

# 腸管出血性大腸菌の現況について

伊豫田 淳, 李 謙一, 窪村亜希子, 泉谷 秀昌, 明田 幸宏

国立感染症研究所・細菌第一部



# 本日の発表内容

- EHECの現況
- EHECの陰性確認方法
- MLVA法（泉谷）
- 全ゲノム解析法（李）

表1. 腸管出血性大腸菌感染症届出数

診断年 (1/1~12/31)	届出数*	(うち有症者)	(%)
2011	3,939	(2,659)	(68)
2012	3,770	(2,363)	(63)
2013	4,045	(2,624)	(65)
2014	4,156	(2,839)	(68)
2015	3,568	(2,338)	(66)
2016	3,648	(2,247)	(62)
2017	3,904	(2,606)	(67)
2018	3,855	(2,584)	(67)
2019	3,745	(2,513)	(67)
2020	3,090	(1,985)	(64)
2021	3,236	(2,022)	(62)
2022**	177	(82)	(46)

平均届出数 : 3,848

→ 80.3%

→ 84.1%

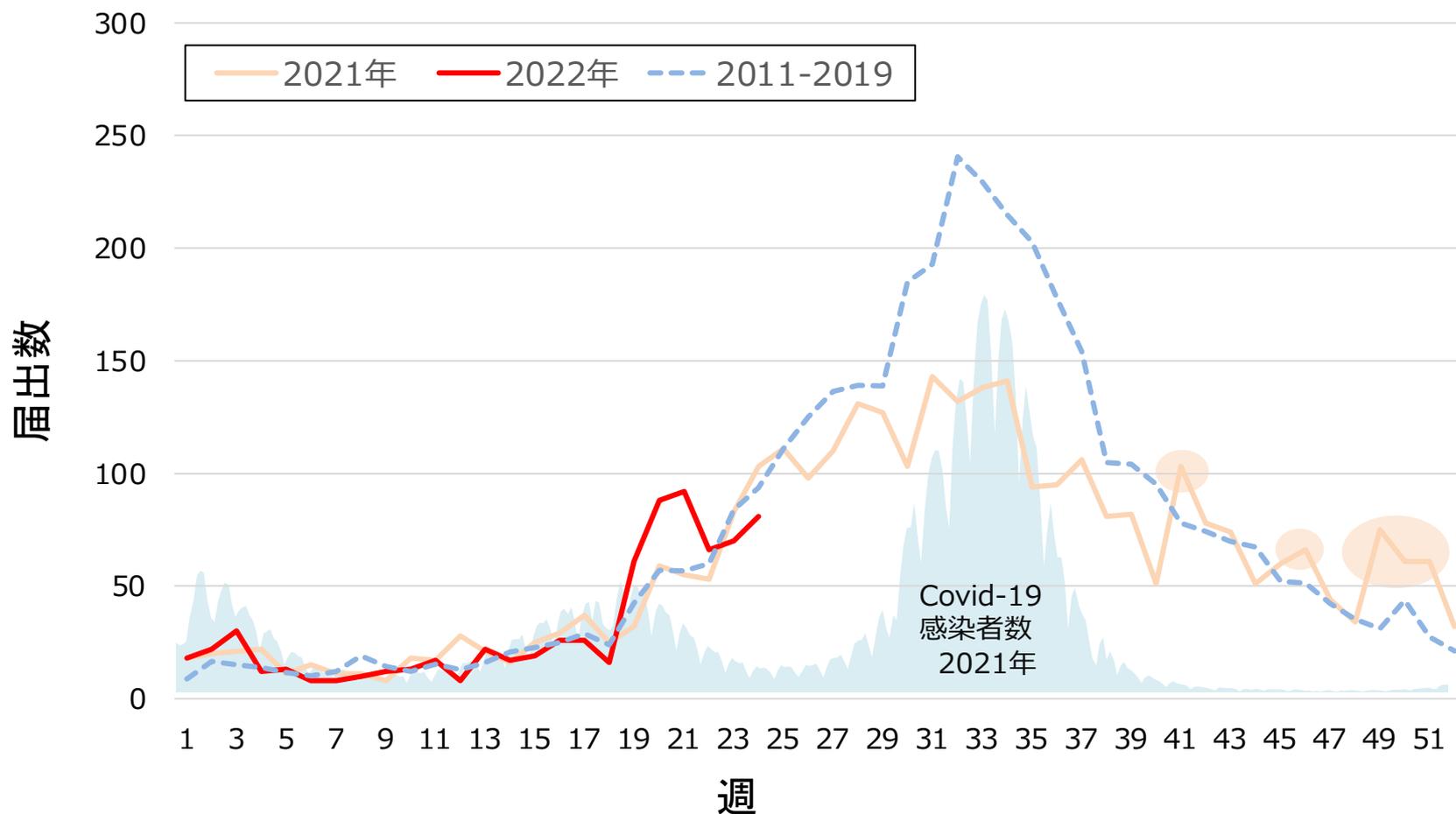
Covid-19 の  
EHEC届出総数へ  
の影響は限定的？

\*無症状病原体保有者を含む

\*\* 2022年のみ期間が1/1~4/1

(感染症発生動向調査：2022年4月1日現在届出数)

# EHEC週別届出数 (2011-2022 24w)



感染症 サーベイランスシステム : National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases (NESID) 集計データ

Covid-19感染者数データ ([https://www3.nhk.or.jp/n-data/opendata/coronavirus/nhk\\_news\\_covid19\\_domestic\\_daily\\_data.csv](https://www3.nhk.or.jp/n-data/opendata/coronavirus/nhk_news_covid19_domestic_daily_data.csv))

