

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

平成 30～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	山城彩花、石川加奈子
	栃木県保健環境センター	水越文徳、江原 栞
	群馬県衛生環境研究所	河合優子、大場浩美、中野剛志
	埼玉県衛生研究所	佐藤孝志
	千葉県衛生研究所	横山栄二、榎本啓吾、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	井川由樹子、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、尾畑浩魅、齋木 大 原田幸子、平井昭彦

### 研究要旨

異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要なことから、腸管出血性大腸菌 O157 共通菌株を用いた分子疫学解析法の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。PFGE 法、IS 法および MLVA 法について実施した結果、すべての施設で良好な結果であった。

この 3 年間に 11 施設すべてで MLVA による行政検査が実施可能となり、必要に応じて他の自治体間との情報共有と散発事例に対応してきたことがアンケート調査で明らかとなった。その一方で、現状では MLVA は O157、O26、O111 の 3 血清型の解析方法であることから、これまで実施してきた PFGE による精度管理も引き続き必要であるという意見がすべての施設から挙げられた。

3 年間に東京都で検査を実施した腸管出血性大腸菌 1131 株の血清型において、O157 が 733 株（64.8%）と最多で、次いで O26 が 118 株（10.4%）、O121 が 75 株（6.6%）であった。MLVA が実施可能な主要 3 血清型の割合は 76.7%（868 株）で、今後 O121 および O103 においても MLVA が可能となれば、全体の約 90%において効率的な情報の共有化が可能となると思われた。

## A. 研究目的

食品媒介感染症が発生した際に最も重要なことは、感染源・感染経路の早期解明と感染拡大防止である。腸管出血性大腸菌（EHEC）やサルモネラによる食中毒では、散発的集団発生が問題となる可能性があることから、早期解明は重要である。感染経路や原因食材・食品を特定するためには、患者や調理従事者、食材・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。EHEC の解析には、パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法、IS-printing System（IS）法や multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法等が用いられている。

複数の自治体で患者が発生した場合や、他自治体で実施した検査で食品等から菌が分離された場合などは、各地方衛生研究所で分離株の解析を実施し、その検査結果を相互に比較して関連性を判定する必要がある。異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要である。また近年は地衛研の職員も、異動により部署が変わることが多くあることから、技術水準を一定以上に保つ取組みが必要とされている。このことから、各地衛研の技術向上と技術水準を一定以上に保つことを目的として、共通菌株を用いた定期的な精度管理調査を実施した。

さらに、分子疫学解析を用いた病原体解析の現状と今後の方向性についての検討資料とすることを目的に、解析事例について情報収集すると共に、MLVA の実施状況や MLVA を実施する上での問題点についてアンケート調査を行った。

## B. 研究方法

### 1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株を関東ブロックの 11 施設に送付し、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の精度管理を行った。なお、いずれの方法の精度管理も、各施設における検査の実情を考慮し、各検査法について希望参加型とした。

#### 1) 供試菌株

平成 30 年度および令和元年度は、東京都内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 を 4 株用い、さらに令和 2 年度では O26 を 1 株追加した。また、3 年間で精度管理に供試した 4 株の O157 は同一のものを使用し、特に MLVA の検査手技の定着を確認できるようにした。

#### 2) PFGE 法

国立感染症研究所のプロトコールに従って PFGE 法を行い、撮影した写真をファイル化しメール添付で送付後、目視で比較することにより解析を行った。

#### 3) IS 法

キット付属のプロトコールに従って IS 法を行い、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、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。

## 2. 分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査

PFGE 法、IS 法および MLVA 法の実施状況について、関東ブロック内の研究協力施設へアンケートを行った。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 反応を行う上でのマスターミックスの種類、PCR 産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。

## 3. 集団事例、散発事例など、分離された菌株を対象に分子疫学解析を実施した事例についての情報収集

関東ブロック内の研究協力施設で経験した分子疫学解析が活用された事例について、情報収集を行った。また、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。

