

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による腸管出血性大腸菌分子疫学解析法の精度管理及び分子疫学手法活用に関する研究

研究分担者 松本昌門、山田和弘 愛知県衛生研究所
研究協力者 高橋佑太 愛知県衛生研究所
木全恵子 富山県衛生研究所
木村恵梨子、塩本高之 石川県保健環境センター
岩崎理美、東方美保 福井県衛生環境研究センター
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所
野田万希子 岐阜県保健環境研究所
信田充弘 岐阜市衛生試験所
永井佑樹 三重県保健環境研究所
山本新也、石黒亜基子 豊橋市保健所衛生試験所
中根千鶴、中根邦彦 岡崎市総合検査センター
多和田光紀 豊田市衛生試験所

研究要旨

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所（地衛研）、及び衛生試験所、以下各地研）において、腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学解析法の精度管理を実施した。平成 30 年度には EHEC のみならず全ての食中毒菌に適用可能で、最も汎用性に優れている pulsed-field gel electrophoresis（PFGE）法の精度管理を、令和元年度には迅速・簡便な方法として各地衛研で汎用されている IS-printing system（IS-PS）の精度管理を、令和 2 年度には EHEC 3 血清型（0157、026、0111）に対する分子疫学解析法である Multiple-Locus Variable numbers tandem repeats analysis（MLVA）法についての精度管理を実施した。MLVA 法の精度管理のみ、11 施設のうち既に MLVA 法が実施可能な 8 施設に対して実施した。また、令和 2 年度には愛知県内の中核市 3 市に対して、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施した。愛知県内東海・北陸ブロックで分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を行った。

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

11 施設から送付された 0145、0121 計 3 株の PFGE 泳動図について解析を行った結果、その相同性は菌株 1 は 96.8%、菌株 2 は 96.5%、菌株 3 は 97.8%であった。過去に研究班活動として行った PFGE 精度管理では 3 年間の研究期間のうち特に 1 年目ではその相同性は低く 80%を下回ることも多々あった。5 年以上の間 PFGE 精度管理を行っておらず、かつ研究期間の 1 年目であることを考えると、今回は優れた結果が得られている。これは当研究班のこれまでの活動によるものと考えられるが、各施設で発生した食中毒事例の分子疫学解析に PFGE を使用していることも大きな要因であると思われる。

2. 分子疫学手法を用いて解析した事例の報告

今年度は 2 事例の報告があった。ひとつは腸管出血性大腸菌 0157（VT1VT2）による事例で当該施設が MLVA による遺伝子型別を実施した事例であった。もうひとつは腸管毒素原性大腸菌 025 による食中毒事例であった。地方衛生研究所で PFGE を実施し、解析結果を県内関係自治体に報告した。特に後者では東海・北陸ブロック内で連携して分子疫学解析を実施した好例となったと思われる。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

1st set : 検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。2nd set : 検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 についても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設で概ね良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認をおこなうことが重要である。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

118 株の 0157 は 106 MLVA 型に、42 株の 026 は 37 MLVA 型に型別することができた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *Escherichia albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てにおいて 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた。

令和 2 年度

1. MLVA 法精度管理

各施設から提出された MLVA 法実施結果の各領域のリポート数を比較したところ、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックの MLVA 法の検査精度は良好であった。しかし、各施設における MLVA 法で得られるピークの高さには大きな差がみられ、判定に苦慮すると考えられる程度にピークが低い検体もあった。ピークの高さの施設ごとの差は使用するシークエンサーの違いや PCR 酵素及びプライマー濃度等の反応時点での違い等が考えられ、各施設で安定した結果を得ることを可能にすることは今後の課題であると考えられた。また、出力したファイルの貼り付けと結果の確認のみで、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすることが可能な記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

2. MLVA 法導入研修の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。今後も MLVA 法に関して、担当者間での情報共有が重要であり、研修会等の開催も継続的に必要であると考えられた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った。その結果、分離株全てにおいて 95%程度の相同性があった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）は死亡に至ることもある腸管感染細菌として、公衆衛生上対策を必要とする主要な病原体の一つである。EHEC はいわゆる食中毒の原因菌であると共に、食品を介した diffuse outbreak 例も報告されている。diffuse outbreak は散発事例に紛れることが多く、発見が困難であるため、対策には迅速な分子疫学解析と、情報共有が重要となる。東海・北陸ブロックはこれまでの研究班活動として、分子疫学手法である pulsed-field gel electrophoresis（PFGE）及び IS-printing system（IS-PS）の精度管理を行ってきた。その結果、EHEC による集団事例発生時には各自治体が迅速かつ正確に PFGE 及び IS-PS を実施し、その結果を食品衛生行政に還元することが可能となった。

PFGE 法は手技が煩雑で実施に時間がかかるが、EHEC のみならず全ての食中毒菌に適用可能で、最も汎用性に優れている分子疫学解析法である。IS-PS は PCR 型別法であることから、迅速・簡便な方法として各地衛研で汎用されているが、0157 のみにしか使用できない。また 2018 年 6 月、厚生労働省から事務連絡「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」（MLVA 事務連絡）が発出され、腸管出血性大腸菌（EHEC）の遺伝子型別法を反復配列多型解析法（Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis；MLVA）に統一することとなり、地衛研において MLVA の導入が進められている。MLVA は、繰り返し配列を含む複数の遺伝子座から得られた PCR 産物について、それぞれの分子量に基づいて算出したリピート数を比較する方法である。数字のみでの比較が可能のため、他施設での実施結果と比較が容易といった利点があるが、数字のみの結果を比較するため、実施施設での検査の精度が保証されていることが必要となる。

そこで、平成 30 年度には最も汎用性に優れている PFGE の精度管理を、令和元年度には迅速・簡便な PCR 型別法である IS-PS の精度管理を、令和 2 年度には EHEC 3 血清型（0157、026、0111）に対する分子疫学解析法である MLVA 法に

ついての精度管理を実施し、東海・北陸ブロックの検査精度の保持・向上を目的とした。

また、令和元年度には愛知県衛生研究所（愛知衛研）で実施した EHEC 保存株（0157 及び 026）の MLVA 解析の結果報告を、令和 2 年度には MLVA 法を導入する予定の施設に対し、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施することで、MLVA 法の導入を推進した。さらに、平成 30 年度から令和 2 年度の各年度において、東海・北陸ブロックにおいて分子疫学手法を用いて解析した事例の報告も行った。

B. 研究方法

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

愛知衛研から 11 施設に EHEC 3 株（菌株 1,2：腸管出血性大腸菌 0145 2 株、菌株 3：0121 1 株）また、必要な施設には分子量マーカーとして *S. Braenderup* H9812 も配布した。タイムスケジュールは平成 30 年 9 月、分与願及び菌株送付のためのパソパック、ジュラルミンケースの事前送付を各施設に依頼した。平成 30 年 10 月、菌株を各施設に送付した。平成 30 年 12 月、各施設から泳動図の送付及び分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を愛知衛研に行った。当所では PFGE 泳動図の解析を実施した。また、分離菌株についての研究を行い、患者情報は利用しなかった。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

愛知衛研から 11 施設（地衛研 8 カ所、愛知県内中核市保健所及び衛生試験所 3 カ所）に 3 件の腸管出血性大腸菌 0157 抽出 DNA と試薬（IS-PS（東洋紡社））を配布した。タイムスケジュールは令和元年 11 月に抽出 DNA と試薬の配布、12 月に結果提出とし、当所で IS-PS 泳動図の解析を実施した。配布 DNA のエキストラバンドは検体 No1 では 2 本（1-2 と 1-3 の間と 1-14 と 1-15 の間）、検体 No2, 3 はエキストラバンド 1 本（1-14 と 1-15 の間）（図 1 及び図 2 参照）である。分離菌株についての研究を行い、患者情報は利用しなかった。

令和 2 年度

1. MLVA 法精度管理

愛知衛研から 7 施設（地衛研 4 カ所、愛知県内中核市保健所及び衛生試験所 3 カ所）に試薬（Qiagen Multiplex PCR kit）、リピート数未知 EHEC 抽出 DNA（0.5ng/ μ L）4 検体（O111 1 検体、O157 2 検体及び O26 1 検体）、リピート数既知 EHEC 抽出 DNA（0.5ng/ μ L）3 検体（O157 2 検体及び O26 1 検体）、MLVA 実施手順書（別添）及び MLVA 結果判定用エクセルファイルを配布した。配布した精度管理株のリピート数を表 1 及び表 2 に示した。各施設において、配布 DNA に対して MLVA 法を実施し、MLVA 手順書に従い、GeneMapper からエクスポートした結果を MLVA 結果判定用エクセルシートに結果を貼り付け、当所へメールでの返答を依頼した。令和 2 年 10 月に抽出 DNA 及び試薬を各施設に送付し、11 月に返信された解析結果を当所にてまとめた。また、MLVA 法に使用する PCR 使用機器、PCR 使用酵素、PCR 産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。アンケートの内容を表 3 に示す。なお、本研究においては分離菌株抽出 DNA のみを用いており、患者情報は利用していない。

