

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）

平成 30 年度～令和 2 年度 分担研究報告書

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

研究分担者	岩渕香織	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	森本 洋、小川恵子、三津橋和也	北海道立衛生研究所
	尾島拓也、石黒真琴	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上剛志、高橋洋平	青森県環境保健センター
	武差愛美、橋本恭奈	青森県環境保健センター
	熊谷優子、今野貴之、樫尾拓子	秋田県健康環境センター
	藤森亜紀子、山下裕紀	岩手県環境保健研究センター
	田中静佳、瀬戸順次	山形県衛生研究所
	山口友美、山谷聡子、木村葉子	宮城県保健環境センター
	山田香織、大下美穂	仙台市衛生研究所
	菊地理慧、賀澤 優	福島県衛生研究所
	木村有紀、青木順子	新潟県保健環境科学研究所
	山本一成 須藤拓大	新潟市衛生環境研究所

研究要旨

平成 30 年 6 月 29 日付け事務連絡「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」により遺伝子検査手法は MLVA 法に統一化するよう通知されたが、平成 30 年度当時、MLVA 導入は過渡期にあり、ブロック内の MLVA 実施の地方衛生研究所（以降、地衛研）は 12 施設のうち 3 施設であった。ブロック内の地衛研の MLVA 導入に寄与すべく、平成 30 年度、令和元年度に MLVA 解析に必須のフラグメント解析用ソフトウェア GeneMapper の操作に重点を置いた「腸管出血性大腸菌（以降、EHEC）MLVA 技術研修会」を開催した。令和 2 年 12 月現在、ブロック内地衛研では、導入予定の 3 施設を含めると 9 施設で MLVA 実施可能となっている。また、標記研修会では、PFGE、IP-PS も含めた EHEC 解析データの運用方法や MLVA 実施に伴う疑問などについて情報共有を図っており、令和元年度には、トラブルシューティング集として「EHEC MLVA フラグメント解析判定事例集」を作成した。令和 2 年度については、感染症・食中毒事例や検査法等について情報を共有するため、新型コロナウイルス感染症に配慮して地全協（地方衛生研究所全国協議会）Webex 会議室を利用し研修会を 2 回開催した。

導入した分子疫学解析 MLVA について結果の信頼性を確保するため、ブロック内に

において精度管理を令和元年度から実施している。機器や試薬の安定した条件をみつけることが信頼性の確保された結果をだすために重要と言われている。増幅効率のよい PCR 試薬（Platinum MultiplexMaster Mix : ThermoFisher）により、多くの地衛研で判定に苦慮する「低いピーク」が改善されたと報告があり、PCR 試薬により安定した MLVA データが確保されるのであれば、安定した条件のひとつとして検討されると考えられた。

A. 研究目的

平成 30 年 6 月 29 日付けで厚生労働省から発出された事務連絡により、地衛研による EHEC の分子疫学解析法は MLVA 法に統一化する方向性が示されたが、平成 30 年当時、ブロック内の 12 機関において、実施しているのは 3 機関、実施を予定しているのは 5 機関であった。MLVA 導入にはシークエンサーが必要であるほか、「フラグメント解析ソフト GeneMapper」の習得が必要であることから、GeneMapper で解析作業ができることを目標とした、MLVA 技術研修会を開催した。併せて、ブロック内の EHEC 担当者の連携を深め、情報を共有するため、事例報告及び検査法についての情報提供等を行った。

また、MLVA の精度確保の取組を促し信頼性を確保することを目的に、精度管理を実施した。

B 研究方法

平成 30 年度-----

1. 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会の開催

平成 30 年 11 月 15 日、16 日の 2 日間、岩手県環境保健研究センターで、8 地衛研 10 名が参加して行われた

1) ライフテクノロジーズジャパンの講

師による「GeneMapper」の講義とパソコン実習

- 2) 国立感染症研究所 泉谷先生の講演
- 3) 9 地衛研から「MLVA 法検査状況及び MLVA 法を含む分子疫学解析結果の運用状況について」情報提供

令和元年度-----

1. MLVA の精度管理の実施

7 施設が参加。試料は、岩手県内で 2018 年～2019 年に分離した EHEC4 菌株の DNA 抽出液（抽出キット使用、濃度は 1ng/μL ①O157VT1VT2、②O157VT2、③O26VT1、④O111VT1）を参加希望の施設に送付した。各施設で実施している方法で MLVA を実施し、各 17 遺伝子座の繰り返し配列数を報告することとした。各施設の結果を感染研の結果と比較することで解析した。MLVA に使用する試薬や機器、検査で苦慮していることについてアンケートを実施した。

