

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制作推進研究事業）

平成 30～令和 2 年度分担研究報告書

高度解析法の構築と近畿ブロックにおける情報共有体制の構築の検討

研究分担者	河合高生	地方独立行政法人大阪健康安全 基盤研究所
研究協力者	若林友騎、梅川奈央、高橋佑介 原田哲也、河原隆二、勢戸和子 石川和彦、河野智美 大石剛史、小仲兼次、武田直樹 浅井紀夫 渡辺正義 荻田堅一、齋藤悦子 濱夏樹、野本竜平 横田隼一郎、黒田久美子 村山隆太郎、平垣内雅規 平田翔子 福田弘美、岩崎直昭 田邊純子、佐伯美由紀、吉田孝子 西山貴士、池端孝清 中岡加陽子、寺杣文男、庄真理子	地方独立行政法人大阪健康安全 基盤研究所 滋賀県衛生科学センター 京都府保健環境研究所 京都市衛生環境研究所 兵庫県立健康生活科学研究所 神戸市環境保健研究所 姫路市環境衛生研究所 尼崎市衛生研究所 堺市衛生研究所 奈良県保健研究センター 和歌山市衛生研究所 和歌山県環境衛生研究センター

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学解析法の 1 つである反復配列多型解析法（Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis ; MLVA）の地方衛生研究所（地衛研）への導入促進を目的として、以下の①～④の研究を実施した。①回帰分析を利用した MLVA の新規リピート数決定法（新規解析法）を開発した。本方法は、従来法よりも汎用性が高く、従来法と同等以上の精度でリピート数を決定できると考えられた。②近畿ブロック内の地衛研を対象とした技術研修会を開催するとともに、MLVA 実施時に躓きやすいポイント等をまとめた Q&A を作成し、近畿ブロックの地衛研に配布した。③検査結果の信頼性確保を目的とした MLVA 精度管理を実施した。その結果、施設間で MLVA の技術レベルに差があることが明らかになった。④MLVA 検査体制が整備されるまでの期間は、近畿 IS データベースを運用し、流行株の解析情報を近畿ブロック内の地衛研で共有した。データベース登録施設数が年々減少したこと等を考慮して、令和 2 年度に近畿 IS データベースの更新を停止した。EHEC の遺伝子型別法は MLVA に統一される予定であ

るが、その技術レベルには施設間で差があった。疫学解析精度の確保・向上のために、今後も継続して MLVA の精度管理を実施して技術レベルの底上げを図る必要がある。

A. 研究目的

食品由来感染症において原因菌の分子疫学解析は行政対応に重要なツールである。腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学解析では、IS-printing System (IS) 法、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法および反復配列多型解析法 (Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis ; MLVA) が主に使用されている。近畿ブロックの地方衛生研究所 (地衛研) ではこれまで、IS 法と PFGE 法を共通の遺伝子型別法と位置づけ、ブロック内で分離された EHEC 株の解析情報を共有してきた。一方で、平成 29 年 11 月 20 日付け健感発 1120 第 1 号及び薬生食監発 1120 第 1 号「腸管出血性大腸菌感染症・食中毒事例の調査結果取りまとめについて」において、今後の対応として、遺伝子型別の検査について MLVA への統一化を図る旨が通知されており、EHEC の遺伝子型別法は MLVA に一本化される方針となった。

本研究では、地衛研における MLVA の導入・実施を支援するため、参照株 24 株の解析結果に基づいた回帰分析によってリポート数を決定する、新規のリポート数決定法 (新規解析法) を開発した。加えて、近畿ブロックの地衛研を対象とした技術研修会 (初期導入研修会) を開催するとともに、MLVA 実施時に躓きやすいポイントおよび悩みやすいポイントをまとめた MLVA に関

する Q&A を作成することで、地衛研における MLVA の導入推進、実施支援を行った。MLVA の検査体制を確立した地衛研に対しては、検査結果の信頼性確保のための精度管理を実施した。

さらに、近畿ブロックにおいて MLVA 検査体制が整備されるまでの期間、IS データベースの運用を継続し、ブロック内における流行株の解析情報を共有した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

新規解析法で回帰分析に使用する菌株 (参照株) および MLVA 精度管理に使用する菌株 (精度管理株) は、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 (大安研) で保存している菌株を使用した。bin セットの評価および IS データベースの登録は、各協力施設で収集した菌株を使用した。

2. 新規解析法の開発とその評価

参照株 24 株の MLVA を実施し、キャピラリー式シーケンサーで泳動した際の増幅産物サイズを測定した。参照株のリポート数を説明変数、各施設で測定した増幅産物サイズを目的変数として、表計算ソフト Excel を用いて回帰分析を実施した。得られた回帰分析結果について、回帰直線と回帰係数の有意性の検定を行い、危険率を 5% として評価した。