2. MLVA 法導入研修の実施

MLVA 法の導入を予定している愛知県内中核市の 3 施設 4 名を対象として、令和 2 年 6 月 25 日・26 日の 2 日間で、MLVA 導入研修を愛知衛研にて開催した。研修は愛知衛研職員が講師を担当し、MLVA 法の原理及び実際の手順に関する講義の後、EHEC 抽出 DNA 4 件を使用した実習を行った。

C. 研究結果及び D. 考察

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

菌株 1（O145）の解析結果は、9 施設の泳動図が相同性 100%であった。残り 1 施設との相同性は 96.8%であった（図 3）。相同性 100%とならなかった 1 施設は図 3 の○で囲んだ低分子量の領域で 9 施設はバンドが 2 本認識できたが、1 本のみしか認識できなかった。

菌株 2（O145）では、複数の施設を含むクラスターが 2 つ認められた（図 4）。1 つは 7 施設

の泳動図を含むクラスターでもうひとつは 2 施設が含まれるクラスターであった。これら 2 つのクラスターの相同性は 97.4%であった。また、残り 2 つの施設はクラスターを形成せず、互いの相同性は 97.3%であった。さらにこれら 2 施設と 2 つのクラスターとの相同性は 96.5%であった。相同性に影響したバンドは○で囲んだ 2 つの低分子量領域で 7 施設がクラスターを形成した泳動図ではそれぞれ 2 本のバンドが認識できるが、残り 4 施設ではいずれかの○の領域でバンドが 1 本のみであった。

菌株 3（O121）の解析結果では 8 施設の泳動図は相同性 100%でクラスターを形成し、残り 3 施設も相同性 100%でクラスターを形成していた（図 5）。また、互いのクラスターの相同性は 97.8%であった。相同性に影響したと思われる領域は○で囲んだ低分子量領域で施設によってバンドが 3 本から 4 本認識された。

過去に研究班活動として行った PFGE 精度管理では 3 年間の研究期間のうち特に 1 年目ではその相同性は低く 80%を下回ることも多々あった。今回、5 年以上の間 PFGE 精度管理を行っておらず、かつ研究期間の 1 年目であることを考えると、今回の結果は優れた結果であると言える。これは当研究班のこれまでの活動によるものと考えられるが、各施設で発生した食中毒事例の分子疫学解析に PFGE を使用していることも大きな要因であると考えられる。

2. 分子疫学手法を用いて解析した事例の報告

事例 1：平成 30 年 7 月食中毒として届出された腸管出血性大腸菌 O157(VT1VT2)による事例。当該施設が MLVA による遺伝子型別を実施した。その結果、感染者 4 名の MLVA 型は全て一致し、同一感染源による集団感染事例と判断したが、感染源は不明であった。菌株を国立感染症研究所細菌第 1 部に送付し解析を依頼した。本事例の MLVA 型は 2018 年 10 月現在、他県において同一 MLVA 型の報告はなかった

事例 2：平成 30 年 8 月発生した腸管毒素原性大腸菌 O25 による食中毒事例。原因施設は仕出し弁当製造施設で有症者 150 名であった。食中毒として行政処分後、地衛研で PFGE を実施し、解析結果を県内関係自治体に報告した（図 6）。

東海・北陸ブロック内で連携して分子疫学解析を実施した好例となったと考えられた。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

・1st set

検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。

・2nd set

検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。具体的には 1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 に関しても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。具体的には 1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。

使用した電気泳動装置は Multina DNA1000、QIAxcel DNA Screening Kit (AM320) 及びミニゲルであった。ミニゲルを使用した施設は 3% NuSieveGTG Agarose を使用し泳動条件は 100V・70 分であった。

以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設で概ね良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認を行うことが重要である。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

愛知県衛生研究所において、保存株について MLVA 解析を実施した。その結果、0157 118 株は 106 MLVA 型に、026 42 株は 37 MLVA 型に型別された。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *Escherichia albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てが 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた (図 7) ま

た、2 つの食中毒事例を起こした *E. albertii* の PFGE 型が異なっていたことからその感染源が異なることが示唆された。

令和 2 年度

1. MLVA 法精度管理

各施設から提出された MLVA 法実施結果及び当所で実施した MLVA 法実施結果の各領域のリピート数を比較した。比較結果を表 4 に示す。検体 No.1 (0111) では 8 施設中 1 施設で結果が不一致であった。一致していなかった領域は 0157-34 であり、7 施設においてリピート 3 と回答があったところ、不一致であった 1 施設においてはバンドが検出されなかった。検体 No.2 (0157)、検体 No.3 (026) 及び検体 No.4 (0157) では全施設で結果が一致した。

bin set のずれがみられたのは 1 施設あり、目視による修正を実施したと報告があった。ずれがみられた領域は検体 No.1 の 2 領域 (EHC-2 及び EH111-11)、検体 No.2 の 1 領域 (EH157-12) 及び検体 No.4 の 1 領域 (EH157-12) であった。目視による修正後の結果は他施設と一致していた。各施設における MLVA 法で得られるピークの高さには大きな差がみられた。2 領域 (EH111-8 及び 0157-9) では、判定に苦慮すると考えられる程度にピークが低い検体もあった。ピークの高さの施設ごとの差は使用するシーケンサーの違いや PCR 酵素及びプライマー濃度等の反応時点での違い等が考えられた。今回の精度管理においては、ピーク高さの違いによる判定不一致は見られなかったが、今後、低ピークをノイズとして判定することによる誤判定をしてしまう可能性はある。各施設で安定した結果を得ることを可能にすることは今後の課題であると考えられた。

アンケートの結果を表 6 に示す。PCR 使用機器は Applied Biosystems Veriti が 4 施設、BioRad T100 が 1 施設、GeneAmp PCR System 9700 が 1 施設、SimpliAmp サーマルサイクラーが 1 施設、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ TP600 が 1 施設であり、全ての施設で Ramp rate についての回答はなかった。PCR 使用酵素は QIAGEN Multiplex PCR kit を使用しているのが 7 施設、QIAGEN Multiplex PCR plus kit を使用しているのが 1 施設であった。PCR 産物の希釈

倍率は 50 倍希釈が 2 施設、100 倍希釈が 5 施設あり、1 施設では 100 倍希釈で実施後、ピーク高さを見て希釈倍率を 20 から 50 倍で調整していた。使用シークエンサーは 3500 Genetic Analyzer Series が 7 施設、SeqStudio が 1 施設であった。データ解析時使用 Bin set は全ての施設において、感染研から配布された Bin set を使用していた。陽性コントロールの使用頻度は毎回使用しているのが 3 施設、結果に違和感を覚えたときに使用するのが 4 施設、使用していない施設が 1 施設であった。陽性コントロールは自施設での検査精度を確認するうえで重要となるため、できる限り使用することが望ましいと考えられる。ピークとして判定する高さは自施設で閾値を設定して判定している施設が 3 施設、陽性コントロールを参考にする判定とした施設が 2 施設あり、それ以外に波形、stutter peak、pull-up peak 等から判定している施設や、ピーク高さが低かった場合に再試験を実施する施設があった。MLVA 法の実施に関する機器や試薬に関する回答に比べ、判定に関する回答内容は多岐にわたっており、判定に関する研修や判定の統一プロトコルの作成等を行うことが、今後必要となると考えられた。

今回の精度管理では MLVA 結果判定用エクセルファイルも同時に配布したため、領域等の転記ミス等の人的ミスは見られなかった。本ファイルではエクセルの VLOOKUP 関数や VALUE 関数を利用して、GeneMapper での解析結果を MLVA 事務連絡別添 2 ファイル中の領域順へと並べ替えをしている。エクセルファイルの一部を表 6 に示す。MLVA 法は数字のみでの比較が可能な方法であるため、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすことが重要である。そのため、出力ファイルの貼り付けと結果の確認のみですむ MLVA 結果判定用エクセルファイル等の記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

以上の結果、ピークの大小の差はあったが、リピート数が大きく外れていた施設は認められず、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックの MLVA 法の検査精度は良好であると考えられた。

2. MLVA 導入研修会の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。特に GeneMapper の使用方法及びデータのエクスポート方法に関する実習が、今後のためになったとの意見が多く聞かれた。今後も MLVA 法に関して、担当者間での情報共有が重要であると考えられた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った (図 8)。その結果、分離株全てが 95%程度の相同性があった。

E. 結論

平成 30 年度

1. PFGE 精度管理

11 施設から送付された 0145、0121 計 3 株の PFGE 泳動図について解析を行った結果、その相同性は 96.8%、菌株 2 は 96.5%、菌株 3 は 97.8%であった。今回、5 年以上の間 PFGE 精度管理を行っておらず、かつ研究期間の 1 年目であることを考えると、今回の結果は優れた結果であった。

2. 分子疫学手法を用いて解析した事例の報告

今年度は 2 事例の報告があった。ひとつは腸管出血性大腸菌 0157(VT1VT2)による事例で当該施設が MLVA による遺伝子型別を実施した事例であった。もう 1 事例の腸管毒素原性大腸菌 025 による食中毒事例においては、地衛研で PFGE を実施し、解析結果を県内関係自治体に報告した。特に後者では東海・北陸ブロック内で連携して分子疫学解析を実施した好例となったと思われる。

