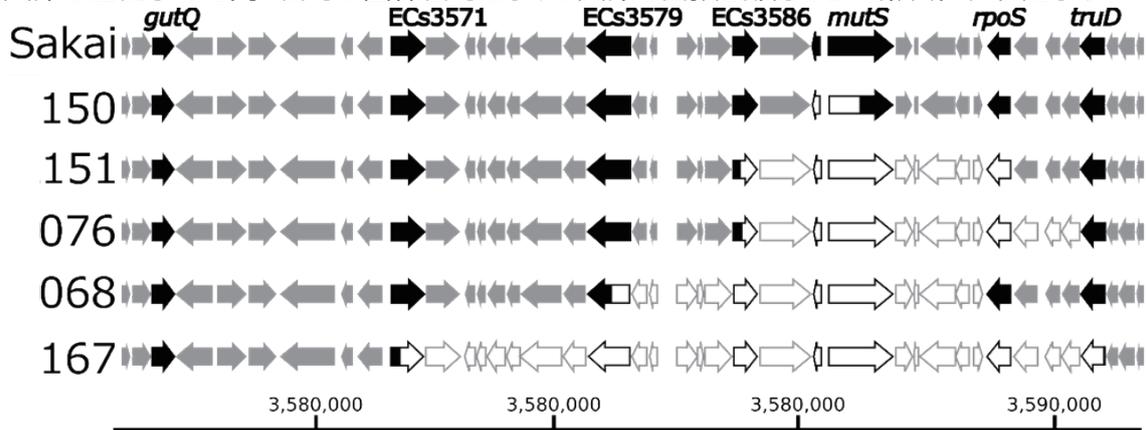


図 2. *mutS* 欠失株および関連株の SNP による median joining tree

