

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」

分担研究報告書

反復配列多型解析法の有効性の検証・精度管理手法の確立

研究代表者 大西 真 国立感染症研究所 副所長
研究分担者 平井 晋一郎 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法は、新しい分子疫学的解析法として、地方衛生研究所（地衛研）に急速に普及している。現在、食品流通網の充実により食中毒事例の形態が変わりつつあるため、近年に分離されたEHEC菌株を使ってMLVA法の有効性を再検証する必要があるだろう。一方、本法を公衆衛生分野で活かすには、地衛研における検査精度が高くなければならない。来年度に全国規模でのMLVA法の精度管理試験を予定しているため、今年度に試験での検証項目を決める必要がある。そこで、本研究ではMLVA法の菌株間の類似性を判定する能力（分離能）を検証するために、2016～2020年に、国内で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株を用いて各年の多様度指数（SDI）を算出した。その結果、2017年の0111のSDIが0.925とやや低かったが、それ以外は0.95以上だった。全国規模でのEHEC 0157集団事例が発生した2018年でもSDIが高かったことは、MLVA法の分離能が高く、同一クローン由来の菌株間の僅かな違いも認識していることを示している。次に、MLVA法における同一クローン由来のEHEC菌株であることの判定基準を検証するために、公共データベースに登録されているEHECのゲノムデータを使って、*in silico*でMLVA法を行った。その結果、同じ集団事例で分離された菌株のタンデムリピートが違った領域は2つまでだったことから、2領域違いを基準とすべきだろう。最後に、EHEC 0157、026及び0111の菌株及びDNAを一部の地衛研に配布してMLVA法の精度管理プレ試験を行った。9施設は全検体について正解だったが、1施設が1検体でフラグメント解析ソフトの使用法に問題があり不正解の回答をした。来年度、全国規模で精度試験を行う際、解析ファイルを正しく利用できるかを検証できる検体を配布する必要があるだろう。

A. 研究目的

近年、腸管出血性大腸菌（EHEC）の新しい分子疫学的解析法として開発された反復配列多型解析（MLVA）法は、特定遺伝子領域における繰り返し配列のリピート（TR）数の比較により菌株間の類似性を判定する方法である¹⁾。MLVA法の結果は数値であるため、自治体間での結果の比較が容易であるという利点がある。さらに、MLVA法ではPCR法を用いるので短時間で解析結果を出すことができる。2018年に厚生労働省は地方自治体に対して、EHECの食中毒調査等で用いる分子疫学的解析としてはPFGEからMLVA法へ統一する様に通知した（平成30年2月8日付け健感発0208第1号、薬生食監発0208第1号）。

過去の研究により²⁾、MLVA法の菌株間の類似性の違いを判定する能力（分離能）は高く、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）と同程度と報告されている。さらに、この研究によってMLVA法を用いた際

の同一集団事例由来の菌株であることの判定基準も示されている。しかし、近年、食品流通網の拡大・複雑化に伴い、食中毒の期間が長くなり、規模も拡大している³⁾。さらに輸入食品を介して海外に分布しているEHEC菌株による感染症事例も増えていると思われる。この様に食中毒の形態が変わりつつある現在、MLVA法の有効性については、近年に分離されたEHEC菌株を用いて再検証した方が良いだろう。

MLVA法の有効性の検証として、我が国で分離されたEHEC菌株について、MLVA法により多様な遺伝子型に分かれるかを調査する必要があるだろう。過去の研究では、2005～2007年に日本全国で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株をMLVA法で解析すると遺伝子型の多様性は非常に高かった²⁾。しかし、2018年の夏頃に、分子疫学的解析法で同じ遺伝子型を持つEHEC 0157菌株が全国的に蔓延した⁴⁾。2012年8月には、EHEC 0157に汚染された白菜の浅

漬が食品流通網を介して北海道から山形県、東京都、神奈川県、奈良県、大阪府にまで広がり、最終的に160名以上もの感染者が発生した⁵⁾。この様に同一クローン由来のEHEC菌株が広域に蔓延した場合、我が国に分布するEHEC菌株におけるMLVA法の遺伝子型の多様性に变化があるかもしれない。