令和元年度

1. IS-PS 精度管理

・1st set

検体 No1 では 3 施設が 1-2 と 1-3 の間のエキストラバンドを 1-3 と判定していた。また、1 施設は 1-14 と 1-15 の間のエキストラバンドを 1-15 と判定していた。検体 No2, 3 に関しては全施設誤判定はなく一致していた。

・2nd set

検体 No1 では 9 施設では正しく報告されたが、2 施設は不一致であった。1 施設は 2-2 と 2-3 の間の判定が誤っていた。また、1 施設は単純な入力ミスであった。検体 No2, 3 についても 9 施設では正しく報告されたが、2 施設が不一致であった。1 施設では 2-1 と 2-2 の間のエキストラバンドを 2-1 と判定していた。1 施設は単純な入力ミスであった。

以上の結果から東海・北陸ブロック全 11 施設で概ね良好な結果が得られた。しかし、注意点として 1) よく確認されるエキストラバンドを認知していること。2) 高サイズ領域のバンドの判定を慎重に行うこと。3) エクセルシートへの入力の際は、複数人で結果の確認を行うことが重要であると考えられた。

2. 腸管出血性大腸菌の MLVA 解析

愛知県衛生研究所において、保存株について MLVA 解析を実施した。その結果、0157 118 株は 106 MLVA 型に、026 42 株は 37 MLVA 型に型別された。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された 2 つの *E. albertii* 食中毒等事例について PFGE 解析を行った。その結果、事例 1 は分離株全てが 95%以上の相同性があった。事例 2 では分離 5 株のうち、4 株は遺伝子型が一致したが、1 株は大きく遺伝子型が異なっていた。

令和 2 年度

1. MLVA 法精度管理

各施設から提出された MLVA 法実施結果の各領域のリポート数を比較したところ、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックの MLVA 法の検査精度は良好であった。しかし、各施設における MLVA 法で得られるピークの高さには大きな差がみられ、判定に苦慮すると考えられる程度にピークが低い検体もあったことから、各施設で安定した結果を得ることを可能にすることが今後の課題であると考えられた。

また、出力ファイルの貼り付けと結果の確認のみで、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすことが可能な記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

2. MLVA 導入研修会の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。今後も MLVA 法に関して、担当者間での情報共有が重要であり、研修会等の開催も継続的に必要であると考えられた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った。その結果、分離株全てが 95%程度の相同性があった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

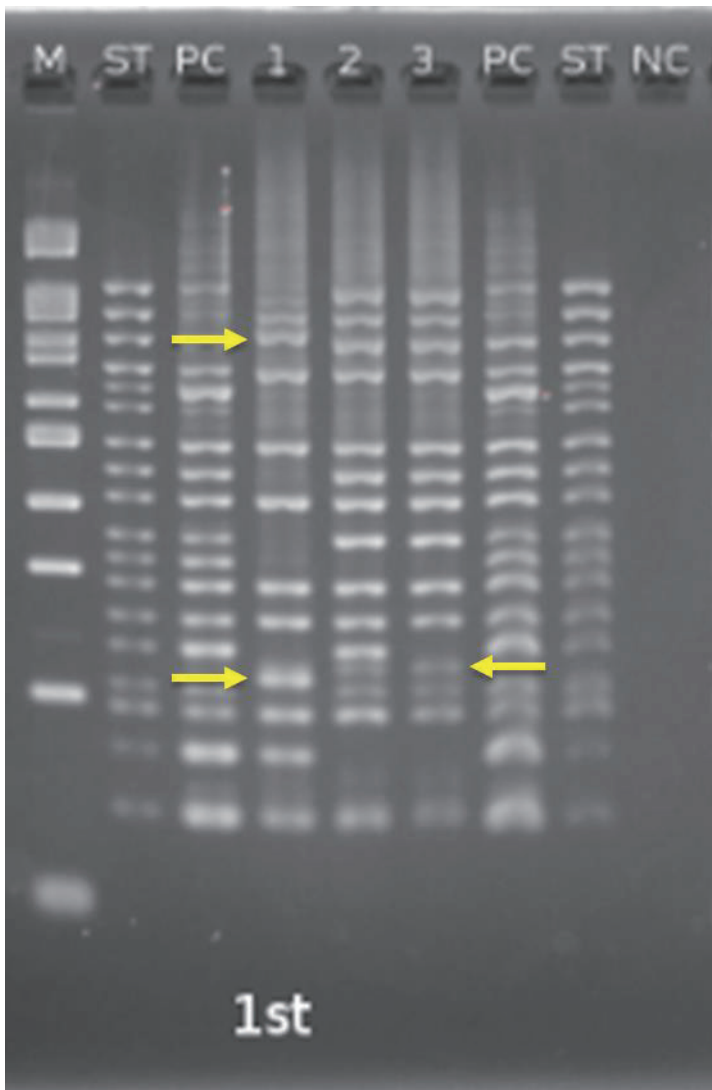


図1 配布株 IS パターン (1st set)

矢印：非特異バンド、M：分子量マーカー、ST：全バンドパターン、PC：陽性コントロール、1 から 3：検体

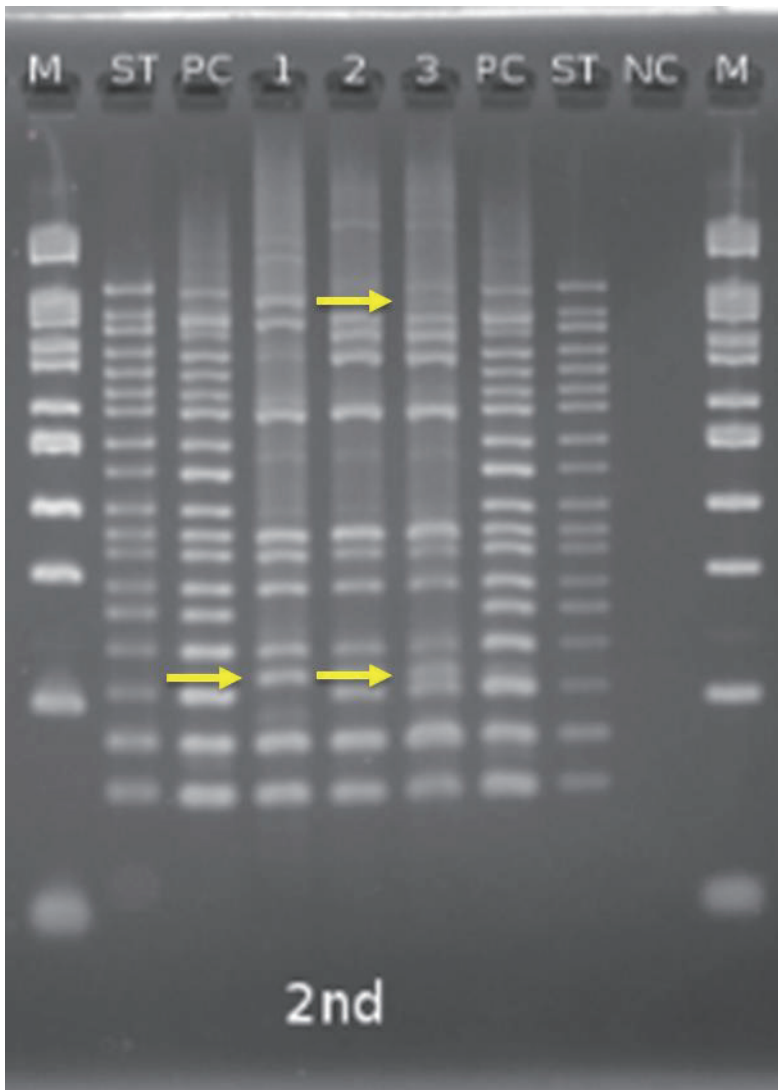


図2 配布株 IS パターン (2nd set)