回帰直線から得られた各リポート数に応

じて予測される PCR 増幅産物サイズを bin の中央値とし、bin のオフセット値をその 99%予測区間幅もしくは ± 1.5 bp として bin セットを作成した。作成した bin セット（自作 bin セット）あるいは国立感染症研究所（感染研）から平成 30 年に配布された bin セット（感染研 bin セット）を解析ソフト（GeneMapper）にインポートし、各施設で収集した EHEC O157、O26、O111 について MLVA を実施し、表 1 の基準に従ってリピート数を決定した。

併せて、感染研に菌株を送付し、MLVA の実施を依頼した。感染研での解析結果を当該菌株の標準リピート数として、施設毎に自作 bin セットあるいは感染研 bin セットで決定したリピート数との一致率を比較した。

3. MLVA 初期導入研修会の開催と MLVA に関する Q&A の作成

大安研の検査担当者 3 名を講師として MLVA 初期導入研修会を開催した。参加施設には、MLVA の準備状況に関する事前アンケートを実施した。また、研修会開催に合わせ、MLVA 解析ソフト GeneMapper を用いた解析マニュアルを作成し、参加者に配布した。

Q&A の作成では、協力地衛研から MLVA に関する疑問点等をメールで募集した。質問事項に対して回答を作成し、MLVA に関する Q&A として近畿ブロックの協力地衛研に配布した。

4. MLVA の精度管理

MLVA の精度管理に参加した協力地衛研

に、精度管理株（令和元年度は 5 株、令和 2 年度は 12 株）から抽出した DNA を送付した。各施設で所有する機器および試薬を使用して MLVA を実施し、遺伝子座ごとのリピート数を記入した判定表の提出を求めた。

5. 近畿 IS データベースの運用

施設ごとに、収集した EHEC O157 について IS 法を実施し、その結果を施設内データベースに登録した。更新した施設内データベースは研究分担者およびデータベース管理者に送信され、データベース管理者はそれらを元にレファレンスデータベースを更新し、最新版を研究協力者に電子メールで送信した。

C. 研究結果

1. 新規解析法の開発

初年度に開発した新規解析法は翌年度以降も改良を続け、毎年度、協力地衛研とともにその有用性を評価した。大安研における各年度の自作 bin セットの評価結果を表 2 に示す。いずれの年度においても、自作 bin セットで決定したリピート数は、標準リピート数と概ね一致した。bin セットのオフセット幅を ± 1.5 bp とすることで、回帰直線から外れたピークについてもリピート数を決定できることが明らかとなった（詳細は令和元年度分担報告書参照）。また、遺伝子座 EHC-6 については、二次多項式回帰分析を用いることでリピート数の決定精度を向上させることができた（詳細は令和 2 年度分担報告書参照）。新規解析法によるリピート数の決定精度は、改良を重ねるにつれて向

上し、令和2年度には、自作 bin セットを使用して決定した菌株のリポート数は、標準リポート数とすべて一致した（表2）。

2. 新規解析法の評価

研究協力地衛研（平成30年度は4施設、令和元年度と令和2年度は5施設）とともに、開発した新規解析法の評価を行った。感染研 bin セットを使用した場合、使用するシーケンサーの種類によってはリポート数の決定精度が低下したが、自作 bin セットを使用した場合、シーケンサーの種類にかかわらず、高い精度でリポート数を決定できた（詳細は令和元年度分担報告書参照）。令和2年度の改良で、新規解析法は、感染研 bin セットと比較して同等あるいは同等以上の精度でリポート数を決定することが可能となった（詳細は令和2年度分担報告書参照）。

3. MLVA 初期導入研修会の開催および Q&A の作成

MLVA 導入を検討している近畿ブロックの5地衛研を対象に、令和元年8月に大安研で MLVA 初期導入研修会を開催した。参加者から好評を得たが、解析ソフトの使用法に関する研修や解析結果の行政への提供方法に関する情報交換会の開催を望む意見があった。

令和2年度に情報交換会を計画したが、コロナ禍のために断念せざるを得なかった。そこで、MLVA に関する Q&A の作成に方針変更した。MLVA に関する疑問点等をメールで募集した結果、9施設から31項目の質問事項を得た。質問事項に対して回答を加

筆し、MLVA に関する Q&A としてまとめたうえで、協力地衛研に配布した（令和2年度分担報告書の別紙1参照）。

4. MLVA の精度管理

令和元年度は5施設が、令和2年度は10施設が精度管理に参加した。令和元年度は、参加したすべての施設が配布した5株すべてを正答した。令和2年度は施設ごとに正答数に差が認められた（表3）。この精度管理では、bin セットの範囲外にピークが出現する菌株の正答率が特に低いことが明らかとなった。また、特定の遺伝子座に複数ピークが検出される菌株の場合、結果の記載方法が異なるケースが認められ、令和元年度は1施設が、令和2年度は3施設が同時に検出される小ピークについて記載しなかった。

5. 近畿 IS データベースの運用

近畿 IS データベースには、平成30年度は9施設から142株が、令和元年度は8施設から164株が登録された。IS法を実施する施設数が減少したこと、EHEC の遺伝子型別法は将来的に MLVA に移行すると見込まれたことから、令和2年度に近畿 IS データベースの更新を停止した。