表2. 腸管出血性大腸菌感染症集団発生事例, 2021年

No.	発生地	発生期間	推定感染経路	発生施設	血清型	毒素型	発症者数	摂取者数	菌陽性者数 ／被験者数	家庭内二次 感染者*	IASR 参照記事
1	前橋市	6/4 ~ 6/25	人→人または食品媒介	保育施設	O172:H25	VT2 VTNT	48	208	12/215	不明	本号5ページ
2	横浜市	5/22 ~ 6/18	人→人	保育施設	O111:H-	VT1	49	—	63/271	有 (18)	
3	奈良県	6/29 ~ 8/25	人→人	保育施設	O157:H7	VT1&2	20	—	20/230	有 (7)	
4	岩手県	8/28 ~ 9/10	人→人	保育施設	O157:H-	VT2	4	—	10/68	有 (5)	
5	福島県	12/13 ~ 2022/1/1	人→人	保育施設	O26:H11	VT1	15	—	13/68	有 (6)	
6	堺市	8/2 ~ 8/15	人→人	保育施設	O157:HNT	VT1&2	25	—	26/201	有 (8)	
7	滋賀県	6/26 ~ 7/4	食品媒介	飲食店	O157:H7	VT1&2	2	5	2/2	不明	
8	滋賀県	7/1 ~ 7/2	食品媒介	飲食店	O157:H7	VT1&2	2	6	4/4	不明	
9	滋賀県	6/28 ~ 7/8	食品媒介	飲食店	O157:H7	VT1&2	6	10	7/10	不明	
10	長崎県	12/8 ~ 12/20	人→人	保育施設	O157:H-	VT1&2	12	—	12/178	有 (5)	

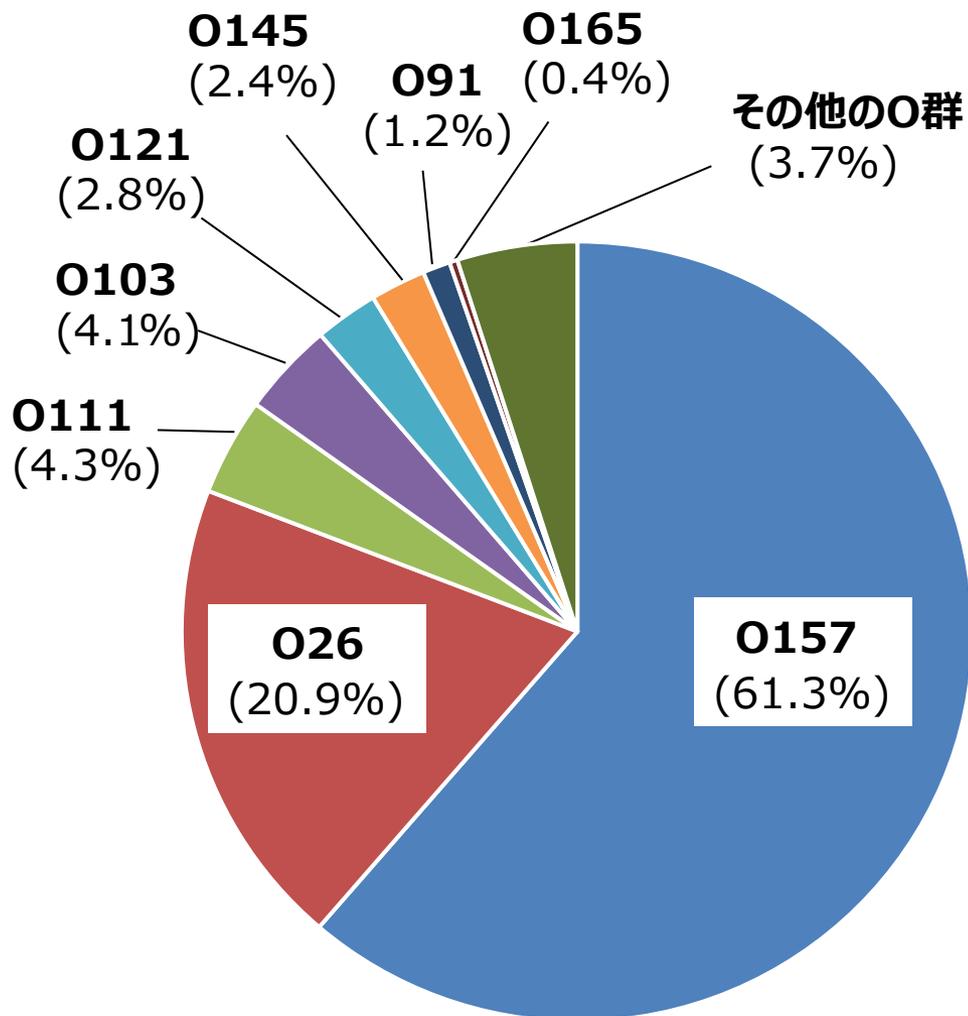
菌陽性者（無症状者を含む）10名以上の事例。 NT：Not typed、-：人→人伝播と推定されているので該当せず。 \*（ ）内は二次感染者数  
地方衛生研究所からの「集団発生病原体票」および「病原体個票」速報（NESID病原体検出情報：2022年2月21日現在）と食中毒事件詳細およびIASR記事による