矢印：非特異バンド、M：分子量マーカー、ST：全バンドパターン、PC：陽性コントロール、1 から 3：検体

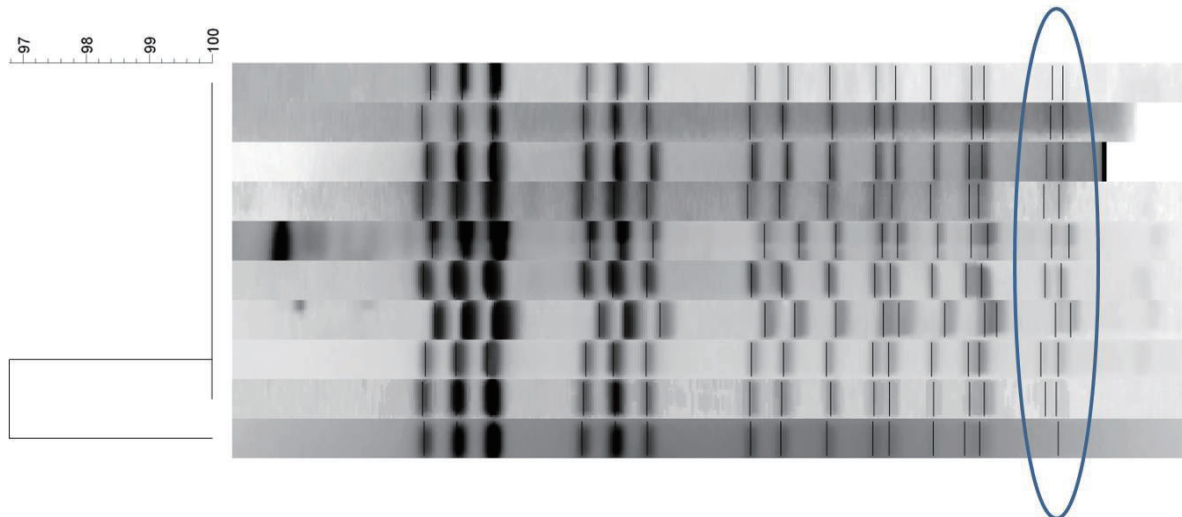


図 3 菌株 1 (0145) の系統樹解析

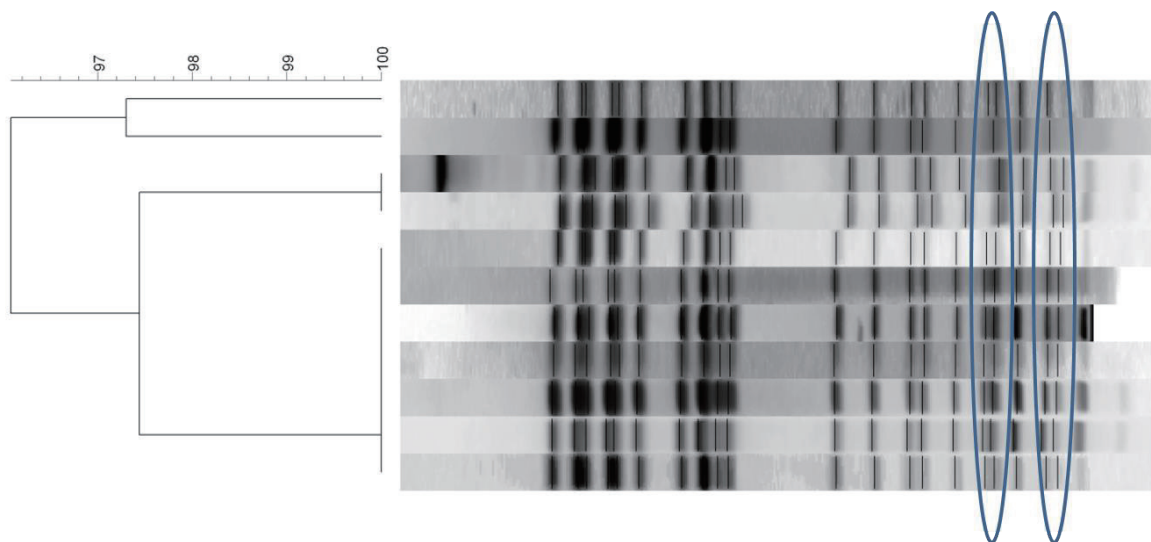


図 4 菌株 2 (0145) の系統樹解析

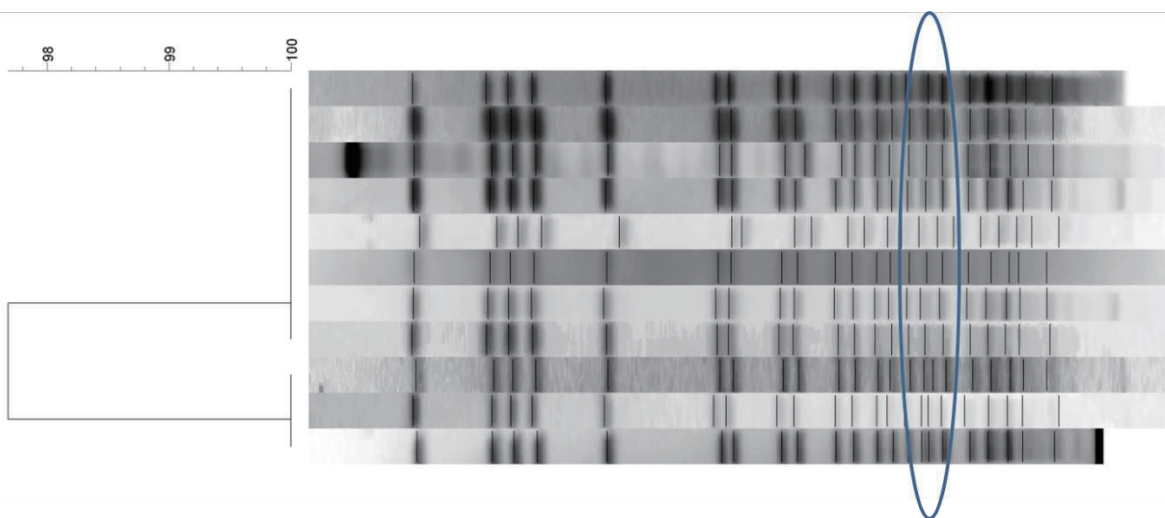


図 5 菌株 3 (0121) の系統樹解析

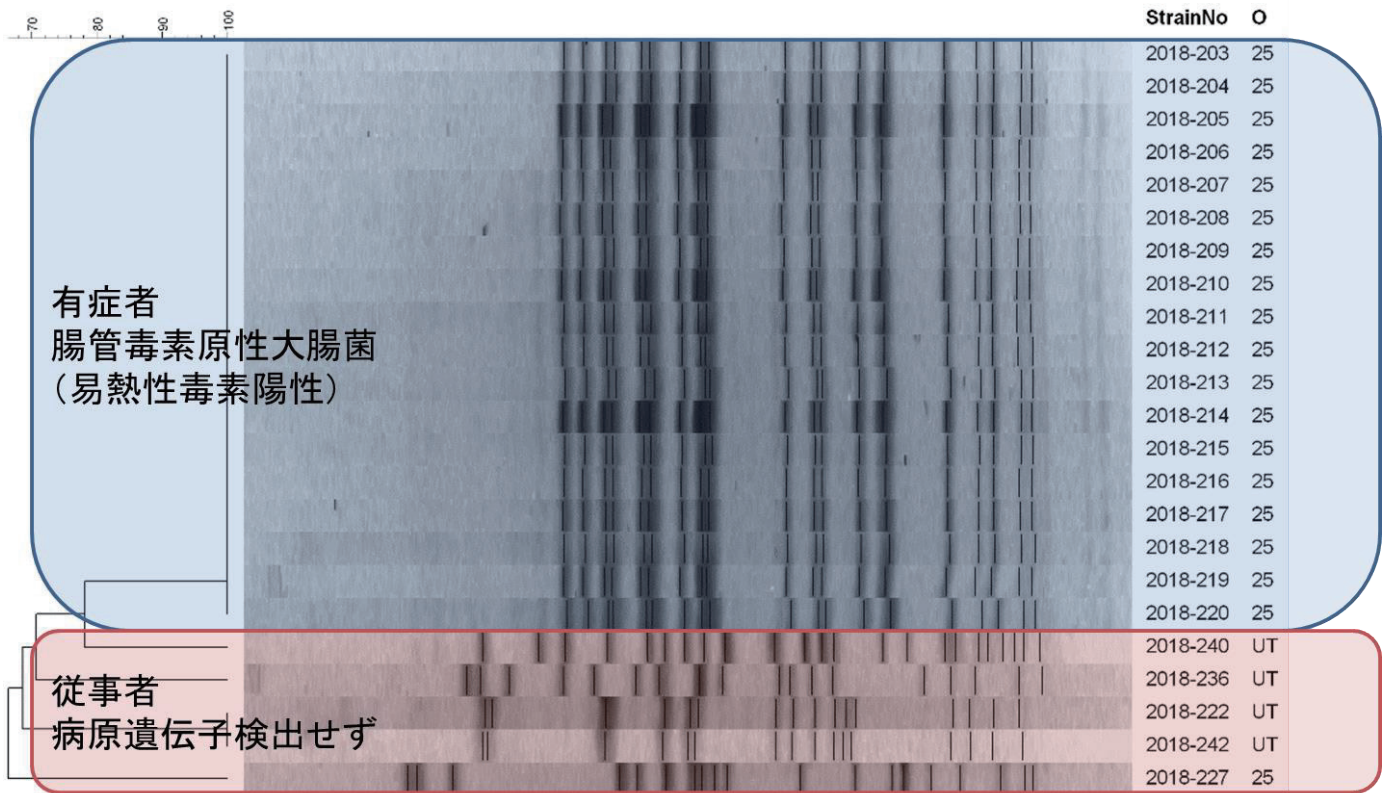


図6 腸管毒素原性大腸菌 O25 集団事例の PFGE 解析

大腸菌病原遺伝子は *invE* 遺伝子、*stx* 遺伝子、*estA1* 遺伝子、*estA2* 遺伝子、*elt* 遺伝子、*iae* 遺伝子、*aggR* 遺伝子、*afaD* 遺伝子、*astA* 遺伝子について探索を実施した。