A、B および C の図はそれぞれ別の事例を示す。各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。

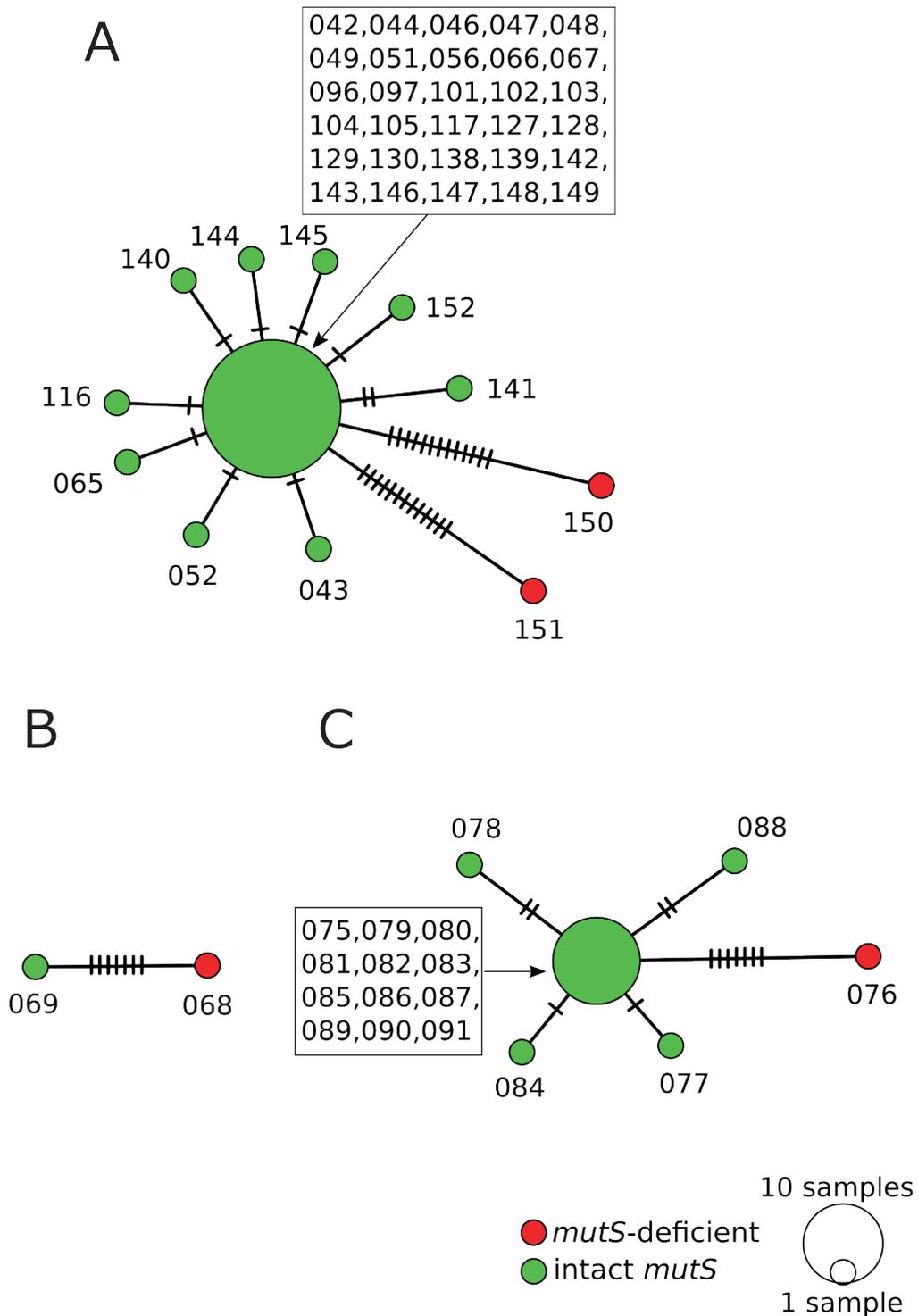