MLVA法の有効性検証において、海外で分離されたEHEC菌株のゲノムデータを用いた解析も必要だろう。海外の研究によってEHECのMLVA法の検証が行われている。しかし、日本でのEHECのMLVA法ではゲノムの17領域のTR数が解析されているが、海外の多くのMLVA法の研究ではアメリカ合衆国CDCが推奨する8領域の解析が採用されている⁶⁾。従って、海外のEHEC菌株についても17領域のMLVA法を用いて有効性を検証する必要がある。一方で、EHECの中で分離頻度が高い血清型である0157では、地域間で異なる進化系統学的集団 (PG) の菌株が分布していると報告されている⁷⁾。特定の菌種をMLVA法で解析すると、各PGの菌株は固有の遺伝子型を持つことが示されていることから⁸⁾、海外と日本に分布するEHEC菌株では、各遺伝子領域のTR数の多様性が大きく異なるかもしれない。もしかしたら、海外で分離された菌株については同一クローン由来であるかの判定基準を変えるべきかもしれない。

MLVA法が有効な分子疫学的解析法であったとしても、本法が持つ能力を公衆衛生分野で発揮するには、実施機関での検査精度が高くなければならない。我が国では、地方衛生研究所 (地衛研) が各地域で分離されたEHEC菌株について分子疫学的解析法を行い、食中毒調査等に活用しているため、地衛研に対する精度管理が大切だろう。昨年度の本研究では、精度管理を行うための準備として、配布する候補菌株を選定し、DNAの抽出法を決めた。特定のEHEC菌株は他の菌株と比べて変異の蓄積量が優位に多いことから⁹⁾、昨年度に複数回の継代培養を行い変異がなかった菌株を候補とした。精度管理で菌株のDNAを配布する場合、輸送期間中にDNAの品質低下が起こることも予想されることから、抽出したDNAを一定期間、特定温度で放置してもMLVA法の結果に影響を与えないことも確認した。本研究では、来年度に全国規模でのMLVA法の精度管理試験を予定している。そこで、来年度の試験における検証項目を明らかにするために、今年度は一部の地衛研を対象にプレ試験を行った。

本研究では、MLVA法の分子疫学的解析法としての有効性を検証するために、2016～2020年に国立感染症研究所 (感染研) 細菌第一部に搬入されたEHEC菌株を用いて、MLVA法データの多様性を経時的に調査した。次に、海外で発生したEHECの集団食中毒及び集団感染症事例由来の菌株の

MLVAデータを解析し、同一クローン由来菌株であることの異同判定の基準を検討した。さらに、一部の地衛研を対象としたEHECのMLVA法の精度管理プレ試験を行い、来年度の全国規模での試験における検証項目を決定した。

B. 研究方法

1. MLVA法データの経時的整理に基づく有効性の検証

2016～2020年に全国の地衛研で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株の内、感染研に搬入された全ての菌株を用いて、MLVA法の菌株間の分離能を検証した。各年に搬入された各血清型の菌株について、以下の式を用いてSimpson's Diversity Index (SDI) を算出した¹⁰⁾。

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

D はSDI、 M は各血清型の総菌株数、 S はMLVA法の遺伝子型の総数、 n_j は j 番目のMLVA型に属する菌株数を意味する。SDIが1.0の時、その年に搬入された1つの血清型の全菌株が、MLVA法により互いに異なる遺伝子型に分かれることを示す。反対に、SDIが0の時、全菌株が同じ遺伝子型であることを示す。各血清型のSDIについてカイ二乗検定を行い、搬入年間での有意な増減があるかを調査した。

2. MLVA法データの地理的整理に基づく有効性の検証

我が国の地衛所及び感染研で用いられている17領域のMLVA法が海外で分離されたEHEC菌株においても有効であるかを調査した。最初に、Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) に記載されている文献から、海外で発生したEHEC 0157、026及び0111の集団食中毒及び集団感染症事例を報告している文献を抽出した。次に、抽出された文献から、集団事例であるとの判断が疫学的調査及びPFGE法の結果に基づいている研究を選んだ。さらに、集団事例由来の菌株について全ゲノムシーケンスが行われており、contig配列が公共のゲノムデータベースに登録されている文献を選んだ。最後に、集団事例由来の菌株のcontig配列を公共のゲノムデータベースから得た後、MEGA11 Software¹¹⁾を使って*in silico*でMLVA法を行った。

3. MLVA法の精度管理の受験施設

感染研 細菌第一部から情報を得て、全国の地衛研の中からEHECの日常検査においてMLVA法を実施している施設を選定した。選定した地衛研に打診し、最終的に10施設に受験いただいた。10施設の内訳は、東北地区に1施設、関東地区に4施設、東海地区に2施設、近畿地区に1施設、中国地区