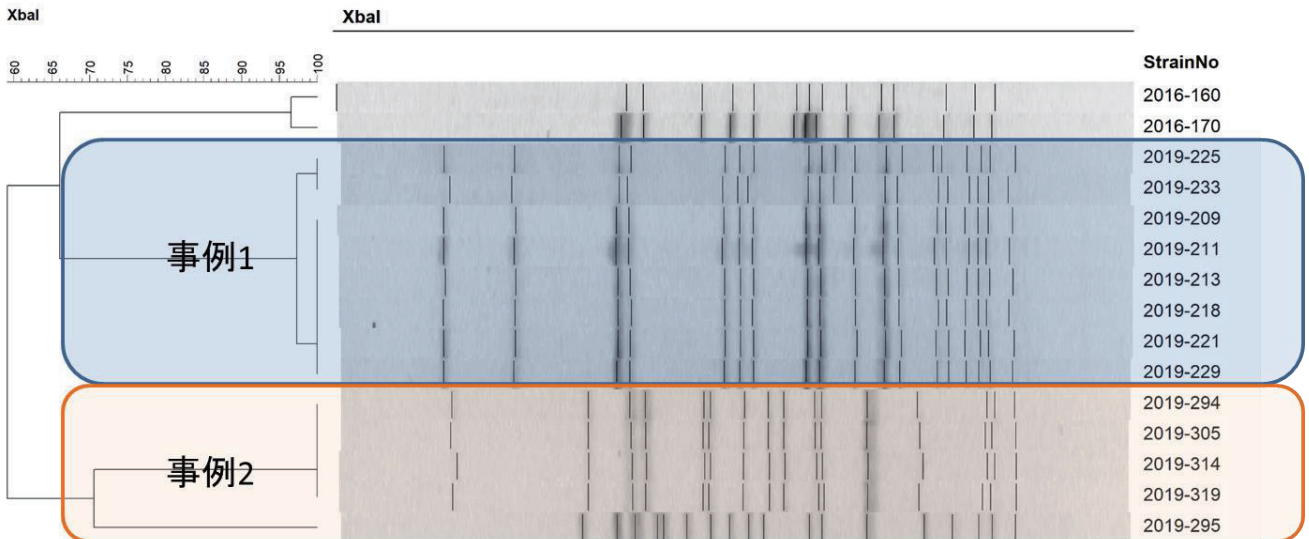


図7 *E. albertii* 集団事例の PFGE 解析

表1 リピート数未知 EHEC の MLVA 法におけるリピート数

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		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
検体No.1	111	3	1	10	2	-2	8	11	9	6	-2	3	8	2	-2	1	-2	8
検体No.2	157	2	-2	1	7	-2	11	4	-2	-2	18	9	15	5	3	7	6	7
検体No.3	26	2	1	1	2	3	8	23	-2	-2	-2	1	13	2	-2	1	-2	-2
検体No.4	157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	24	9	10	3	6	8	-2	9

表2 リピート数既知 EHEC の MLVA 法におけるリピート数

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		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
陽性コントロール1	157	2	-2	1	4	-2	5	6	-2	12	-2	9	7	3	9	7	5	3
陽性コントロール2	157	2	-2	1	4	-2	5	4	12	-2	13	12	10	5	4	4	12	7
陽性コントロール3	26	2	1	1	2	5	3	19	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2

表3 MLVA 法に関するアンケート

PCR使用機器	[Redacted]	(Ramp rateを変更した場合はその旨の記載をお願いします)
PCR使用酵素	[Redacted]	QIAGEN Multiplex PCR kit その他の場合 QIAGEN Multiplex PCR plus kit Platinum™ Multiplex PCR Master Mix その他
PCR産物の希釈倍率	[Redacted] 倍	
	希釈方法	PCR産物 [Redacted] μL DW [Redacted] μL
使用シーケンサー	[Redacted]	
データ時使用Bin	[Redacted]	自作Bin その他の場合 感染研配布Bin その他
PCの使用頻度	[Redacted]	毎回 その他の場合 試薬等を変更したとき 結果に違和感を覚えたとき その他
ピークとして判定するHight	[Redacted]	1000以上 その他の場合 500以上 PCを参考にする その他

表4 令和2年度東海・北陸ブロック MLVA 法精度管理の結果

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
検体No.1	111	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
average	2448.6	2778.0	1627.5	3488.3	-2	3645	5548.6	2034.1	5094.4	1509.1	1503.3	2454.1	4911.4	1670.3				
median	2194	1947.5	1498.5	3287.5		3583	5469	1923	4188.5	1330	1112	2411	4079.5	1190.5				
max	6046	5882	4025	8113		6548	12481	3975	12279	3879	3638	5164	10799	5568				
min	473	1158	519	1025		740	967	460	1164	359	138	604	1010	526				
note	bin修正有						bin修正有			不検出あり								
検体No.2	157	2	-2	1	7	-2	11	4	-2	18	9	15	5	3	7	6	7	7
average	2372.3		1149.5	2908.9		3853.4	6440.4	4681.8	1606.0	4621.6	2761.8	2774.4	4480.6	4702.0	2139.6			
median	1736		598	2300.5		3537	5458	5098	989	4222	2463	1374.5	2750	2605	1048.5			
max	6133		4901	7164		7507	15123	7320	3561	10881	6066	9609	10100	13915	8236			
min	374		238	622		541	698	475	465	273	496	405	899	730	253			
note			bin修正有															
検体No.3	26	2	1	1	2	3	8	23	-2	-2	1	13	2	2	-2	1	-2	-2
average	2048.1	2021.4	2146.5	3119.9	2418.0	3224.3	3490.8	1611.6	1260.1	2272.4	3685.8							
median	1752	1542.5	1026	2569	2120.5	2650.5	2881	1063	795.5	1780	3084							
max	4488	4091	9898	10632	5264	7193	10018	4987	3057	7003	8626							
min	730	912	197	545	715	786	768	236	92	658	829							
note																		
検体No.4	157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	24	9	10	3	3	6	8	-2	9
average	2230.9		1037.5	2779.9		3537.6	6068.0	3600.5	1419.4	4793.5	2449.4	2437.3	4005.6	2138.5				
median	2535.5		506	2248		3193	5287.5	3699	1225	4340.5	2068.5	1991	3843	1880				
max	3974		4267	6256		6549	13425	5548	3044	10009	5157	5733	6601	4564				
min	553		167	1336		955	1378	783	229	873	853	628	937	692				
note			bin修正有															

表5 MLVA 結果判定用エクセルファイル抜粋

mix1									
#	Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 1 h1	Allele 2	Height 2	Sample Name	Marker	Height
1	mix1_XXXXXXXX	O157-34	153-01	6999				O157-34	01
2	mix1_XXXXXXXX	EHC-2	340-21	14685				EHC-2	21
3	mix1_XXXXXXXX	O157-9	520-09	10427				O157-9	09
4	mix1_XXXXXXXX	EHC-1	135-10	12402				EHC-1	10
5	mix1_XXXXXXXX	EHC-5	121-02	5975	181-12	3302	XXXXXXXX	EHC-5	02
6	mix1_XXXXXXXX	O157-3						O157-3	-2
7	mix1_XXXXXXXX	O157-25	122-02	300				O157-25	NG
8	mix1_XXXXXXXX	EH157-12	415-02	8618				EH157-12	02
9	mix1_XXXXXXXX	EH111-8	237-01	7158				EH111-8	01

GeneMapperからのExportファイルを貼り付け

2本目のピークがある場合はこちらに表示 (セル青色)

ピークの高さが1000以下の場合、“NG”と表示
ピークと判断した場合、数式内部の“1000”を
適当な数字に変更

=IFERROR(VALUE(VLOOKUP(AO2,\$J\$3:\$K\$11,2,FALSE)),"NG")

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-9	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
XXXXXXXX	3	1	1	2	-2	10	21	2	6	-2	1	9	NG	-2	1	-2	8

表6 アンケート結果

PCR使用機器	施設数	使用シーケンサー	施設数	ピークとして判定するHight	施設数
Applied Biosystems Veriti	4	3500 Genetic Analyzer	6	500以上	1
BioRad T100	1	3500xL Genetic Analyzer	1	PCを参考にする	2
GeneAmp PCR System 9700	1	SeqStudio	1	その他	5
SimpliAmpサーマルサイクラー	1	総計	8	波形等から確認	
TaKaRa PCR Thermal Cycler DiceTM TP600	1	データ解析時使用Bin	施設数	200以上	
総計	8	感染研配布Bin	8	約175	
PCR使用酵素	施設数	総計	8	100以上 (再試験実施)	
QIAGEN Multiplex PCR kit	7	PCの使用頻度	施設数	総計	8
QIAGEN Multiplex PCR plus kit	1	毎回	3		
総計	8	結果に違和感を覚えたとき	4		
PCR産物の希釈倍率	施設数	その他 (使用していない)	1		
50	2	総計	8		
100	5				
20~100	1				
総計	8				