2. 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会の開催

令和 2 年 1 月 16、17 日の 2 日間、岩手県環境保健研究センターで、10 地衛研 11 名が参加して行われた。

1) ライフテクノロジーズジャパン

の講師による、GeneMapper を用いた MLVA データ解析の講義とパソコン上での実習を行った。

- 2) 感染研 泉谷先生の講演
- 3) 精度管理の結果の報告
- 4) 事例発表

O157VT2 による広域事例において、原因食品と推定されたシマチョウの検査を実施した新潟市衛生環境研究所 と仙台市衛生研究所から事例発表があった。

MLVA を実施し、判定に苦慮する 6 事例を経験した北海道立衛生研究所から報告があった。

令和 2 年度-----

1. MLVA の精度管理の実施

7 施設が参加。試料は、岩手県内で 2020 年に分離された EHEC4 菌株の DNA 抽出液（抽出キット使用、濃度は 6~11ng/ μ L①O157VT1VT2、②O157VT2、③O26VT1、④O111VT1）を参加希望の施設に宅配で送付した。なお、参加しない MLVA 導入予定の 2 地衛研にも確認用の試料として送付した。精度管理の検査方法は、各施設で実施している方法で行い、各 17 遺伝子座の繰り返し配列数を報告することとした。各施設の結果を感染研の結果と比較することで解析した。

MLVA に使用する試薬や機器、昨年度と変更した点、検査で苦慮していることについてアンケートを実施した。

2. 第 1 回 EHEC 担当者 Web 研修会の開催

令和 2 年 12 月 2 日、全地協 Webex 会議室において 9 地衛研 14 名が参加して行われた。

- 1) 「EHEC 分子疫学解析実施状況アンケート」のブロック内の回答まとめ（別紙 1）
- 2) 北海道立衛生研究所からの報告で、下記の 3 つの PCR 試薬を比較した結果、Thermo Platinum Multiplex PCR はピークが安定して高く検出された。
 - ① QIAGEN Multiplex PCR Plus
 - ② QIAGEN Multiplex PCR
 - ③ Thermo Platinum Multiplex PCR

3. 第 2 回 EHEC 担当者 Web 研修会の開催

令和 3 年 1 月 28 日、全地協 Webex 会議室において 11 地衛研 18 名参加して行われた。

- 1) 感染研 泉谷先生の講演
- 2) 事例発表
岩手県環境保健研究センターから、散発発生した O103VT1 による EHEC 感染症について、北海道立衛生研究所から、 β -グルクロニダーゼ (GUD) + EHEC O157 検査における注意点について事例発表があった。
- 3) アンケート結果報告
仙台市において、EHEC 増菌培地の VT 遺伝子スクリーニング PCR で VT1(+)/VT2(-)であったが、分離された菌株は VT1(+)/VT2(+)という事例があり、増菌培養液の DNA 抽出法やプライマーについて検討したが、簡単

に安価にできる解決策がなく、DNA抽出法等についてアンケートを実施しており、事例の説明とアンケートの結果報告を行ったものである。

C. 研究結果

1. 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修

平成 30 年度及び令和元年に開催した。講師はライフテクノロジーズジャパンテクニカルサポートに依頼した。実際に GeneMapper がダウンロードされた PC を使い、Panel.txt 及び

Bin.txt ファイルをインポートし

AnalysisMethod を作成し、フラグメントデータを使って実際に解析してみるとという一連の作業について実習した。これから導入する地衛研においては、GeneMapper による解析ができるようになる機会に、実際に解析している地衛研においては、トラブルシューティングについて研修できる機会となった。

2. MLVA 精度管理

1) 平成元年度の結果

試料①O157VT1VT2 については 7 施設が感染研の結果と一致した。試料②O157VT2 の遺伝子座 O157-34 で、試料③O26VT1 と④O111VT1 の遺伝子座 O157-34 と遺伝子座 O157-9 で、ピーク検出閾値以下 (100 と設定) であったため「-2 (ピークなし)」とし、感染研の結果と一致しない施設が 1 か所あった。

2) 令和 2 年度の結果

試料①O157VT1VT2、②O157VT2 に

ついては、7 施設が一致し、感染研の結果とも一致した。試料③O26VT1 と④O111VT1 については、遺伝子座 O157-36 が 1 施設だけリピート数 6 との回答で、6 施設は「-2 (ピーク無)」と報告が異なっていた。感染研の結果は、「-2」であり、O157-36 領域に非特異ピークが発生しピーク検出と判定したと考えられた。

いずれについても、Bin の範囲に入った「低いピーク」の判定は難しいと考えられた。

3. 地衛研からの情報提供・事例発表等

研修会等を通じて、事例や MLVA 等 EHEC 全般に係る問題点や課題について情報共有が図られた。さらに、ブロック内で、PCR 試薬の検討を行った。EHEC MLVA フラグメント解析に係るトラブルシューティング集 (別紙 2) を作成したり、問題解決のための連携が図られた。