## 1) 夏期以外での集団発生事例

## 2) 分離される血清型の多様化 → 非定型なEHECによる集団発生

- O172:H25 による集団発生
- O156:H25 による散在的広域発生

# ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2021)



*n*=42,176

## 分離株の多様化

O157, O26, O111, O103, O121, O145, O91, および O165 以外 (その他のO群) の分離率

2008 : 1.9% 8.5%

2013 : 4.5% 17.1%

2018 : 6.7% 19.6%

令和3-5年

厚労科研 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

「感染症の病原体を保有していないことの確認方法について」  
の改訂に資する研究

研究代表者：五十嵐 隆（国立成育医療センター）

世話人分担研究者：宮入烈（浜松医大）

分担研究者：伊豫田 淳

協力研究者：李 謙一

（感染研・細菌第一部）

## 感染症の病原体を保有していないことの確認方法について

### 1 腸管出血性大腸菌感染症

- 患者については、24時間以上の間隔を置いた連続2回（抗菌剤を投与した場合は服薬中と服薬中止後48時間以上経過した時点での連続2回）の検便によって、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。
- 無症状病原体保有者については、1回の検便によって菌陰性が確認されれば、病原体を保有していないものと考えてよい。

### 2 コレラ及び細菌性赤痢

- 患者については、抗菌剤の服薬中止後48時間以上経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続2回の検便によって、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。
- 無症状病原体保有者については、無症状病原体保有確認後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続2回（抗菌薬を投与していた場合にあつては服薬中止後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続2回）の検便によって、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。

### 3 腸チフス及びパラチフス

- 患者については、発症後1ヶ月以上を経過して、抗菌薬の服薬中止後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続3回の検便において、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。また、尿中に病原体が検出されている場合にあつては、前記の検便における病原体の陰性確認に加えて、検尿の結果も検便の場合と同様に病原体が検出されなかった場合において、病原体を保有していないものと考えてよい。
- 無症状病原体保有者については、無症状病原体保有確認後1ヶ月以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続3回（抗菌薬を投与していた場合にあつては服薬中止後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続3回）の検便によって、病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。また、尿中に病原体が検出されている場合にあつては、前記の検便における病原体の陰性確認に加えて、検尿の結果も検便の場合と同様に病原体が検出されなかった場合において、病原体を保有していないものと考えてよい。

# EHEC陰性化確認手法改訂に向けた研究課題

R3-4年度分担項目：

## 1) EHEC陰性化確認手法の改訂

「病原体の検出」を「菌分離」ではなく「PCR」による陰性化確認とする（を加えるか）？ 現在の確認期間を短縮出来るか？



- ・ 地方衛生研究所等への実施状況確認・まとめ
- ・ EHEC検査・診断マニュアル（感染研HPから入手可能）の改訂

## 2) EHEC陰性化確認のための細菌学的研究課題

- ・ 同一患者由来で同一血清型EHEC株のゲノム多様性
- ・ 次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析手法の確立

# EHEC陰性化確認法について (1)

## 意見聴取1 (2021年2-3月：4地衛研の担当者)

### ・PCRは既に導入済み

- 1) 増菌培養液のPCRで陰性の場合には陰性と判定している
- 2) 1) で陰性であってもプレート上の濃厚発育部位のスワイプPCRを実施 (プレート培養後のPCRの方が感度がよい場合もある)

→ 1-2日の短縮は可能

### ・PCRは大腸菌分離後のVT確認時のみ使用

- ・ 便中への排菌量は増減が激しい (1回の検査だけでは不十分)
- ・ 通知またはマニュアル化 (EHEC検査マニュアル [感染研HP掲載] ) を希望
- ・ 保育所等の事例では48hインターバルで2回の陰性確認が必須 (現在のガイドライン)

# EHEC陰性化確認法について (2)

## 地方衛生研究所からの意見聴取 (最終まとめ)

2021年8-9月, 79施設, eメール : 57施設から回答済み (2022年2月28日現在)

### 質問項目 :

- 1) 分離途中段階でPCRによる確認を取り入れるべきか否か (培養法および分離株のPCR検査のみを実施する) ?
- 2) PCRを取り入れるとした場合、どの段階 (便から直接、増菌培養後、コロニースweepなど) でやるのがよいか ?
- 3) PCRの鋳型抽出法は、(アルカリ) ボイル法でよいか、あるいはDNA精製を行ったものを使用すべきか ?
- 4) PCRはコンベンショナル (エンドポイント) でよいか、リアルタイムPCRとする必要はあるか ?
- 5) その他コメント (抗菌剤を投与した場合は服薬中と服薬中止後48時間以上経過した時点での連続2回となっているのは何故か ?)
- 6) 各施設での陰性確認の方法

### 1) 分離途中段階でのPCRのみによる陰性確認の是非について

- ・肯定 (すでに実施、実施すべき、実施が望ましい、実施可能) : 39施設
- ・否定 (すべきでない) : 4施設 (科学的データが必要, 感染症法上の規定に反する, 増菌後PCRで陰性でもEHECが分離されることがある, コロニースweepPCRを実施しているため, 死菌を検出する)

### 2) 増菌培養後のPCRのみで陰性確認 : 4施設 (その他 : 増菌培養後 and/or コロニースweepPCR)

### 3) アルカリボイル法 : 27施設

### 4) リアルタイム : 13施設, コンベンショナル : 18施設, どちらでもよい(選択可能として欲しい): 7施設 LAMP法 : 1施設

### 5) 理由は不明 : 他の3類感染症 (コレラ, 赤痢, チフス, パラA) との違いが不明 (今後の課題)

### 6) 厚労省の指針またはEHEC検査・診断マニュアルに準じて実施している施設がほぼすべて (外注 : 1施設)

# EHEC陰性確認手法の改訂案

## 現時点での改訂案

- ・ 検査時間短縮のためにPCR法による陰性確認法を実施可能とする。  
(増菌培養後のPCR および/または コロニースweepPCR)