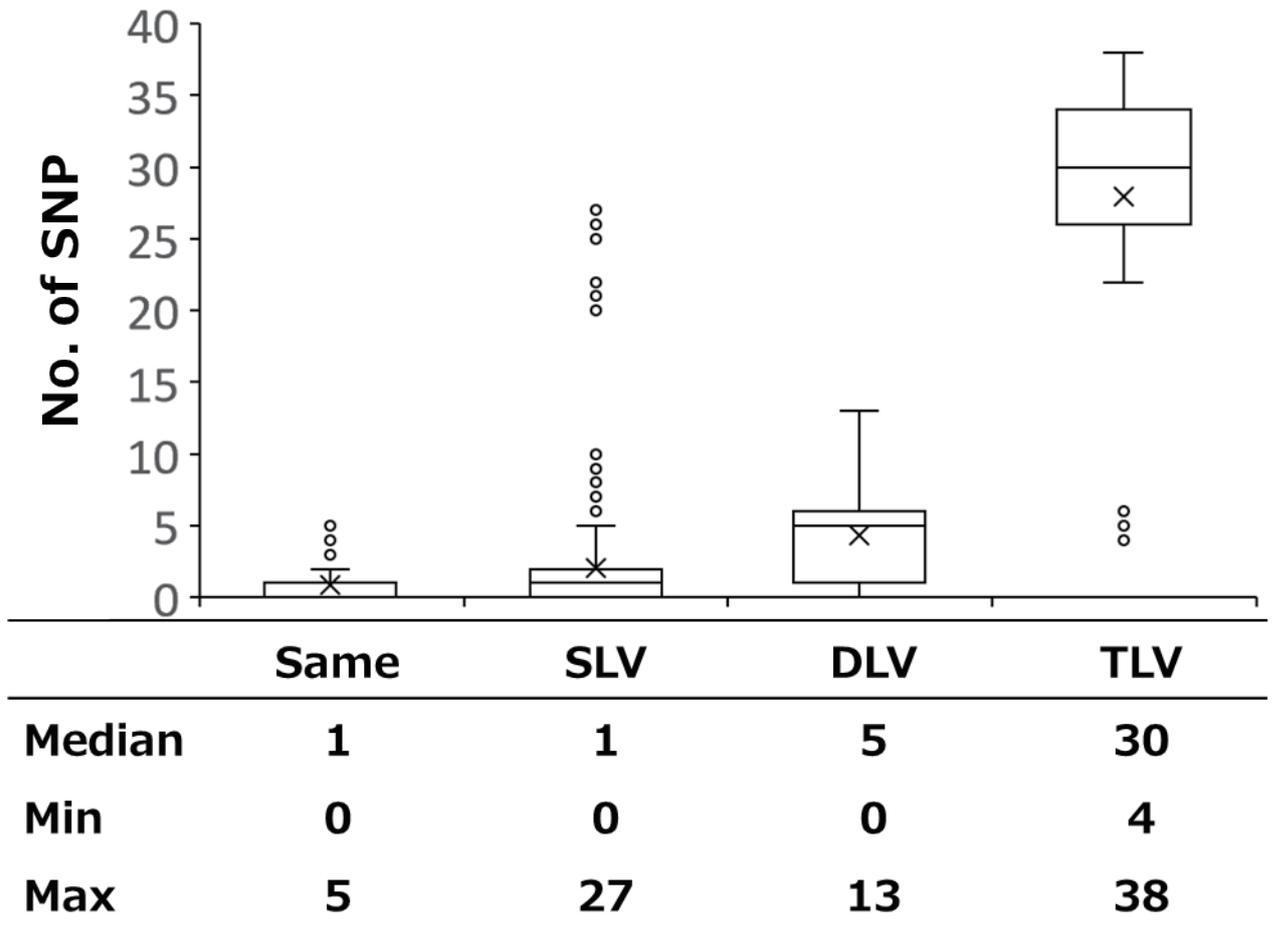
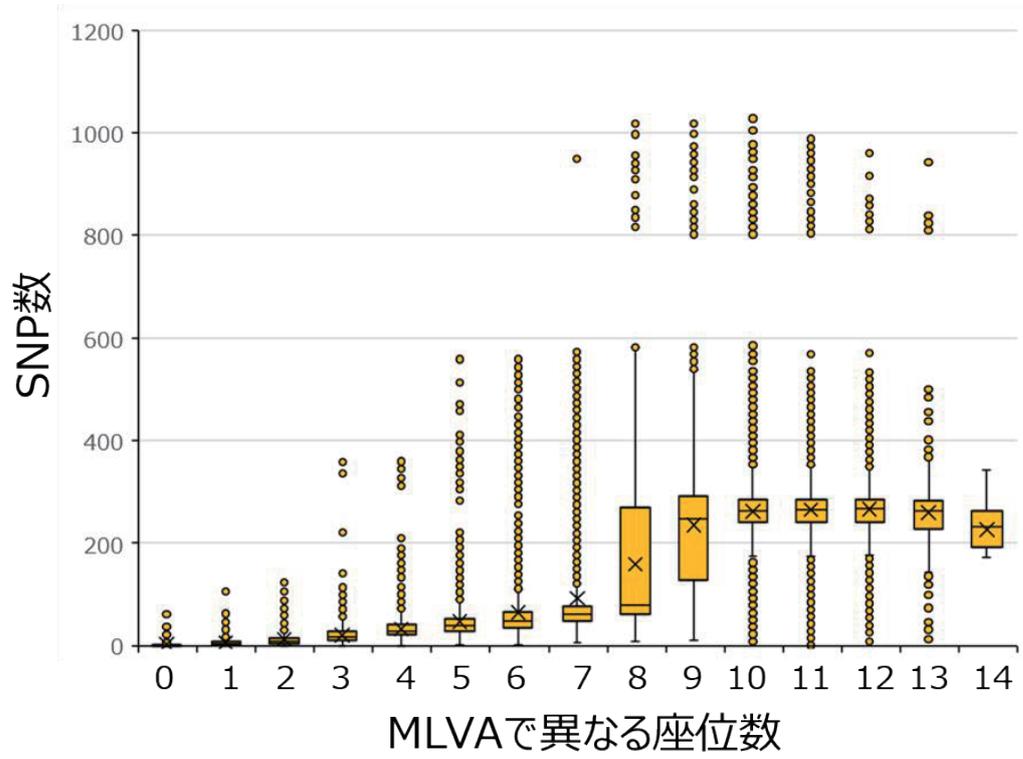