### C. 研究結果

#### 1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理結果

##### 1) PFGE 法

関東ブロック 9～11 施設で、共通菌株について PFGE 解析を実施し、PFGE 画像ファイルを用いて各施設の比較を行った。0157 の 4 株に関しては、一部では低分子量のバンドが若干不鮮明な施設が認められたが、いずれの施設ともバンドの分離は良好であった。しかしながら、3 年目に実施した 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 1）。

##### 2) IS 法

IS 法の解析を実施した結果、1<sup>st</sup> primer set では菌株 No.1 および 3 において分子量の大きい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（2020 年）であった。また菌株 No.2 の 2 番目と 3 番目のバンドの間にあるエキストラバンドおよび 14 番目と 15 番目の間に存在するエキストラバンドの報告があった施設はそれぞれ 8 施設および 7 施設であった。特徴的なエキストラバンドを報告していなかった施設が数施設あったが、3 年間ともいずれも良好な結果であった。

また、2<sup>nd</sup> primer set では、1, 2 年目ではいくつかのエキストラバンドが確認された施設が複数存在したが、3 年目ではすべての施設で結果が一致し、手技の定着が確認できた（写真 2）。

##### 3) MLVA 法

関東ブロック 9～10 施設が MLVA の精度管理を実施した。No.1 の菌株に関しては、3 年間ともすべての施設で結果が一致した。No.2 及び 3 の菌株は、1, 2 年目は 17 領域中 1 領域だけ異なっていた施設が各年 1 施設で認められたが、3 年目にはすべての施設で一致した結果が得られた。その一方で、菌株 No.4 では、17 領域中 1 領域の違いが 4～5 施設で認められたが、概ね一致した成績が得られた。また、最終年に実施した O26 については、全ての施設で一致した結果が得られた（表 1）。

各施設で得られたピークの高さと PCR 産物の希釈倍数を報告してもらい比較した結果、いずれの菌株でも高いピークは 30,000 以上を示す施設がある一方、低いピークでは 100 程度であった。この様に判定する際のピークの高さには施設間で違いが認めら

れた。

## 2. 分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査

関東ブロック 11 施設を対象に、各年、遺伝子解析法実施状況に関するアンケート調査を実施した。

PFGE 解析および IS 法に関しては、従来から実施していたこともあり、当初、11 施設中 8~10 施設で実施していたが、MLVA 導入が進むにつれて、IS 法の実施施設が減少していることが明らかとなった。

MLVA 法においては、当初、11 施設中 9 施設で実施されており、実施 9 施設中 6 施設では全数の解析を行っていたが、年々、全数の解析を実施する施設が増加していることが明らかとなり、これまで以上に MLVA の精度管理の必要性が求められる結果となった(図 1)。MLVA 法における 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。また、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、約 500 倍が 1 施設となり、施設間でさまざまであった。

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、最多が成績書を作成し報告との回答が 7 施設から得られ、電話連絡に留めている施設が 2 施設であった。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。

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であること、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。

## 3. 集団事例、散発事例など、分離された菌株を対象に分子疫学解析を実施した事例についての情報収集結果

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

3 年間に東京都で検査を実施した腸管出血性大腸菌 1131 株の血清型は、最多は O157 が 733 株 (64.8%)、次いで O26 が 118 株 (10.4%)、O121 が 75 株 (6.6%) であった(表 2)。うち 2018 年に食中毒と断定されたのは O157 が 6 事例、O121 が 1 事例、2019 年では、O157 が 4 事例、O103 が 1 事例、2020 年は O157 が 1 事例と 3 年間で 13 事例であった。また、OUT(血清型別不能)であったものが、2018 年は 17 株 (3.6%)、2019 年は 24 株 (6.8%)、2020 年は 28 株 (9.2%) と年々増加する傾向が認められた。

MLVA が有効に活用されたものとして、2018 年に発生した O157 (VT1&2 産生)では都内ホテル A のbuffet利用者 194 名の

集団食中毒において MLVA 型が 18m0192 と確定された事例があったが、その後、同一 MLVA 型が他のホテル従業員からも検出された。このホテル従業員は、ホテル A のbuffetを利用していなかったことから、両施設で使用されていた食材が原因と推定され MLVA により原因究明が容易になった事例を経験した。