ただし、

- ・ 増菌培養に用いる培地について  
評価は困難；感染研ではHUS患者便からのEHECの検出にはBPW, mEC（ノボビオシン添加），TSBを増菌培養液として使用（提案事項としてEHEC検査・診断マニュアルに記載）。
- ・ PCRの結果は陰性確認に限定する（PCR陽性の場合は分離確認が必要）。
- ・ O157, O26, O111等選択分離培地が有効なO群については培養法のみによる確認も可能とする。
- ・ リアルタイム/コンベンショナル, DNA調製法は各施設での選択とする。

# その他の要望・問題点（同一のコメントが複数あったもの）

- ・PCRの場合、検査対象にもよるが、少なからず**死菌の影響**を受ける事もあるかと思うが？
- ・菌数が少ない場合や死菌が存在する場合に**PCR陽性でも培養で陰性のケース**が考えられるが、その際に**どこまで培養を継続すべきか**？
- ・抗菌剤を投与されなかった場合の**陰性確認採便のタイミング**を示してもらえると現場としては助かる。
- ・AMR対策により、有症者の中でも軽症者に対しては抗菌剤を投与されない。有症者の場合、抗菌剤が投与されていない場合でも、2回陰性確認をしているところですが、なかなか陰性化しないことが多く、**陰性確認検査が数週間と長引く**ことがあります。「**抗菌剤を使用しない場合には発症後〇日後を目途に検査**」等を明記していただくとありがたい。

- MLVA法（泉谷）

# EHEC MLVAについて

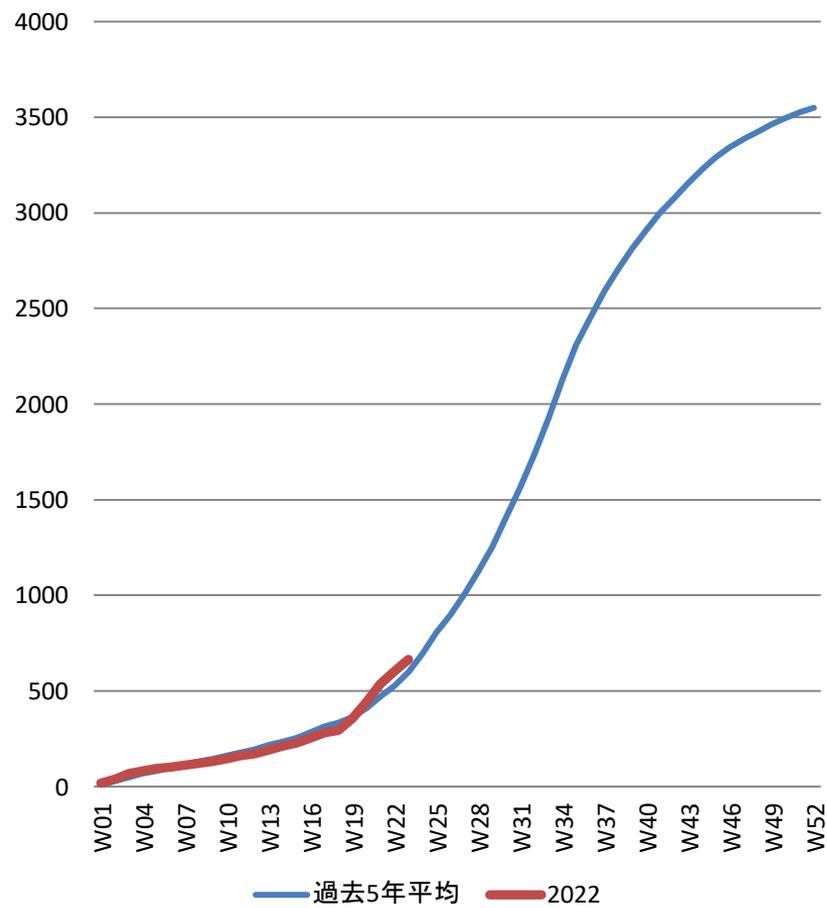
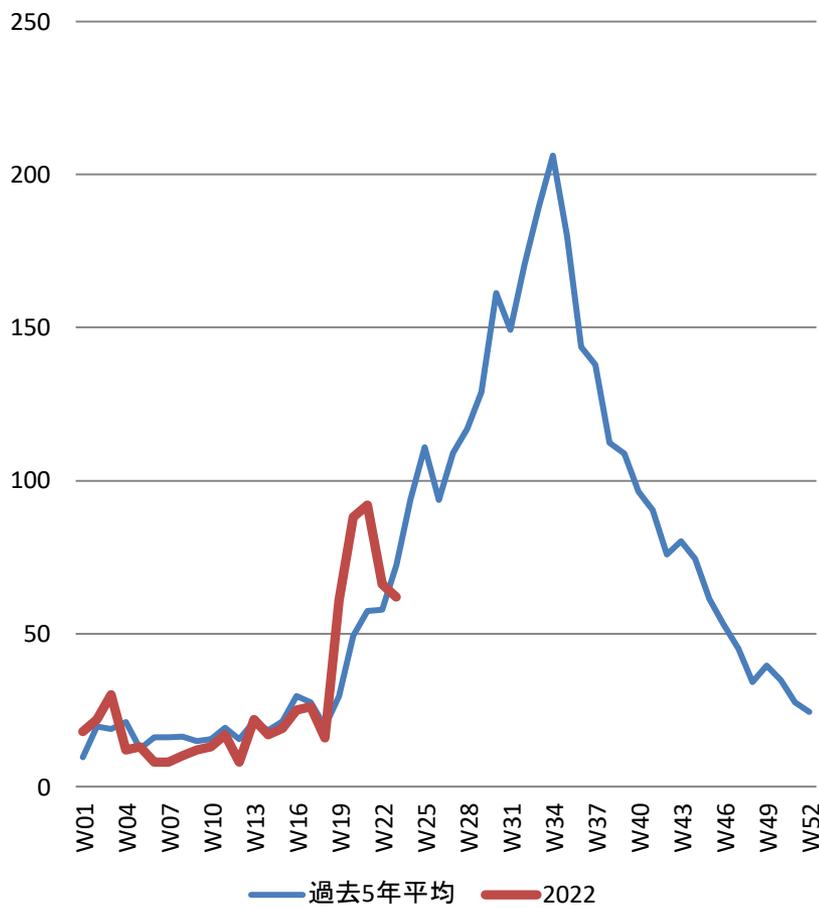
衛生微生物技術協議会第42回研究会