図 3. MLVA 型別の SNP を集計した箱ひげ図



#### 図 4. MLVA と SNP の関連性

Locus variant (LV) ごとの SNP 数を箱ひげ図で示す。



### 図 5. 事例 A における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、分離元の自治体を示す。

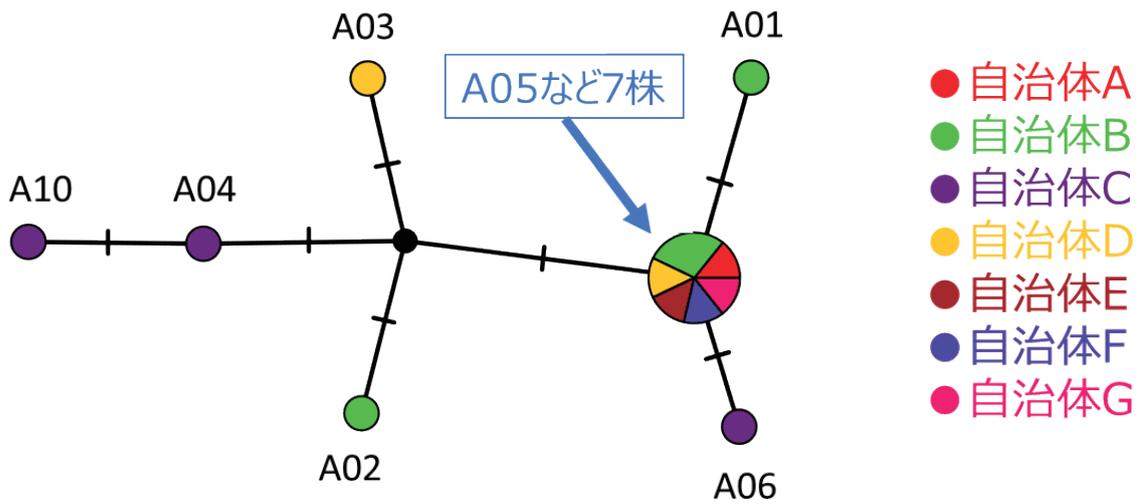
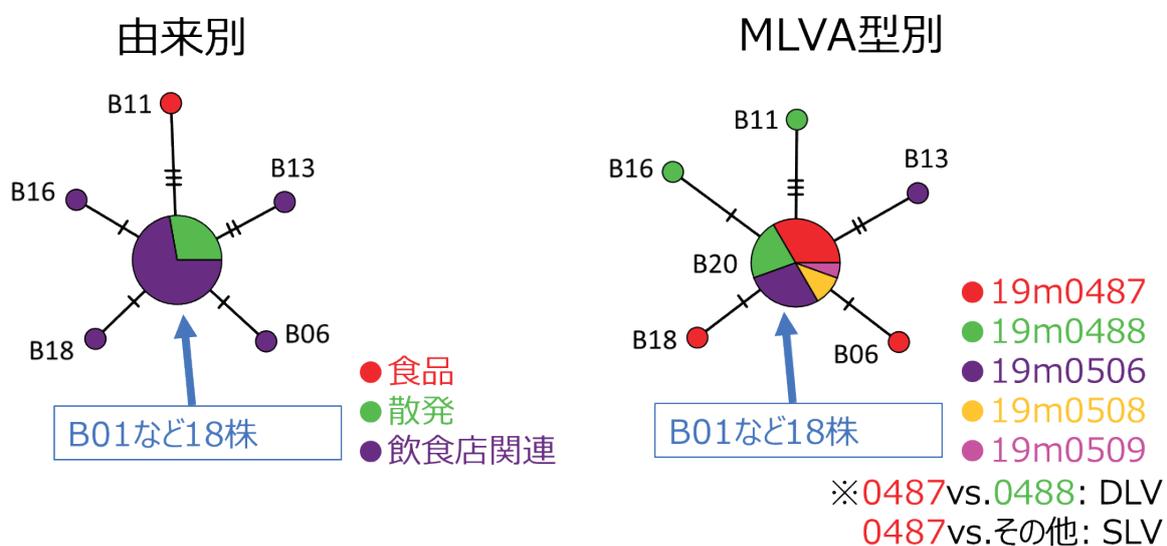