その一方で、MLVA だけではなく、PFGE 等の他の解析方法も活用し、有用な疫学情報となった事例として、2019 年に焼肉店利用者 60 名から O157 が検出される事例が発生した。O157 検出者は少なくとも 27 自治体から報告され、散発的集団発生が疑われた。関東ブロックの 6 地方衛生研究所でも患者が確認されていることから、該当施設で IS 法および PFGE 法を実施し比較を行った。東京都は患者 3 名由来株と食品 1 検体から分離された 16 株を供試した。6 地研から検出された 28 株の疫学解析結果から PFGE および IS 法の結果は全て一致したが、MLVA 型が 1~2 領域異なっていた。聞き取り調査等の結果も併せて同一クローン由来株であると推定されたが、MLVA 法は PFGE 法や IS 法に比べて多様性を示しやすい傾向があることから、必要に応じて PFGE 法、IS 法と併せることでの確かな判断が可能となった事例も認められた。

## 2) 他の自治体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

2018 年に腸管出血性大腸菌による横浜市管内の食中毒の調査において、MLVA 型が一致もしくは 1 遺伝子座違いであった場合に、行動や症状等の他の疫学情報と併せて食中毒の判断を行ったものが 3 事例あった。いずれも EHEC O157 (VT1&2 産生) が原因菌であった。

2019 年には千葉県における腸管出血性大腸菌による集団食中毒事例において、O 群不明である株に対し、PFGE 解析を行い、集団食中毒事例のクラスターに分類できた事例を経験した。搬入された菌株は、36 株が O103 (VT1) で、3 株は O 群不明株であった。高校生由来株を含めて PFGE 解析を行った結果、O 群不明株も含めて同じクラスターに分類された。また、2019 年に茨城県の飲食店 A で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例で疫学解析が活用された。飲食店 A で喫食歴のある 7 名と喫食歴の無い 1 名について MLVA を行ったところ、喫食歴有りの 7 株がすべて一致した。

## D. 考察

平成 30 年度から令和 2 年度の 3 年間で、研究協力施設 11 施設のうち担当者の変更があったものは 5 施設あり、このうち 2 施設は毎年担当者の変更があった。近年は地研の職員も、異動により部署が変わることが多くあり、技術レベルを一定以上に保つための取り組みが必要と考えられた。特に病原体の分子疫学解析では、異なる検査施設での結果を比較し、判定する必要も出てくることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることは重要といえる。3 年間の共通菌株を用いた精度管理において、年々、手技の定着がなされていることが明らかとなり、定期的な精度管理の実施により各自自治体間で安定した情報共有が可能となると思われた。また、今後の課題として、広域散発を早期に探知するためのネットワークの構築や PFGE 法の細かい部分も含めた操作手順の統一化を図ること、さらには次世代シーケンサーに関する最近分野での解析への利用方法の検討も求められる。

東京都の場合、3年間で MLVA が実施可能な主要 3 血清型の割合は 76.7% (868 株) で、今後 O121 および O103 においても MLVA が可能となれば、全体の約 90%において効率的な情報の共有化が可能となると考えられた。

#### E. 結論

共通菌株を用いた精度管理により、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の検査・解析レベルが一定以上であることが判明した。

アンケート調査の結果、MLVA を行政活用した事例を各施設で経験していることが判明し、年々、実施施設数が増加していることが判明した。また、検出頻度が少ない血清型の腸管出血性大腸菌に関しては、従来通り PFGE を用いる必要のあることから、MLVA だけでなく PFGE の精度管理も継続していく必要があるといえる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

- 1) 小西典子, 原田幸子, 尾畑浩魅, 河村真保, 鈴木淳, 貞升健志: 2017年に東京都で発生した Diffuse outbreak と分子疫学解析、第 39 回 食品部生物学会、平成 30 年 9 月、大阪府
- 2) 原田幸子, 小西典子, 尾畑浩魅, 河村真保, 鈴木康規, 鈴木淳, 貞升健志: 2017年に発生した腸管出血性大腸菌による散発事例由来株の SNP 解析、第 31 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、平成 31 年 2 月、千葉市
- 3) 佐藤孝志, 松下明子, 塚本展子, 砂押