—大腸菌リファレンス会議

国立感染症研究所細菌第一部

泉谷秀昌、伊豫田 淳

# 2022年EHEC感染症発生状況



# わが国でEHECに使われてきた 分子疫学解析手法

1996

PFGE

- la,l,l  
(RAPD)  
(ΔFLP)

2004

PFGE  
(Pulsenet  
protocol)

2012

IS-PS

- O157
- 32箇所の  
IS
- +4種類の病  
原性遺伝子

2014

MLVA17

- O157
- O26
- O111

2018事務連絡

統一手法

(2017:追加5血清群)

ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2020)

N#858など



n=40,066

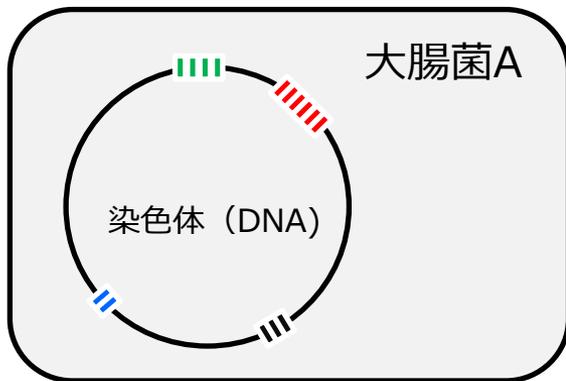
# 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について(平成30年6月29日)

- 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒については、平成29年夏期の発生事例を踏まえ、同年11月に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を行い、事例の検証、今後の対応等を整理し公表しています。
- 今般、当該取りまとめを踏まえ、病因物質が腸管出血性大腸菌O157, O26, O111と疑われる場合は、下記の関係通知に加え、別紙のとおり取扱うこととしますので、実施方よろしくお願ひします。
- 別紙 1. 概要
- 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒の調査について、事案の早期探知、関係部門間の連携及び情報の共有等を目的として新たに、疫学情報に感染症サーベイランスシステムにて付与された番号(以下「NESID ID」という。)を付して管理するとともに反復配列多型解析法(Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis 以下「MLVA 法」という。)による解析結果を一覧化して共有を行うこととするため、その取り扱いについて定める。また併せて、国、都道府県等関係機関1の連携・協力体制を確保するため、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情報の共有手順等について定める。

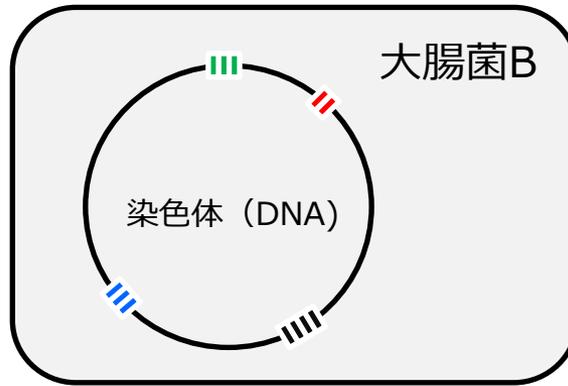
# MLVAについて

## 原理

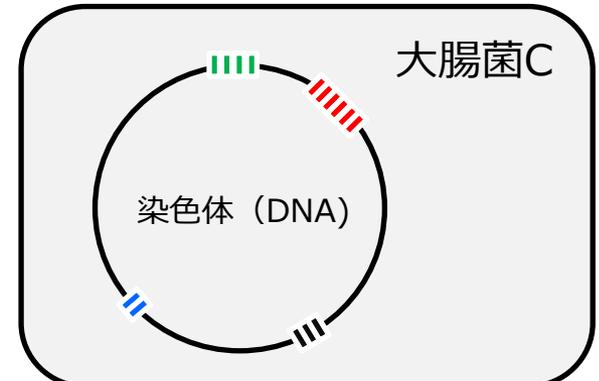
大腸菌の染色体上に存在する複数箇所（緑-赤-黒-青）の反復配列領域を解析してそれぞれの繰り返し回数を数える。