D. 考察

MLVA 精度管理は、2 年実施し、ほとんどの施設で感染研と一致する結果となったが、検出されるべきピークが「低いピーク」であったため「-2」とした例と、ピークの出ないローカスに発生した非特異ピークをピーク検出と判定した例があり、bin の範囲に入った低いピークの判定は難しいと考えられた。

令和元年度の MLVA 技術研修会において、MLVA の判定で共通して苦慮していたのが「低いピーク」の判定であった。増幅効率の高い PCR 試薬 (Thermo

Platinum Multiplex PCR kit) を使用することで改善するとの情報提供が感染研からあり、ブロック内地衛研に配布したところ、北海道立衛生研究所で、他の PCR 試薬と比較検討し、安定したピークが得られたと令和 2 年度の第 1 回 Web 研修会で報告があった。仙台市衛生研究所からも、3つの試薬を比較し、ピーク低めの EH111-8、O157-9、O157-34 についても安定したピークが立ち上がるとの報告があった。このことから、増幅効率の高い PCR 試薬 (Thermo Platinum Multiplex PCR kit) が検討されていくと考えられた。

E. 結論

今回、MLVA についてのみ精度管理を実施した。EHEC 分子疫学解析実施状況アンケートでは、PFGE 及び IS-Printing System も利用されている。特に PFGE は O157、O26、O111 以外の血清型の EHEC やサルモネラ属菌などの食中毒菌において利用されており、PFGE 及び IS-PS についても精度管理が必要であると考えられた。

なお、菌株解析の結果、解析データから検出された Complex 等の広域事例については時期や地域などの疫学情報が合致することが重要である。広域発生事例の早期検出のため、菌株が地衛研に収集されるまでの時間の短縮が必要と考えられる。検査機関 (検査センターや医療機関) 向けに情報提供するパンフレット等を考えていきたい。

また、ブロック内では導入予定も含めて 9 施設で MLVA 解析が可能となって

いる。今後は、MinimumSpanningTree などの系統樹作成などの研修会を開催したいと考えている。

F. 健康危険情報

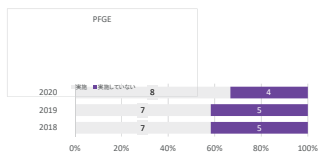
なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

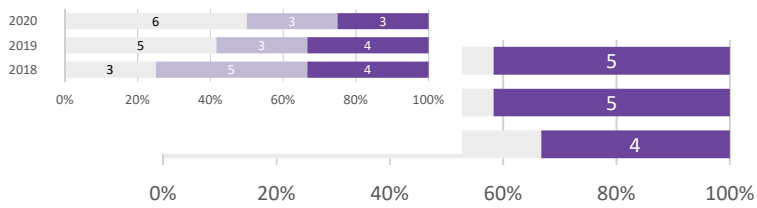
なし



法実施状況 2018-2020年



PFGE	2018年	2019年	2020年
実施	7	7	8
実施していない	5	5	4
IS-PS	2018年	2019年	2020年
実施	8	7	7
実施していない	4	5	5
MLVA	2018年	2019年	2020年
実施	3	5	6
導入予定	5	3	3
実施していない	4	4	3



		2018	2019	2020	回答数
PFGE	実施している	7	7	8	12
	全株	1	1	1	
	一部	6	6	7	
	実施していない	5	5	4	
IS-PS	実施している	8	7	6	12
	全株	2	1	1	
	一部	6	6	5	
	実施していない	4	5	5	
MLVA(O157,O26,O111)	実施している	3	5	6	12
	全株	2	5	6	
	一部	1	0	0	
	実施していない	9	7	6	
	運用に向け試験中、検討中、導入予定	5	3	3	

EHEC MLVA法 フラグメント解析 判定事例集

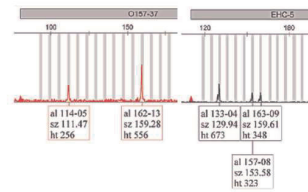
1領域に複数のピークがある

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xl

現象

➢1マーカ領域に2本以上のピークがある

<例>



対応

➢原則、最も高いピークを採用
左例: リピート数13, 右例: リピート数4
➢複数ピークがある旨を備考欄に記載

左例: ピーク2本あり(5/13), 13の方が高い

*同一株を試験しても、施設によってピークの高さが変わることがある(高さの比率はあまり変わらない)