に1施設、及び九州地区に1施設だった。選定した10施設をグループI（施設A-E）及びグループII（施設F-J）に分けた。

4. MLVA法の精度管理試験での問題内容

各施設に3つの菌株検体（検体1-3）及び3つのDNA検体（検体4-6）の合計6検体を配布した（表1）。グループI及びIIの間で菌株検体は異なるが、DNA検体は共通にした。検体は令和2年度の本研究で候補としたEHEC菌株から選んだ。菌株の選定基準としては、菌株検体ではMLVA法で典型的なTRを持つEHEC、DNA検体では非典型的なTRを持つEHECを選んだ（表1）。つまり、DNAである検体4の領域0157-9のTR数は-2であるが、このTR数を持つ菌株は日本で分離されるEHEC 0157の中では少数派である。検体6の領域EHC-5のTR数は10であるが、同様にEHEC 0111菌株の中では少数派である。検体の調製方法としては、EHEC菌株をカジトン培地に植えた後、37°Cで1晩培養したものを菌株検体とし、EHECのDNAをInstaGene matrix（Bio-Rad Laboratories）で抽出した後、NanoDrop（Thermo Fisher Scientific）でDNAを2 ng/ μ Lに調製してDNA検体とした。

問題内容として、全検体についてMLVA法を実施してもらいTR数の回答を求めた（図1）。各受験施設には、日常検査で実施している実験方法（DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等）でMLVA法を行う様に伝えた。また、問題と併せて、実験方法に関するアンケートを行った。

5. MLVA法の精度管理試験の実施工程

各受験施設に菌株（検体1-3）及びDNA（検体4-6）を別々に送付した（表1）。2021年11月22日（月）、各施設に菌株（検体1-3）をゆうパック常温便で発送した。11月25日（木）、各受験施設に菌株（検体4-6）をゆうパック冷凍便で発送した。

回答用紙としては、2021年11月23日（火）に各受験施設の受験者にエクセルファイルを（図1）をメールにて送付した。回答締切りを2022年1月31日（月）とした。

6. MLVA法の精度管理試験における問題及び正解基準

検体5の領域0157-37においては、複数の回答を正解とした。回答用紙の表や備考欄において（図1）、遺伝子増幅産物のサイズのみではTR数を判定できないことが示されていていれば正解とした。例えば、「表において、TR数が判定不能（UN）とされ、さらに遺伝子増幅産物のサイズが書かれている。」及び「表でTR数が6、6.5又は7と判定され、備考欄に“電気泳動するとTR数6と7の間に遺伝子増幅産物のピークが確認された。”や“電気泳動すると遺伝子増幅産物のピークがフラグメント解析ソフトのBin内に入らなかった。”と書かれている。」を正解とした。検体5の0157-37以外の領域については正しいT

R数の回答のみを正解とした。

C. 研究結果

1. MLVA法データの経時的整理に基づく有効性の検証

2016～2020年に感染研に搬入されたEHEC 0157、026及び0111についてSDIを算出したところ、2017年のEHEC 0111のみが0.925と最も低く、それ以外は0.95以上だった。各血清型のSDIについて搬入年間で有意な増減は認められなかった。搬入菌株数は、どの年においても0157が最も多く、0111が最も少なかった。

2. MLVA法データの地理的整理に基づく有効性の検証

海外で発生したEHEC 0157による集団食中毒として3事例を選定した（表2）。1事例目は、2011年にカナダで発生した生殻付きクルミを原因とする集団食中毒事例である¹²⁾。この事例で感染者から分離された14菌株の内、11菌株のcontig配列を公共のデータベースからダウンロードできた（Accession No. PRJNA481261）。contig配列を用いて*in silico* MLVA法を行ったところ、4つのMLVA型に分かれた（表2（A））。型2の4菌株では領域0157-9で、型3の1菌株では領域0157-34及び0157-9でTRを検出できなかった。しかし、11菌株中で異なったTR数を持つ0157は型4の1菌株のみで、領域0157-25のsingle locus variant（SLV）だった。

EHEC 0157による2事例目として、2009年にアメリカ合衆国全域で発生したクッキーの生地を原因とする集団食中毒事例を選んだ¹³⁾。この事例では76名の感染者が確認された。抽出した文献では、感染者由来の5菌株についてWGSが行われていたが、本研究ではcontig配列がデータベースに登録されていた3菌株のデータをダウンロードした（Accession No. : PRJNA481261）。*in silico* MLVA法の結果、3菌株が同じMLVA型を持っていた（表2（B））。全菌株において、領域0157-36のTR数を検出できなかった。