緑4 - 赤6 - 黒3 - 青2



緑3 - 赤2 - 黒4 - 青3

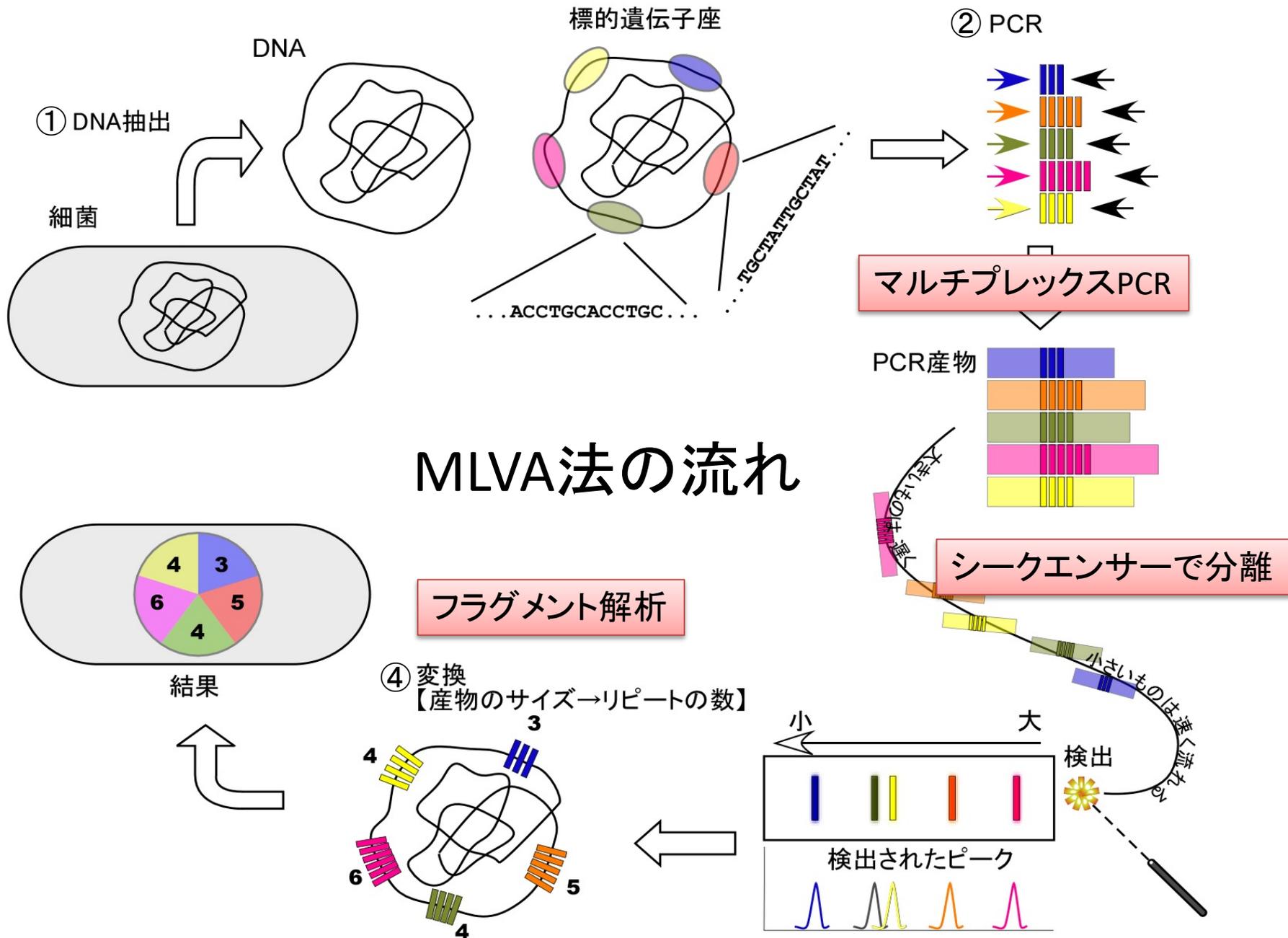


緑4 - 赤6 - 黒3 - 青2

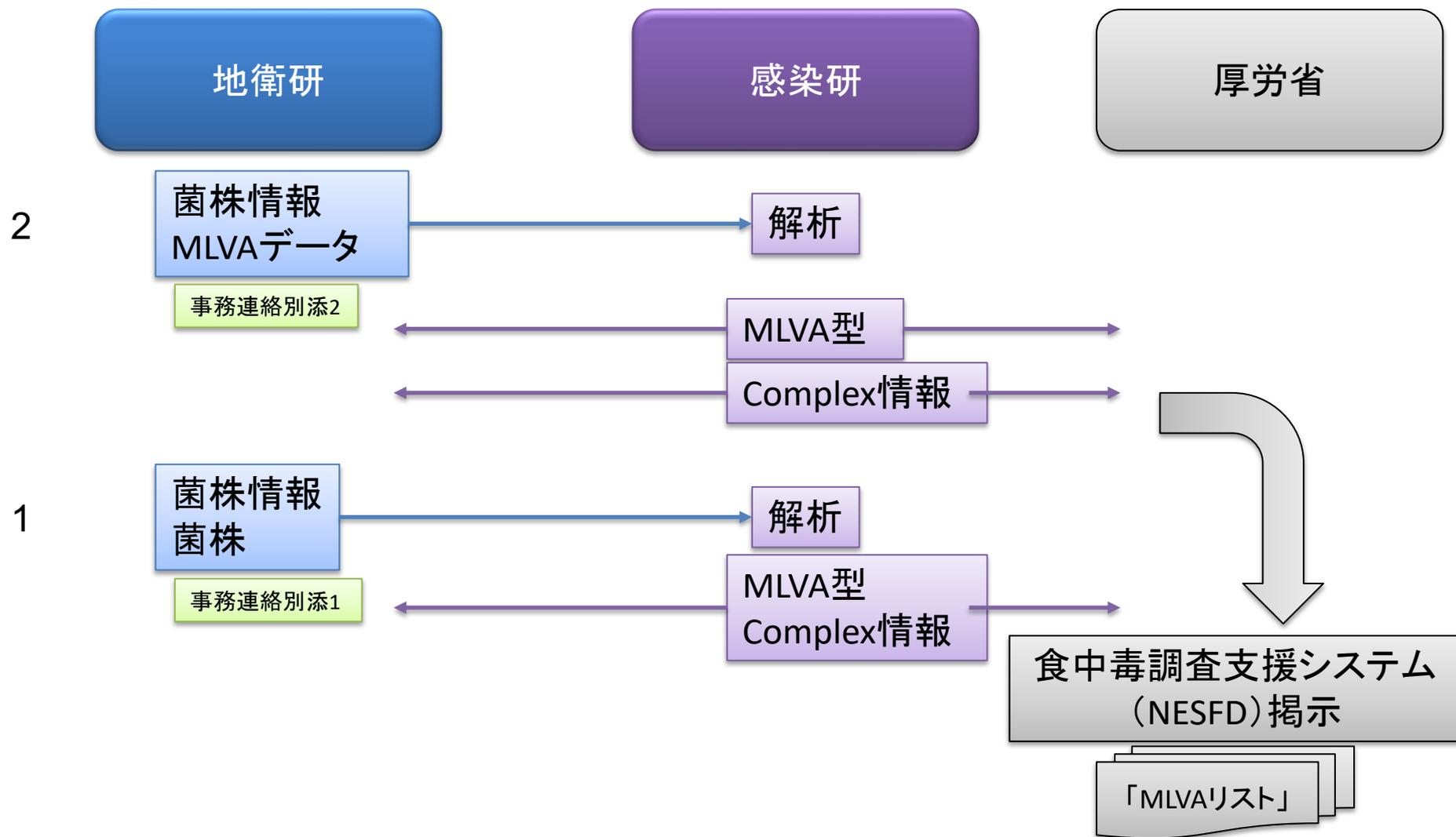
## 実際のデータ

MLVA型	遺伝子座	O157-34	EHC-1	EHC-2	O157-9	EHC-5	O157-3	O157-25	EH111-8	EH157-12
	リピート数	9	8	4	11	-2	15	5	1	7
19m0487	遺伝子座	EH111-14	EH111-11	O157-17	O157-36	O157-19	EHC-6	O157-37	EH26-7	
	リピート数	-2	2	4	4	7	-2	9	-2	

(-2: 増幅産物なし)



# 送付MLVAデータに基づく MLVA型付与について(厚労省事務連絡)



# 別添1

別添1、2、3.xlsx - Excel

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	別添1:地方衛生研究所等の検査実施施設から国立感染症研究所細菌第一部へ菌株を送付する際に添付																
2	発症日	分離日(不明の場合は診断日)	地研菌株	疫学情報(散発・集発)	症状	O:H	感染研O:H	VT1	VT2	測定法	MLVAtyp	MLVAcon	PFGE	コ	入手先	NESID#	自治体名
3	2018/4/1	2018/4/7	nnnn1			O157:H7		-	+	P,R,I					yy衛生研究所		A都
4	2018/4/1	2018/4/7	nnnn2			O157:H7		-	+	P,R,I					yy衛生研究所		B県
5	2018/4/1	2018/4/7	OS1			O157:H7		+	+	P					zz衛生研究所		C市
6																	
7	※灰色セルは、感染研入力データ																
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	
21																	

別添1 (菌株送付) | 別添2 (MLVA結果送付) | 別添3 (厚労省→NESFD)

準備完了 | アクセシビリティ: 検討が必要です | 表示設定 | 160%



# MLVA型付与について

## 導入時

- 送付済み菌株のMLVAデータ送付
- 感染研→地研

## 導入後

- 菌株とMLVAデータの送付(地研→感染研)
- 精度確認(答え合わせ)(感染研→地研)