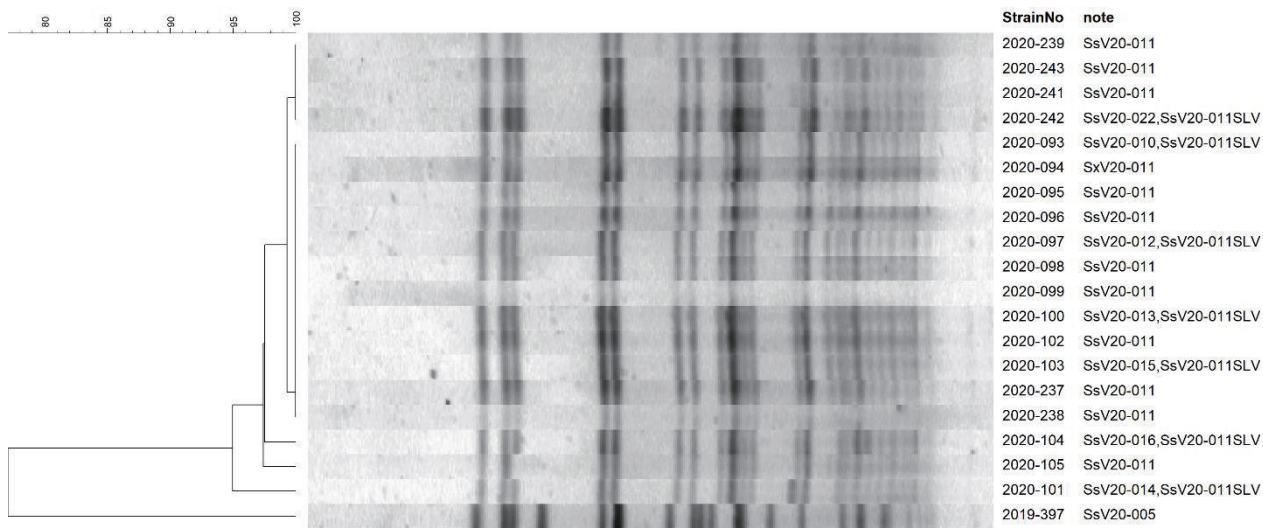
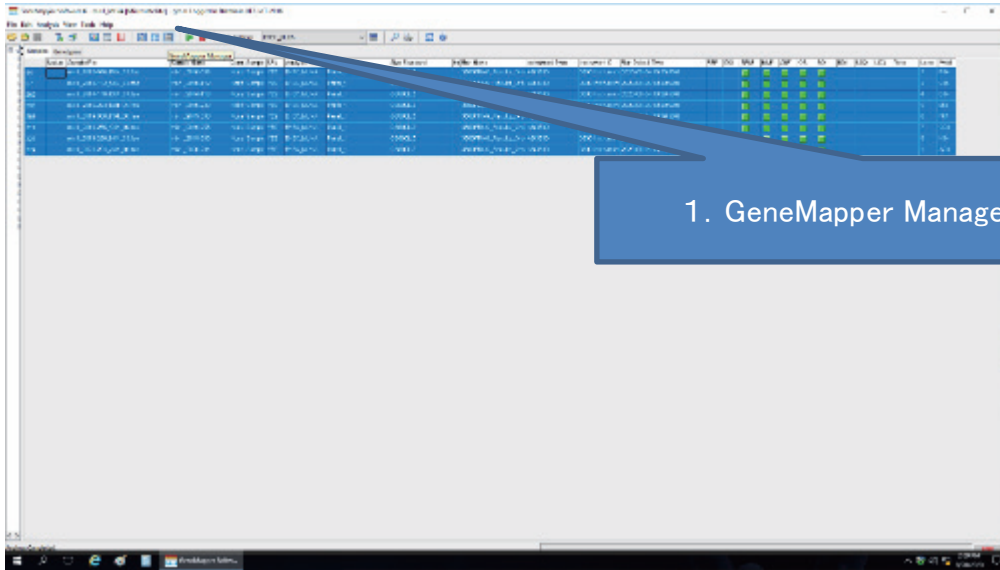


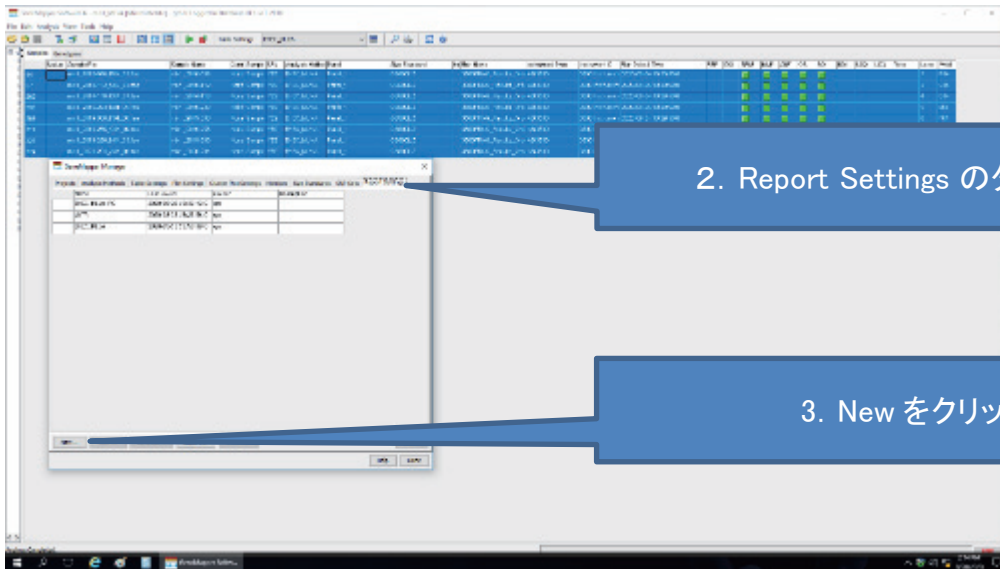
図8 *Shigella sonnei* の PFGE 図

note に記載されているのは国立感染症研究所にて実施した MLVA 法の解析結果

(別添) MLVA 実施手順書 (GeneMapper からのデータの Export の手順のみ抜粋)