EHEC 0157による3事例目としては、2007年にアメリカ合衆国の複数の州で発生したピザ集団食中毒事例である¹³⁾。この事例では21名の感染者が確認された。抽出した文献では、感染者由来の6菌株についてWGSが行われているが、本研究ではcontig配列が公共のデータベースに登録されていた5菌株のデータをダウンロードした（Accession No. : PRJNA65991）。*in silico* MLVA法の結果、4つのMLVA型に分かれた（表2（C））。型2及び型3の各1菌株は、それぞれ領域EHEC-1及び0157-36におけるSLVだった。型4の1菌株は領域EHEC-1及び0157-36のTR数が異なるdouble locus variant（DLV）だった。大半のEHEC 0157菌株の領域0157-36にTRを持つが、

本研究では全菌株においてTRを検出できなかった。

海外で発生したEHEC 026による事例として、2016年3月末にイスラエルの保育園で発生した集団感染症事例を選んだ¹⁴⁾。この事例で感染者から分離された6菌株のEHEC 026のcontig配列を公共のデータベースからダウンロードした (Accession No. PRJNA285020)。in silico MLVA法を行ったところ、全ての菌株が異なるMLVA型に分かれた (表2 (D))。型1及び3の菌株は領域0157-9が、型2の菌株は領域EHC-2のTR数が異なるSLVだった。型6の菌株は領域EH26-7及びEHC-2のTR数が異なるDLVだった。EHEC 026菌株の大半は領域EHC-6にTRを持つが、本研究では全ての菌株でTRを検出できなかった。全菌株の中で型4の菌株のみEHC-2でTRが確認できなかった。

本研究の選定条件に適合した海外のEHEC 0111による集団食中毒または集団感染症事例の文献を抽出できなかった。

3. MLVA法の精度管理試験の回答の評価

菌株検体 (検体1-3) については、グループI及びII間で異なる検体を配布した (表1 (A))。グループIでは、全施設が検体1-3の全ての領域について正しいTRを回答したことから、正解と判定した。グループIIでは、検体3の領域EH111-11について、施設GがTR数をUN、遺伝子増産物のサイズを437 bpと記載したため、正誤判定を保留とした (表3 (A))。この領域について他の施設は正しいTR数を回答したことから正解と判定した。グループIIの全施設が検体1及び2の全領域、検体3のEH111-11以外の領域で正しいTR数を回答したことから正解とした。

正誤判定を保留とした施設Gの検体3の領域EH111-11について回答の経緯を調査した。フラグメント解析ソフトGeneMapper (Thermo Fisher Scientific) のBinファイル、及び電気泳動データを取り寄せた。その結果、施設Gで使用されているBinファイルにはTR数2及び4が設定されていたが、TR数3が未設定だった。このBinファイルの由来は、過去のある研究班で作成した試作版とのことだった。電気泳動ファイルを確認したところ、遺伝子増産物のピークはTR数2と4のほぼ中央に立ち、TR数2と4のBin間は12 bp (2つのTR分のサイズ) であった。その後、電話で聞き取り調査を行うと、施設Gの受験者はTR数3のBinが未設定だったためUNとしたとの回答だった。以上より、TR数3のBinが未設定でも電気泳動の結果を解釈すればTR数が3と判定できたことから、保留とした回答を不正解とした。

DNA検体 (検体4-6) については、グループI及びIIで共通の検体を配布した (表1 (B))。検体5の領域0157-37の回答のみが複数に分かれた (表3 (B))。施設B、I及びCはTR数をそれぞれ7、6.5及び9と回

答し、それ以外の施設はTR数をUN、遺伝子増産物のサイズを記載した。施設B、I及びCは備考欄に、この領域の遺伝子増産物を電気泳動すると、ピークはTR数が6と7の間であり、増産物のサイズのみではTR数の判定ができなかったと記載していた。さらに、施設I及びCはサンガーシーケンスを実施し、検体5は領域0157-37に9つのTRを持っているが、PCR法でプライマーからTRまでの領域に遺伝子の欠落が起きていることを把握していた。以上より、検体5の領域0157-37の回答については全施設正解と判定した。また、検体4及び6の全領域、検体5の0157-37以外の領域についても全施設が正しいTR数を回答したことから正解と判定した。