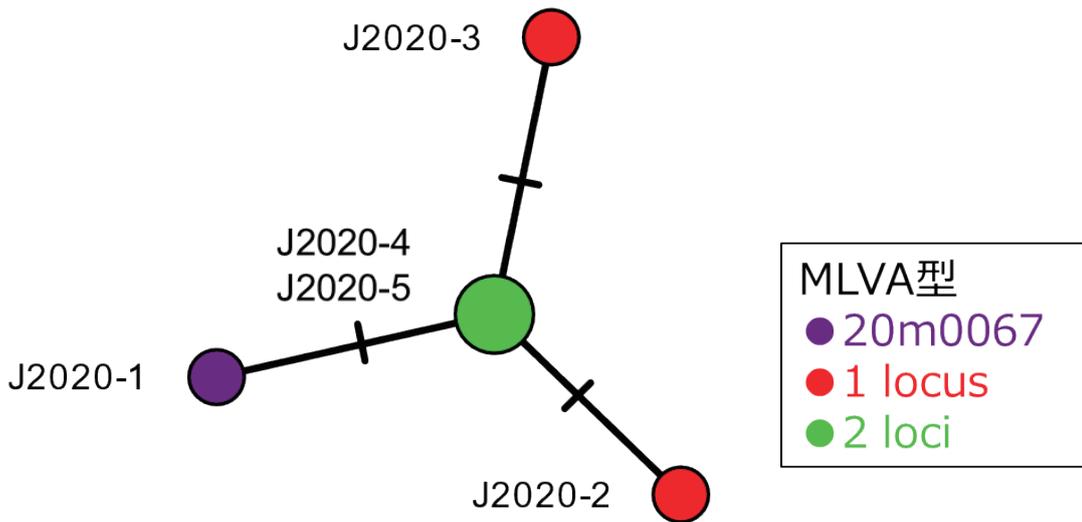
図 6. 事例 B における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、由来（左図）および MLVA 型（右図）を示す。



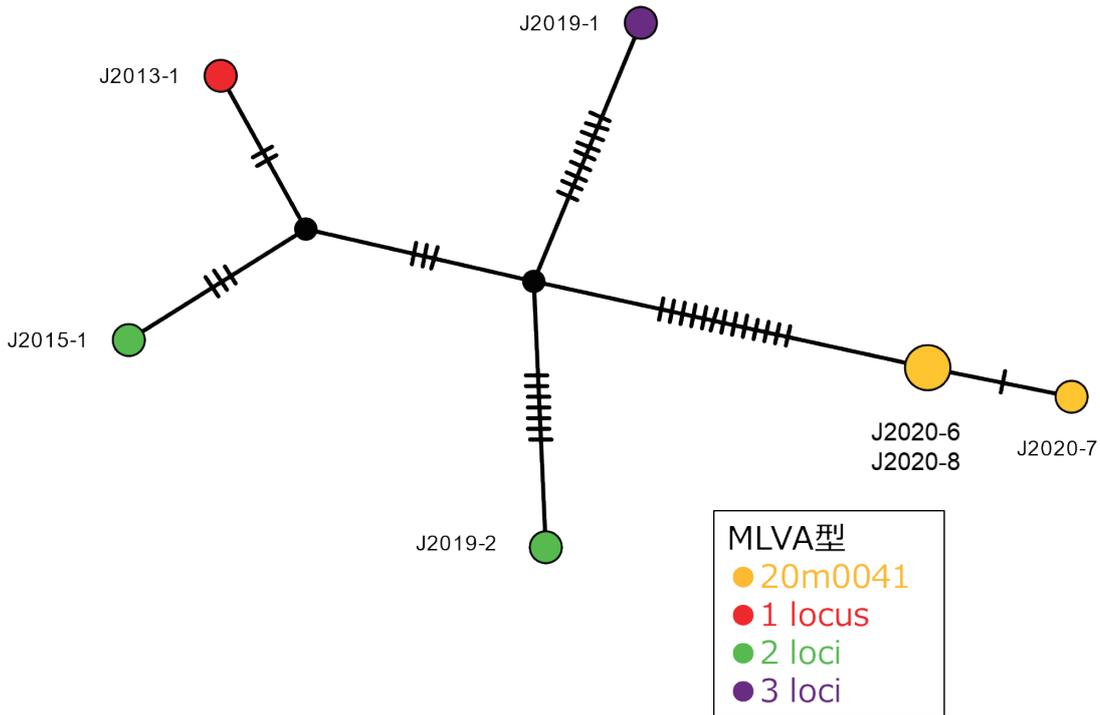
### 図 7. 20c006 における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 20m0067 と異なる MLVA 座位数を示す。



**図 8. 20c020 における供試菌株の median joining tree**

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 20m0041 と異なる MLVA 座位数を示す。



### 図 9. 20c022 における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 16m0039 と異なる MLVA 座位数を示す。