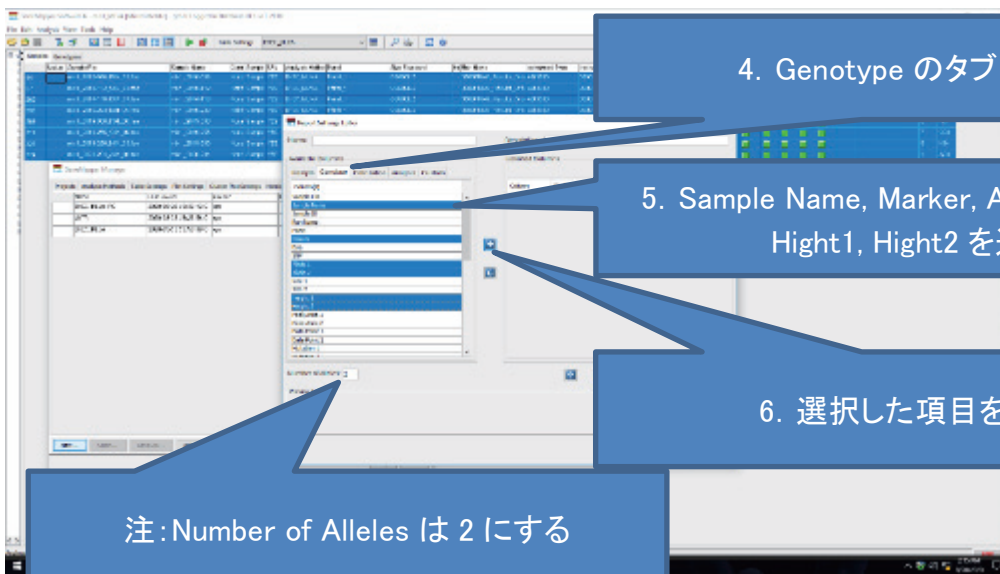


1. GeneMapper Manager をクリック



2. Report Settings のタブに移動

3. New をクリック

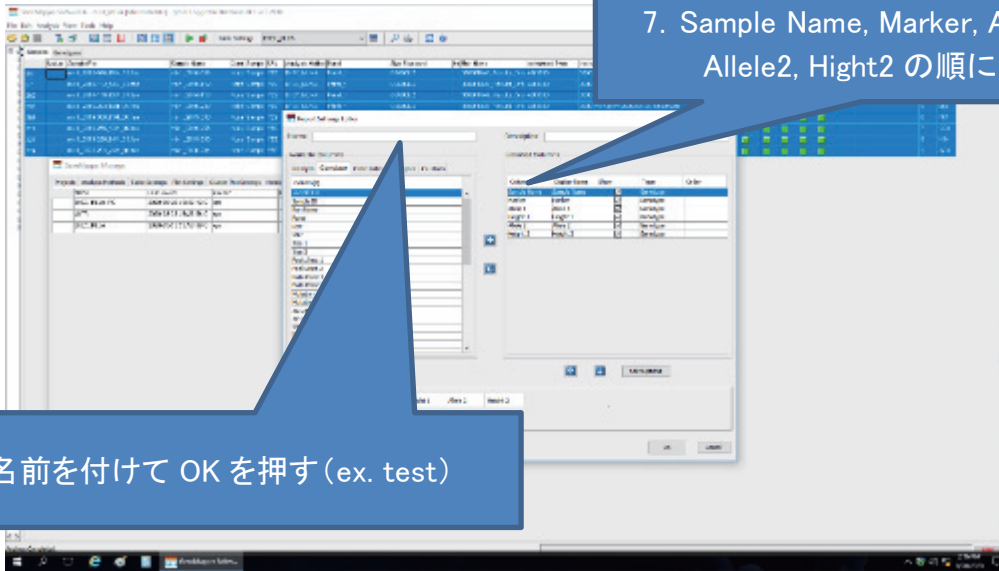


4. Genotype のタブに移動

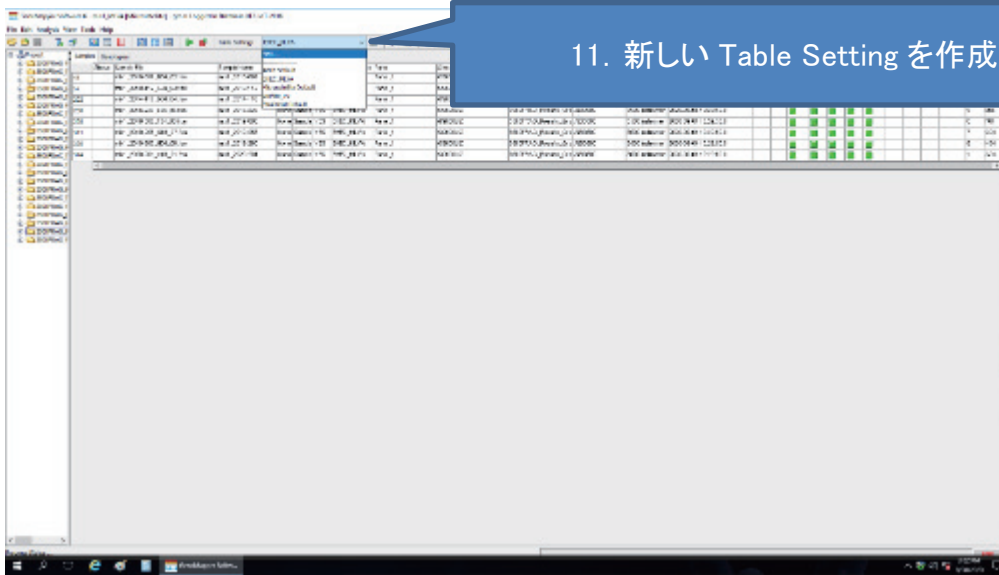
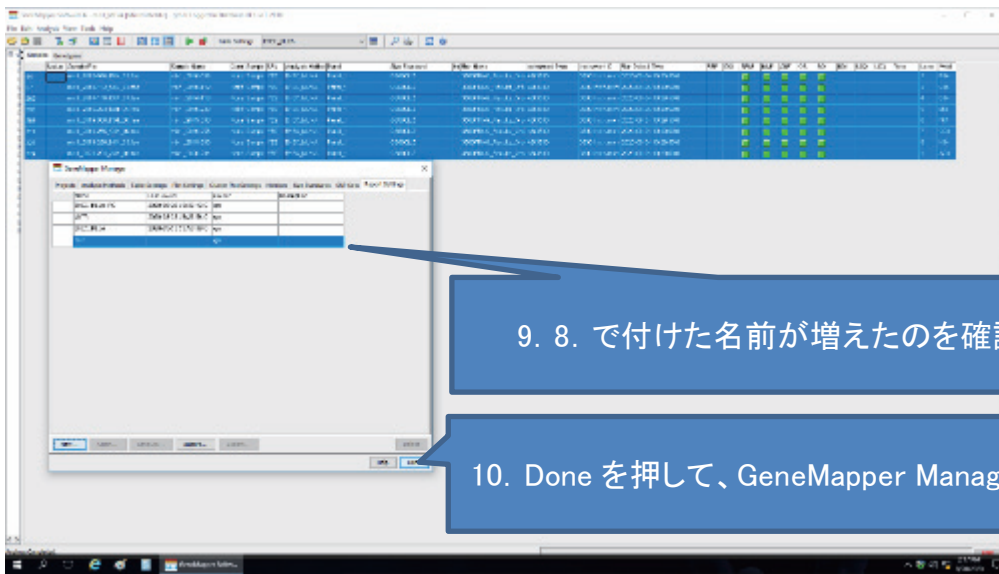
5. Sample Name, Marker, Allele1, Allele2, Height1, Height2 を選択

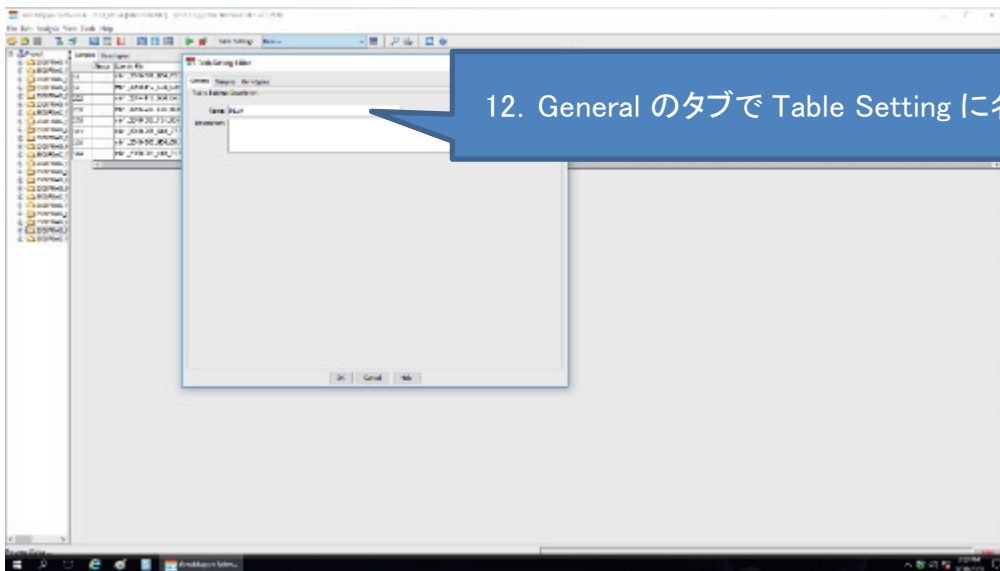
6. 選択した項目を移動

注: Number of Alleles は 2 にする

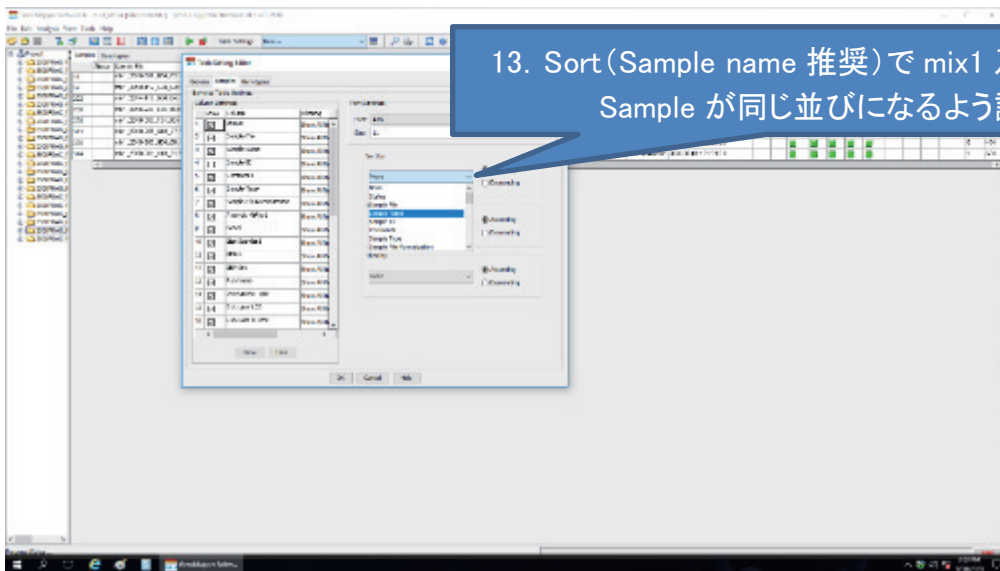


8. 名前を付けて OK を押す (ex. test)