一方で、施設Aに送付した菌株検体において遺伝子変異と思われる現象が見られた。施設Aから回答があった際、メールにより「検体3 (菌株) の培地中の一部の細胞において領域EHC-6と0157-37のTRが検出されなくなっていた。」と報告を受けた。メールによる報告では以下の通りである。施設Aの受験者は、検体3を画線培養により5つのコロニーを得た後、アルカリ熱抽出によりDNAを調製しMLVA法を行ったところ、1つのコロニーで上述の2領域でTRが検出されなかった。受験者はTRが検出できなくなった原因はプラスミドの脱落によると判断し、他の4つのコロニーで検出されたTR数を回答した。

D. 考察

本研究により、MLVA法は、我が国で近年に分離されたEHEC 0157、026及び0111の菌株に対しても分離能が高いことが明らかになった。泉谷らが2005～2007年に全国で分離されたEHECを用いてMLVA法の分離能を評価した際、散发事例由来の菌株を全て用いたが、集団事例由来では代表の1菌株のみを選んだ²⁾。その結果、0157、026及び0111のSDIはそれぞれ0.991、0.988及び0.986だった。本研究では、散发及び集団事例を区別せずに感染研に搬入された全菌株を用いてSDIを算出した。本研究の結果、2017年の0111のSDIがやや低かったが、それ以外の値は泉谷らの数値と大きく変わらなかった。我が国では、2018年に特定の食品が原因と疑われた大規模なEHEC 0157の集団事例が発生した⁴⁾。しかし、本研究では2016～2020年のSDIの間で有意な差が見られなかった。この結果は、我が国で実施されているMLVA法では17領域を解析するため、本法の分離能が非常に高くなっていることを示唆している。一般的に、同じEHECの集団事例由来の菌株であっても、事例の規模が拡大して長期化すると、徐々に菌株に変異が蓄積する。17領域のMLVA法では、事例の長期化により菌株に蓄積した変異の一部をTR数の変化 (つまり、SLVやDLV) として検出でき

るために、SDIに有意な低下が見られなかったのだろう。

本研究では、同一クローン由来のEHEC菌株についてMLVA法での異同判定の基準を示せた。海外で発生した複数の集団事例由来のEHEC菌株のMLVA法のデータを用いて*in silico*でMLVA法を行ったところ、同じ事例においても一部の菌株でTRが検出できなかった（つまり、表2（A）のMLVA型2及び3の菌株、（D）の型4の菌株）。この原因として、菌株自体はTR数を持っていたが、文献の研究でWGSのショートリード配列をアッセンブルした際、TR数が長すぎた等でcontig配列が作れなかったことが考えられる。一方で、*in silico* MLVA法の結果、同じ事例で分離された全ての菌株において、TR数が検出できないことも確認された。MLVA法で解析される17領域の内、O血清型に共通してTRを持たない領域がある（例えば、0157の場合、領域EH111-14やEH26-7）。その様な領域以外において、事例由来の全菌株でTR数が検出できなかった場合、同様にcontig配列が作れなかった可能性もある。その他の可能性としては菌株の個性としてその領域にTRを持たなかったことも考えられる。また、EHC-6、0157-19及び0157-36等のプラスミド上に存在する領域においてTR数を検出できなかった場合は¹⁵⁾、検査過程で菌株がプラスミドを脱落したのかもしれない。本研究の結果、*in silico*の解析でTRを検出できなかった領域を除くと全ての事例において、変異がDLVまでに収まった。泉谷らは、同一集団事例由来の菌株の多くはSLVで収まることを報告しており²⁾、海外から持ち込まれたEHECによる集団事例においても、この異同判定の基準が採用できると思われた。

本年度の一部の施設を対象としたMLVA法の精度管理試験の結果、全ての施設において検査精度が高いことが確認された。本年度の精度管理試験の目的は、来年度に予定している全国規模での試験における検証項目を決定するためである。本年度の受験施設の検査能力が低い場合、試験内容の正解率が低くなり、来年度の試験内容を決定できなくなる。そこで、本年度はMLVA法を日常業務として実施している施設に受験いただいた。本年度の試験では、当初、DNA検体の正解率が低下すると予想していたが全ての施設で正解だった。例えば、検体5の領域0157-37については全施設が遺伝子増幅産物のサイズからはTR数を算出できないことを見抜いていた。特に、施設C及びIにおいてはサンガーシーケンスも実施してTR数を塩基配列から数えて把握していた。一方で、菌株検体において、唯一不正解となった回答があった。施設Gの検体3の領域EH111-11の回答を誤ったので、回答の経緯を調査した。PCR法や電気泳動法等の実験手技は正しかったが、Binファイルの解釈を誤っていた。この様な初歩的な間違いを防ぐため