D. 考察

本研究では、MLVA の新規解析法の開発、技術研修会の開催と MLVA に関する Q&A の作成、並びに MLVA の精度管理を実施することで、地衛研における MLVA の導入・実施を支援した。その結果もあり、令和2年11月の時点で、近畿ブロックの地衛研のう

ち 10 施設が MLVA を実施していると回答した。平成 29 年の時点では MLVA を実施している施設は 1 施設もなく、近畿ブロック内の地衛研で MLVA は急速に普及した。MLVA の検査体制を確立していない施設が数施設残っているものの、近畿ブロック内において、MLVA による分子疫学解析体制の整備を一定程度支援できたと考えられた。

MLVA のリポート数決定法としては、他施設で作成した bin セットをインポートして使用方法がしばしば採用される。この方法は、MLVA を実施する機器の種類や施設環境によってはズレが生じ、正確にリポート数を決定できないことがあるため、場合によっては微調整が必要となる。一方、開発した新規解析法は、各施設で実施する環境に合わせて bin セットを作成するため、施設環境に影響を受けない汎用性の高い方法となった。令和 2 年度に実施した改良 bin セットの評価結果から、新規解析法は従来法と比較して同等あるいは同等以上の精度でリポート数を決定できることが示唆された。

MLVA の精度管理を令和元年度と令和 2 年度に実施した。令和元年度に参加した 5 施設は、令和 2 年度の精度管理でも比較的高い正答率を示した。一方、令和 2 年度に初めて精度管理に参加した施設は、複数株で誤答する傾向が認められた。この結果は、MLVA 検査体制を確立してからの年数、並びに精度管理に参加した回数が、検査精度に影響することを示唆している。検査結果の信頼性確保のためには、今後も継続した

精度管理の実施が必要であると考えられた。

平成 21 年から運用している近畿 IS データベースは、平成 24～28 年に最多の 12 施設からデータが登録された。しかし、その後は登録施設数が年々減少傾向にあった。MLVA の導入に伴い、IS 法を実施しない地衛研が増加したことが主な原因であると考えられた。今後も、EHEC の遺伝子型別法として、IS 法から MLVA へ移行する地衛研が増加すると予想されたため、近畿 IS データベースは、令和 2 年 4 月以降、更新を停止した。今後は、近畿 IS データベースに代わる MLVA 解析結果の情報共有体制について、検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

近畿ブロックにおける MLVA の導入・実施を支援するため、MLVA の新規解析法の開発、技術研修会の開催、Q&A の作成、精度管理を行った。近畿ブロックにおける MLVA 導入施設数は研究期間の前後で大幅に増加し、MLVA による分子疫学解析体制が整備された。精度管理の結果、施設ごとの MLVA 技術レベルに差があることが明らかになった。継続的な精度管理の実施による技術レベルの底上げが必要である。近畿 IS データベースは令和元年度を以て更新を停止した。遺伝子型別法の MLVA への移行に伴い、近畿ブロックにおける新たな情報共有体制の検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

なし

2. 学会発表

- 1) 若林友騎, 原田哲也, 河合高生, 高橋佑介, 梅川奈央, 泉谷秀昌, 川津健太郎: 単回帰分析を用いたEHEC MLVAのリピート数決定法の検討. 第23回腸管出血性大

腸菌感染症研究会 (2019年11月, 愛媛)

- 2) 若林友騎, 高橋佑介, 梅川奈央, 原田哲也, 河原隆二, 余野木伸哉, 河合高生, 川津健太郎: EHEC MLVA検査体制の確立と大阪府内分離株の解析. 令和元年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 (2019年11月, 和歌山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 bin セットの評価基準

判定結果	判定基準	記載方法
リピート数の決定	ピークの中心がbinの中に入っている	リピート数を記載
リピート数の推定	ピークの中心がbinの中に入っていないが、ピークの一部が近傍のbinに入っている	前後のbinから推定されるリピート数の直後に？を付与して記載
binセットの範囲外	用いたbinセットの最小値より増幅産物サイズが小さい、もしくはbinセットの最大値より大きい	binセットの最小値の前に<を付与して記載、もしくは最大値の前に>を付与して記載
増幅なし	ピークが見られない	-2と記載
判定不能	上記以外の場合	？と記載

表2 大安研における自作 bin セット評価結果

	平成30年度 (評価株数：47)	令和元年度 (評価株数：51)	令和2年度 (評価株数：33)
自作binセットで決定したリポート数が 標準リポート数とすべて一致した株の割合 (%)	81	94	100
自作binセットで決定もしくは推定したリポート数が 標準リポート数とすべて一致した株の割合 (%)	89	96	100

表 3 年度ごとの MLVA 精度管理株数と各施設における正答数

	令和元年度 (精度管理株数：5株)	令和2年度 (精度管理株数：12株)
施設1	5	12
施設2	5	12
施設3	実施せず	7
施設4	実施せず	9
施設5	実施せず	11
施設6	5	11
施設7	実施せず	12
施設8	実施せず	10
施設9	5	12
施設10	5	11