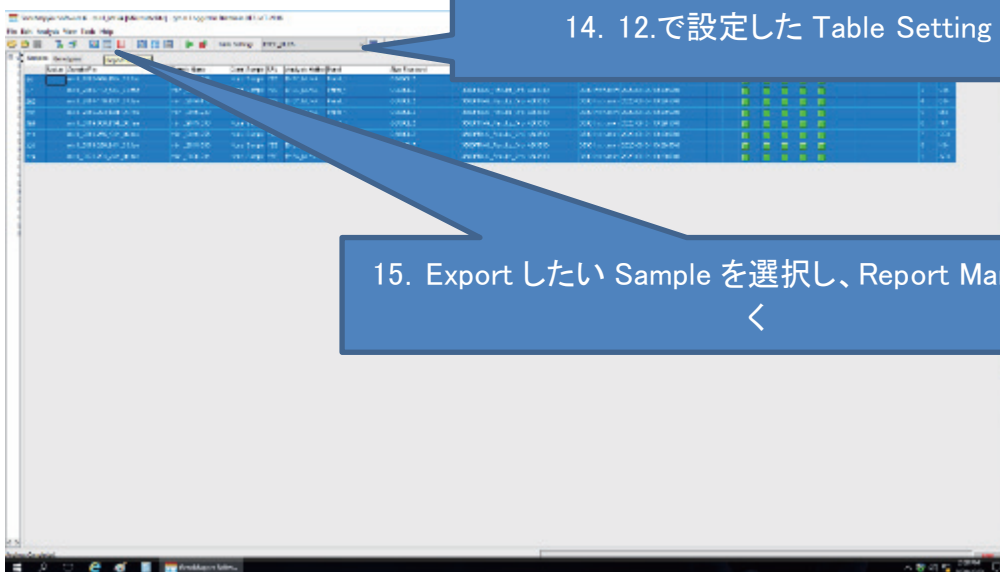


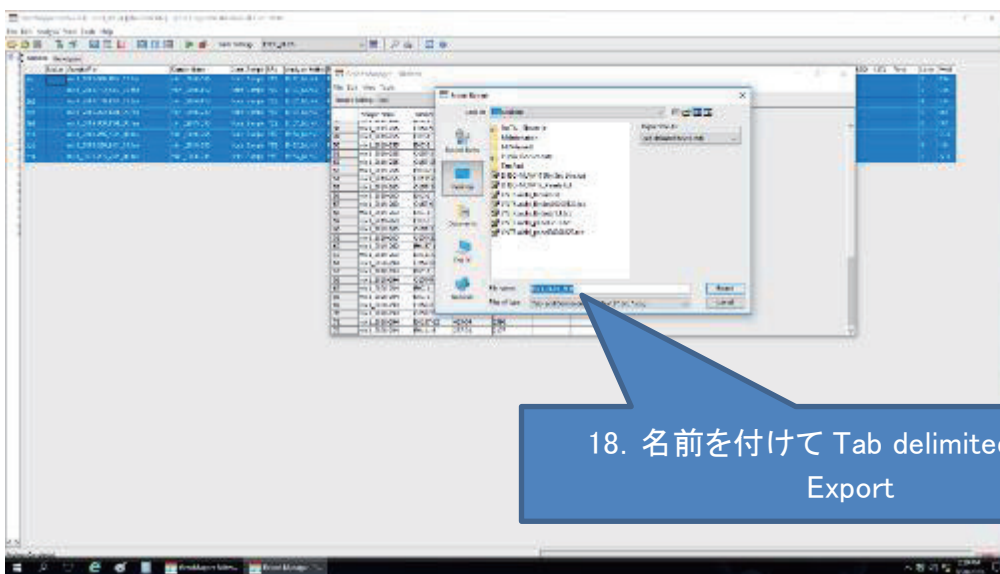
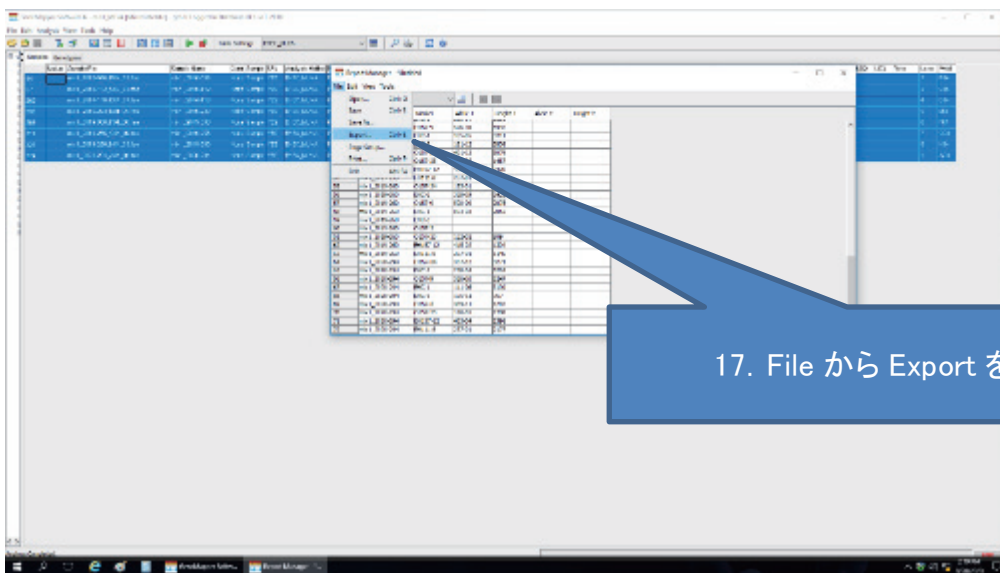
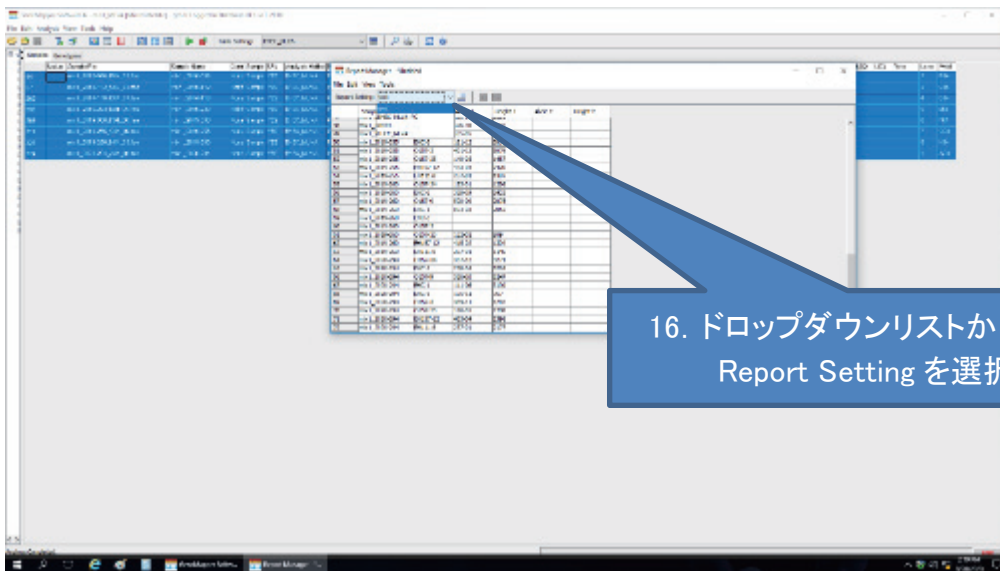


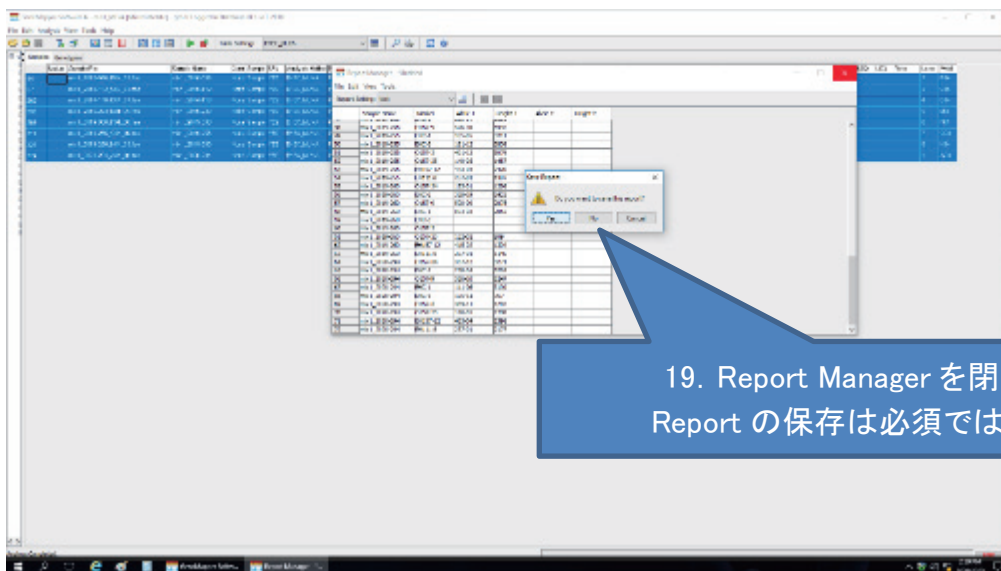
12. General のタブで Table Setting に名前を付ける



13. Sort (Sample name 推奨) で mix1 及び mix2 の Sample が同じ並びになるよう設定







Export file (Tab delimited text) を MLVA 解析用エクセルファイルに貼り付ける (Sample 48 件まで貼り付けることが可能)。