にも本研究の様な精度管理の継続的な実施が必要である。また、各施設が自主的にMLVA法に用いる機器、試薬や解析ファイル等を定期的に評価することも大切だろう。

今年度に不正解だった回答の原因から、来年度の全国規模でのMLVA法精度管理試験では受験施設が解析ファイルを正しく利用できるかを検証する必要があるだろう。検証のためには、典型的なTR数を持つ検体だけではなく、検体4-6の様な非典型的なTR数を持つ検体も配布することが望ましいと思われる。一方で、検体としては菌株ではなくDNAを配布するべきだろう。今年度、菌株検体を調製した際、施設間での検体の違いを少なくするために、1つのコロニーを1回釣菌した後、連続して複数のカジトン培地に植え継ぎ、各施設に1培地を配布した。しかし、施設Aの検体3において培地中の一部の細胞でTR領域を持つプラスミドが脱落していた。来年度は全国規模で精度管理試験を実施するために、この様な現象が起こった検体を受け取る施設が増えるだろう。また、来年度はMLVA法の検査精度が高くない施設も受験すると思われる。全国規模での試験で菌株検体を配布し、受験施設がプラスミド上のTRが未検出と回答した場合、検査精度が低いためか、またはプラスミドの脱落が起きたためかの特定が困難になるかもしれない。今年度に行った実験方法に関するアンケートによると、施設間で菌株検体からのDNA抽出法は様々だった（アルカリ熱抽出法、キレックス樹脂試薬による抽出法、及び抽出を行わずコロニーダイレクトPCR法）。不正解の原因がDNA抽出法でなかったことからMLVA法の精度評価で重要な点はPCR法以降と思われる。

E. 結論

近年、日本で分離されたEHEC 0157、026及び111菌株に対してもMLVA法は高い分離能を持っていた。MLVA法を用いた同一クローン由来菌株の異同判定はDLVまでと思われる。近年、全国で分離された菌株においてMLVA法データの多様性は高かった。来年度に実施予定MLVA法精度管理試験では、受験施設が解析ファイルを正しく利用できるかを検証する必要がある。

F. 謝辞

本研究の遂行において、終始、貴重なご指導とご助言を賜りました国立感染症研究所 細菌第一部の泉谷秀昌先生に深く感謝申し上げます。何より、業務ご多忙の中、本年度のMLVA法の精度管理試験にご参加くださり、惜しみないご貢献をくださいました地方衛生研究所の先生方に心より感謝申し上げます。

G. 参考文献

- 1) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 2) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 3) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40 (5): 83-85, 2019
- 4) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 39 (5): 74-77, 2018
- 5) 小嶋ら, 病原微生物検出情報, 34 (5): 127-128, 2013
- 6) 泉谷ら, 日本食品微生物学会雑誌, 36(1): 10-12, 2019
- 7) Mellor, et al., Appl Environ Microbiol, 78(13): 4724-4731, 2012
- 8) Seto, et al., J Microbiol Methods, 139: 12-14, 2017
- 9) Yokoyama, et al., Int J Food Microbiol, 264: 39-45, 2018
- 10) Hunter, et al., J Clin Microbiol, 26: 2465-2466, 1988
- 11) Tamura, et al., Mol Biol Evol, 38(7):3022-3027, 2021
- 12) Rumore, et al., BMC Genomics, 19 (1): 870, 2018
- 13) Rusconi, et al., Front Microbiol, 7: 985, 2016
- 14) Moran-Gilad, et al., Epidemiol Infect 145: 2998-3006, 2017
- 15) 河合ら, 岡山県環境保健センター年報, 43, 79-85, 2019

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

なし

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

所属：
 担当者：

1. 問題及び回答

検体1-6について反復配列多型解析（MLVA）法を行い、Tandem Repeat（TR）数をご回答ください。

日常の検査において貴所で実施している方法（DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等）でMLVA法を行ってください。