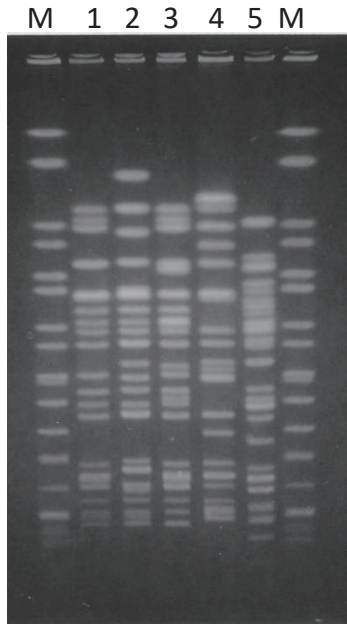
克彦, 福島浩一, 倉園貴至: 埼玉県で分離された腸管出血性大腸菌の解析について—MLVA 法を中心に—、第 31 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、平成 31 年 2 月、千葉市

- 4) 小西典子, 原田幸子, 尾畑浩魅, 河村真保, 山梨敬子, 小野明日香, 齊木大, 前田雅子, 赤瀬悟, 門間千枝, 畠山薫, 鈴木淳, 貞升健志: 2018年に東京都で分離された腸管出血性大腸菌の特徴と食中毒事例、第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、令和元年 11 月、松山市
- 5) 小西典子, 河村真保, 尾畑浩魅, 山梨敬子, 小野明日香, 原田幸子, 齊木大, 前田雅子, 赤瀬悟, 門間千枝, 畠山薫, 鈴木淳, 貞升健志: 東京都内で発生した腸管出血性大腸菌 O121 による食中毒事例とその検査法、第 31 回日本臨床微生物学会総会学術集会、令和 2 年 2 月、金沢市
- 6) 長岡宏美, 大越魁, 鈴木香菜, 小川紋, 水元嗣郎, 森主博貴, 神田隆, 岩佐浩行, 山田裕貴, 中嶋郁子, 岩佐裕子, 久川祐稔: Diffuse outbreak が疑われた VT 産生 O145 による胃腸炎事例、第 32 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会、令和 2 年 2 月さいたま市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