*ピークの高さが同程度であった場合は、試験ごとにピークの高さが変化し、採用するピークが変わることがあるため、奇数回試験して採用回数が多い方を選択する

*複数のピークが出ることは、概ねO157-9, EHC-5, EHC-6, O157-37である

*PCRにおける増幅ターゲットが2カ所以上あることによるものと考えられる

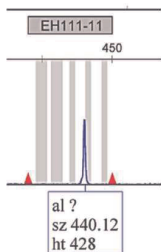
ピークがBinからずれている

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xl

現象

➢ピークがBinからずれて、アレル(al)が『?』になる

<例>



対応

➢一番近いBinを採用する

例: リピート数『4』, と採用する

➢BinとBinのちょうど中間にピークが存在する場合は、必要に応じてsingle PCRを実施する

*ポリマーやバッファー等の消耗品の劣化によって、泳動速度が変化しした可能性があるため、必要に応じて消耗品を交換すること

*リピート数が既知の株を試験して、同様なものがあるかチェックする

*毎回同程度のずれが生じる際は、必要に応じてBinを調整すること

*EH157-12, EH111-11のピークは、ずれやすい傾向がある

*通常 Binを用いてリピート数を算出している施設が理論上の計算式で算出する場合には、既知の株で正しい値が出ることを確認すること

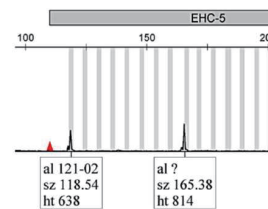
1領域に複数のピーク+Binからずれている

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xl

現象

➢1領域に複数のピークがあり、一部あるいはすべてのピークがBinからピークがずれてアレル(al)が『?』になる

<例>



対応

➢原則一番高いピークを採用
➢採用するピークがBinからずれている場合は、Binからずれたケースと同様に対応

例: リピート数10,

備考として「2本のピークあり(2/10), 10の方が高い, 10はBinからずれていた」

※内部用としての記載。

感染研に送付する際は「2, 10の2本のピークあり」でよいとのこと

他に比べて極端に低いピークがある

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xl

現象

➢他に比べてピークが著しく低い

<例>



対応

➢ピークが必ず出る領域が確認

99%以上の確率でピークが出る領域↓

EH111-11, EH111-8, EH157-12, EHC-1, EHC-2, O157-34, O157-25, O157-19

➢必ず出る領域であればPCR増幅が上手くいっていないか、PCR産物を希釈しすぎている

➢この場合、高さが100以下であっても採用可

*初期検討の段階で、一番高いピークが10000~20000程度に収まるような希釈倍率を検討すること

*EH111-8, O157-34, O157-9はピークが低い傾向

*ピークの高さは、ThermoのPlatinum Multiplex PCR kitで概ね改善する傾向がある(特にEH111-8)

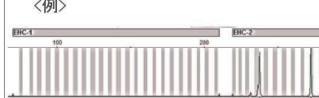
マーカ外と思われるピークがある

事例報告日 2020/01/24
報告機関 北海道東研
報告者 三津橋 和也
使用機器 ABI 3500xl

現象

➢必ず出る領域にピークがなく、次の領域に2本ピークがある

<例>



対応

➢必ずピークが出る領域、複数ピークが出る領域を把握しておく

例:

EHC-2には、ピークが複数出ないため、2本のうちの1本はEHC-1のピークである

↓

2本のうち、EHC-2のBinからずれていて、かつそのサイズがEHC-1の最終Binのサイズにリピートサイズを足していったもの(Binの範囲を考慮した上で)になるのか確認する

↓

208 bp (EHC-1の最終Bin, リピート数23のサイズ)

+ 6 bp (リピートサイズ) x 5回 = 238(237.1~238.9)

⇒ リピート数28 (23+5)

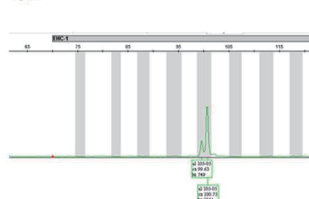
二つに割れたピークの対処法

事例報告日 2020/03/09
報告機関 岩手県
報告者 岩淵智機
使用機器 ABI 3500xl

現象

➢二つに割れたピークがでる

<例>



対応

➢-A/+Aピークであるため、どちらも本物のピーク

*多くのDNAポリメラーゼの性質により、3'末端にアデニン(A)を付加する性質があるが、5'末端の配列に依存して、Aの付加効率が変化するため、-A/+Aピークが検出される。

【対処法】

*リバープライマーの5'末端側に、Tail配列(7塩基:配列非公開)を付加したプライマーを使用→Aの付加を誘導し、+Aの断片を増幅

*蛍光プライマー購入時にTail配列プライマーを購入しなければならない

*その場合、感染研のBinとPanelは修正しなければならない