TR数が算出できない遺伝子増幅が見られた場合はUNとご記入ください。また、その増幅産物のサイズ（bp）をご記入ください。

各検体の結果について、詳細に説明したい事がある場合は備考欄にご記入ください。

検体名	種類	TR数（上段）及び遺伝子増幅産物のbp数（下段）																
		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
記入例	菌株	5	2	6	3	-2	UN	7	-2	4	-2	4	10	3	-2	2	-2	7
721																		
検体1	菌株																	
検体2	菌株																	
検体3	菌株																	
検体4	DNA																	
検体5	DNA																	
検体6	DNA																	

備考欄

以上で、「1. 問題及び回答」は終了です。誠に有難うございました。

図1 腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法精度管理試験での回答用紙

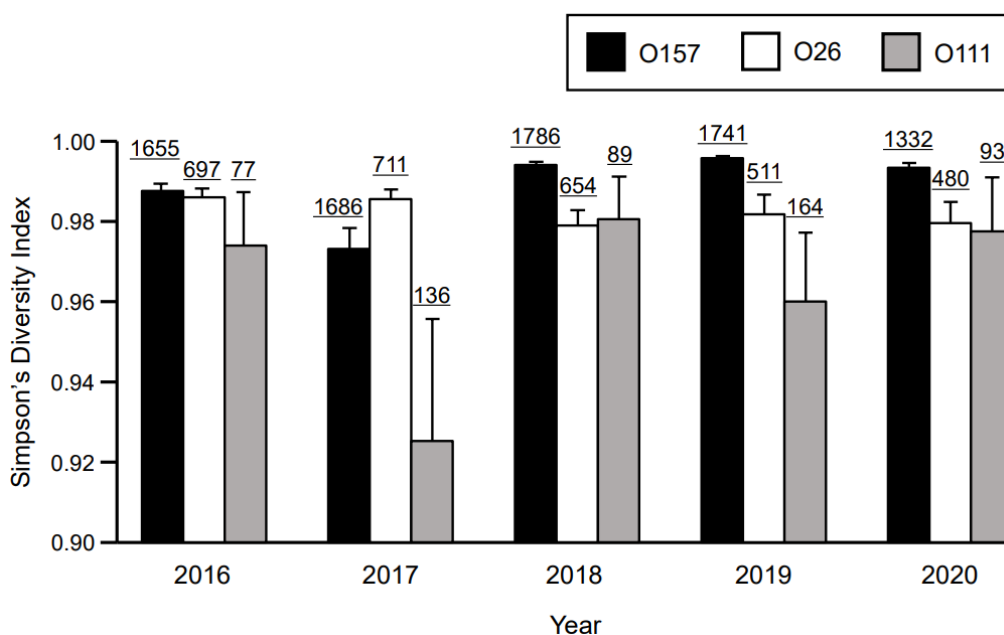


図2 EHEC菌株の各血清型におけるMLVA法遺伝子型の多様性

各血清型のSimpson's Diversity Indexを示す棒の上に書かれているアンダーバーがある数値は、各年に国立感染症研究所へ搬入された菌株数を示す。

表1 受験施設に配布したEHEC菌株

(A) 菌株検体

検体	グループ	MLVA法の各遺伝子領域におけるタンデムリピート (TR) 数																	血清型
		EH 111	EH 111	EH 111	EH 157	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	
		-11	-14	-8	-12														
1	I	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7	O157
	II	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	12	9	11	5	5	7	4	6	
2	I	2	1	1	2	3	8	13	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2	O26
	II	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	
3	I	4	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6	O111
	II	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	9	

(B) DNA検体

検体	グループ	MLVA法の各遺伝子領域における TR 数																	血清型
		EH 111	EH 111	EH 111	EH 157	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	
		-11	-14	-8	-12														
4	I、II	2	-2	1	3	-2	10	5	-2	-2	4	9	-2 ^a	2	5	8	8	8	O157
5	I、II	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN ^b	O26
6	I、II	4	1	5	2	-2	8	6	10 ^c	3	-2	3	14	2	-2	1	-2	7	O111