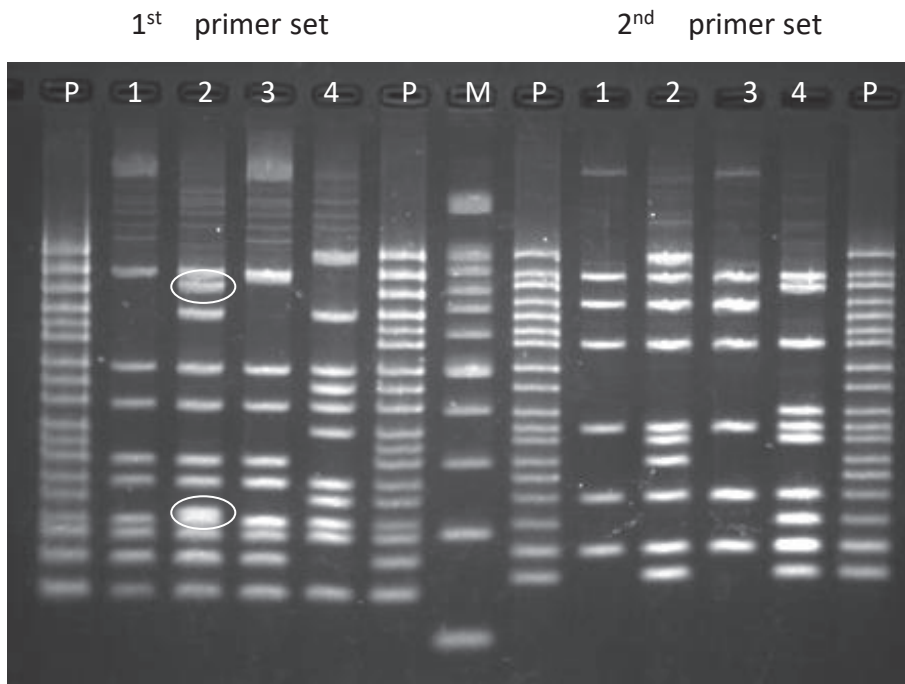
写真1. 共通菌株のPFGEパターン



レーン1~4 : O157  
レーン 5 : O26

- 概ね判定し易いシャープな泳動像が得られていた。
- 低分子量のバンドが判定し難い写真が認められた。
- O26の173.4Kb~398.4Kbの分離については、
- 判定がやや困難である施設が認められた。
- 担当者の異動があった施設でも技術継承が行われていた。

写真2. 共通菌株のIS-printing System解析像



- 1<sup>st</sup> primer setの2番目と3番目の間にエキストラバンドがある。
- 1<sup>st</sup> primer setの14番目と15番目の間にエキストラバンドがある。



エキストラバンドを判定できることが必要  
電気泳動時間が短いと判定が困難である。

表1. 共通菌株のMLVA成績

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

\*複数にピークあり (3or7or15)

図1. EHECを対象とした分子疫学解析実施施設数 (関東ブロック)

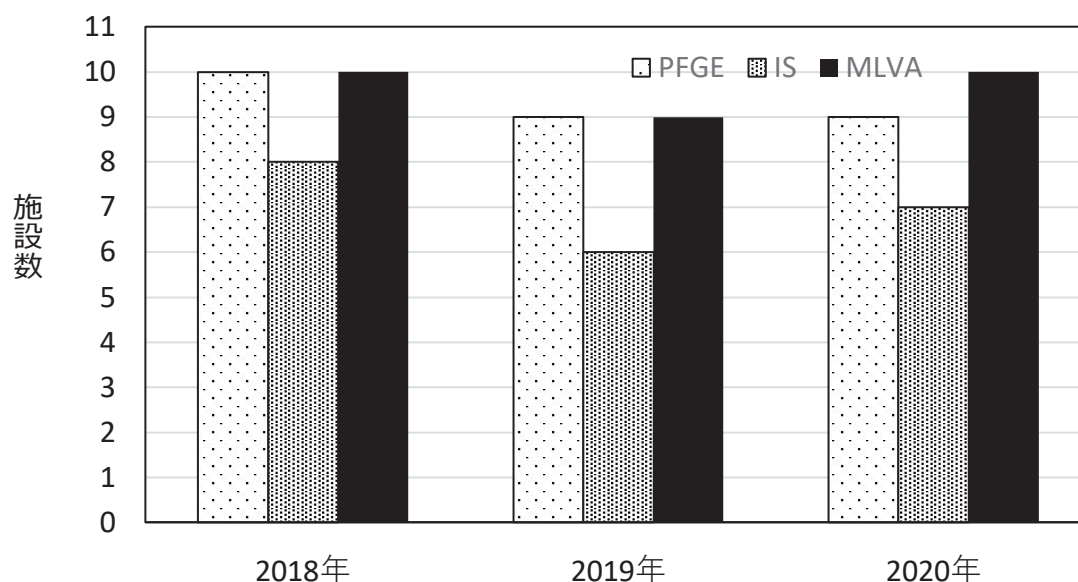


表2. 東京都で分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌 (2018年~2020年)

血清群	菌株数	(%)	血清群	菌株数	(%)
O157	733	(64.8)	O8	3	(0.3)
O26	118	(10.4)	O55	2	(0.2)
O121	75	(6.6)	O78	2	(0.2)
OUT	69	(6.1)	O124	1	(0.1)
O103	45	(4.0)	O125	1	(0.1)
O111	35	(3.1)	O63	1	(0.1)
O91	12	(1.1)	O15	1	(0.1)
O145	12	(1.1)	O112	1	(0.1)
O128	9	(0.8)	O152	1	(0.1)
O146	5	(0.4)			
O115	5	(0.4)	合計	1131	