^a EHEC O157の中では、領域O157-9のTRが-2である菌株は少数派であるため。

^b 9つのTRを持つが、TR付近に遺伝子の欠損が起きている。MLVA法でPCR法を行うと、TR数が6及び7の間に相当する遺伝子増幅産物が確認される。

^c EHEC O111の中では、領域EHC-5のTRが-2ではない菌株は少数派であるため。

表2 海外で発生したEHECによる集団食中毒事例または集団感染事例由来の菌株における*in silico*でのMLVA法

(A)カナダで発生した生殻付きクルミを原因とする集団食中毒事例¹⁰⁾

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 ^a	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 ^a	EHC -1	EHC -2	EHC -5 ^a	EHC -6 ^a	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	9	16	5	24	8	8	6	5
2	O157	2	NF ^b	1	7	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	9	NF ^c	5	24	8	8	6	4
3	O157	2	NF ^b	1	12	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	NF ^c	NF ^c	5	24	8	8	6	1
4	O157	2	NF ^b	1	12	NF ^b	11	4	NF ^b	NF ^b	6	9	16	6 ^d	24	8	8	6	1

^a EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCR法により遺伝子増幅が確認されない領域。

^b 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

^c 一部の菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

^d 他の菌株とTR数が異なった。

(B)アメリカ合衆国で発生したクッキー生地を原因とする集団食中毒事例¹¹⁾

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 ^a	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 ^a	EHC -1	EHC -2	EHC -5 ^a	EHC -6 ^a	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	3	4	NF ^b	NF ^b	12	8	12	4	6	11	NF ^b	5	3

^a EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCR法により遺伝子増幅が確認されない領域。

^b 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

(C)アメリカ合衆国で発生したピザを原因とする集団食中毒事例¹¹⁾

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 ^a	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 ^a	EHC -1	EHC -2	EHC -5 ^a	EHC -6 ^a	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	7	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	5	NF ^b	2
2	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	8 ^d	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	5	NF ^b	1
3	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	7	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	6 ^d	NF ^b	1
4	O157	2	NF ^b	1	6	NF ^b	6 ^d	4	NF ^b	NF ^b	8	10	7	4	3	5	4 ^d	NF ^b	1

^a EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCRにより遺伝子増幅が確認されない領域。

^b 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

^d 他の菌株とTR数が異なった。

パターン	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5 ^e	EHC -6	O157 -3 ^e	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17 ^e	O157 -19	O157 -36 ^e	O157 -37 ^e	
1	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF ^b	NF ^b	-2	1	6 ^d	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
2	O26	2	1	1	2	3	6	5 ^d	NF ^b	NF ^b	-2	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
3	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF ^b	NF ^b	-2	1	10 ^d	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
4	O26	2	1	1	2	3	6	NF ^c	NF ^b	NF ^b	-2	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
5	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF ^b	NF ^b	-2	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1
6	O26	2	1	1	2	8 ^d	6	5 ^d	NF ^b	NF ^b	-2	1	11	2	NF ^b	NF ^b	NF ^b	NF ^b	1

(D) イスラエルの保育園で発生した集団感染事例¹²⁾

^b 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

^c 一部の菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

^d 他の菌株とTR数が異なった。

^e EHEC O26の菌株の大半において、MLVA法のPCRにより遺伝子増幅が確認されない領域。

表3 施設間で回答に違いが見られた検体及び遺伝子領域

(A) 検体3の領域EH111-11

施設	TR 数	遺伝子増幅産物	備考欄の概要
G	UN	437 bp	TR 数が 2 及び 4 の間に相当する遺伝子増幅産物が見られた。
F、H、I、J	3	記載なし	記載なし。

(B) 検体5の領域O157-37

施設	TR 数	遺伝子増幅産物のサイズ	備考欄の概要
A、D、E、H、J	UN	約 120 bp	記載なし。
F、G	UN	約 120 bp	フラグメント解析ソフト GeneMapper の Bin には含まれない遺伝子増幅産物のピークが見られた。TR 数が 6 及び 7 の間に相当する遺伝子増幅産物のピークが見られた。
B	7	記載なし	TR 数が 6 と 7 の Bin の間に遺伝子増幅産物 (120.61bp) のピークが見られた。所属の判定基準から TR 数を 7 と判定した。
I	6.5	記載なし	GeneMapper の Bin には含まれない遺伝子増幅産物のピークが見られた。シングル PCR 法により非特異的な増幅でないことを確認した。遺伝子増幅産物についてサンガーシーケンスを実施し、サイズを 123 bp と決定した。PCR 法ではオフセット 84 bp、1 個の TR は 6 bp であることから、計算により TR 数を 6.5 とした。
C	9	記載なし	TR 数が 6 及び 7 の間に相当する遺伝子増幅産物が見られた。サンガーシーケンスにより塩基配列を確認したところ TR 数を数えて 9 と判定した。なお、オフセット領域で 15 bp (TR 数 2.5 個相当) の欠落が起きていた。