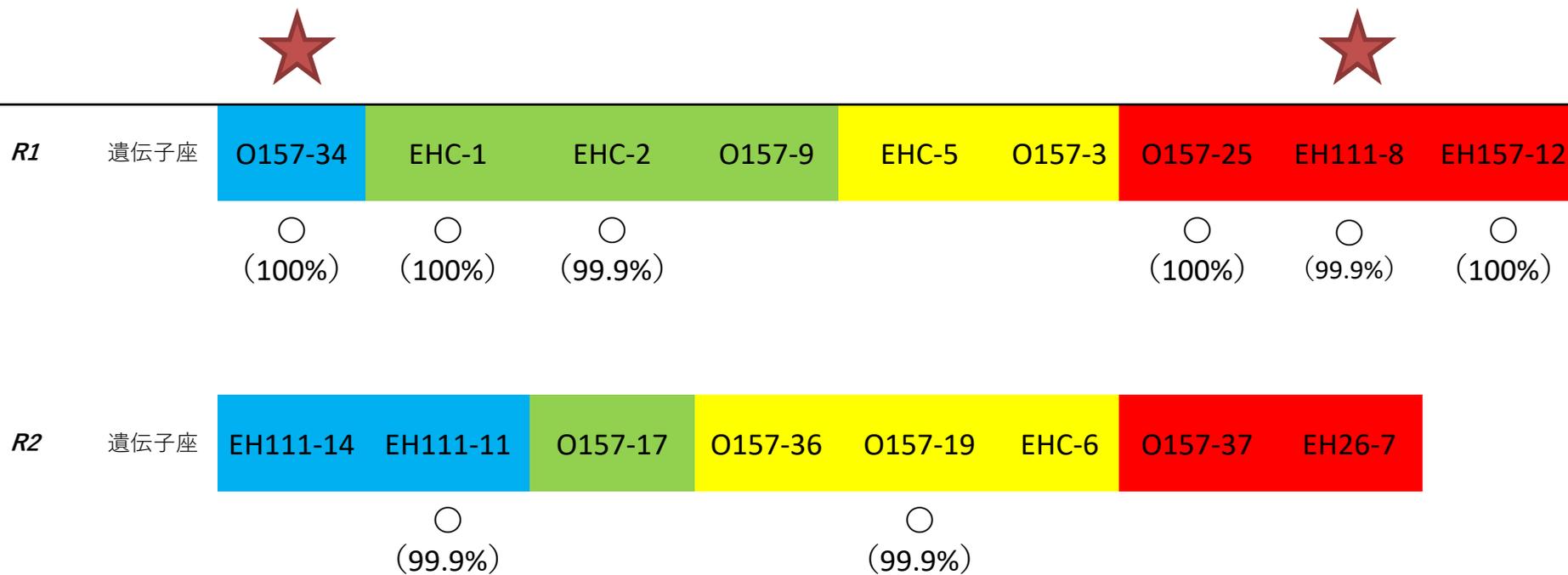
感染研側からも地研側からもデータのやり取りに問題がないと判断

## 型名付与

- MLVAデータの送付(地研→感染研)

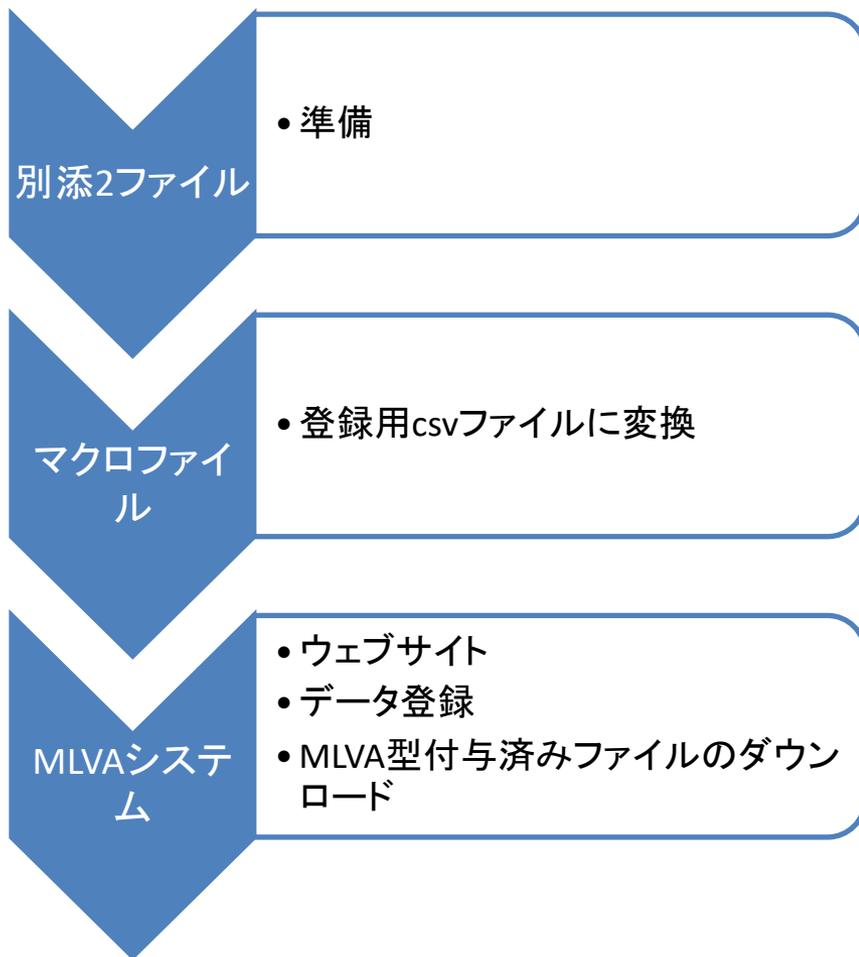
定期的に菌株を送付(地研→感染研)して精度確認(感染研→地研)

# 0157、026、0111においてピークの出現頻度が99%以上(2017-2020年株)の遺伝子座



データ送付前に最低限チェックしていただきたい箇所

# MLVAシステムについて



- オンライン上でMLVA型が付与されるシステム
- 利用前提
  - 結果が安定している
  - リアルタイムにMLVAを実施
  - マクロファイルが使用可能
    - 使用できない場合には、各機関のIT担当部署に相談してください



利用条件を満たしていると判断された場合には、ご連絡いたします。

# 精度確認 (答え合わせ)

- メールベース、システム経由にかかわらず、定期的に菌株を送付し、精度確認を実施してください。
  - シーズンオフ中
  - 担当が変わった際

# お知らせ

- 7月以後は2022年株のみと比較を行います。
- 引き続き、菌株(ならびに情報・データ)送付のほどよろしくお願いいたします。

- 全ゲノム解析法（李）

衛生微生物技術協議会 第42回研究会  
EHECリファレンス委員会  
全ゲノム解析関係

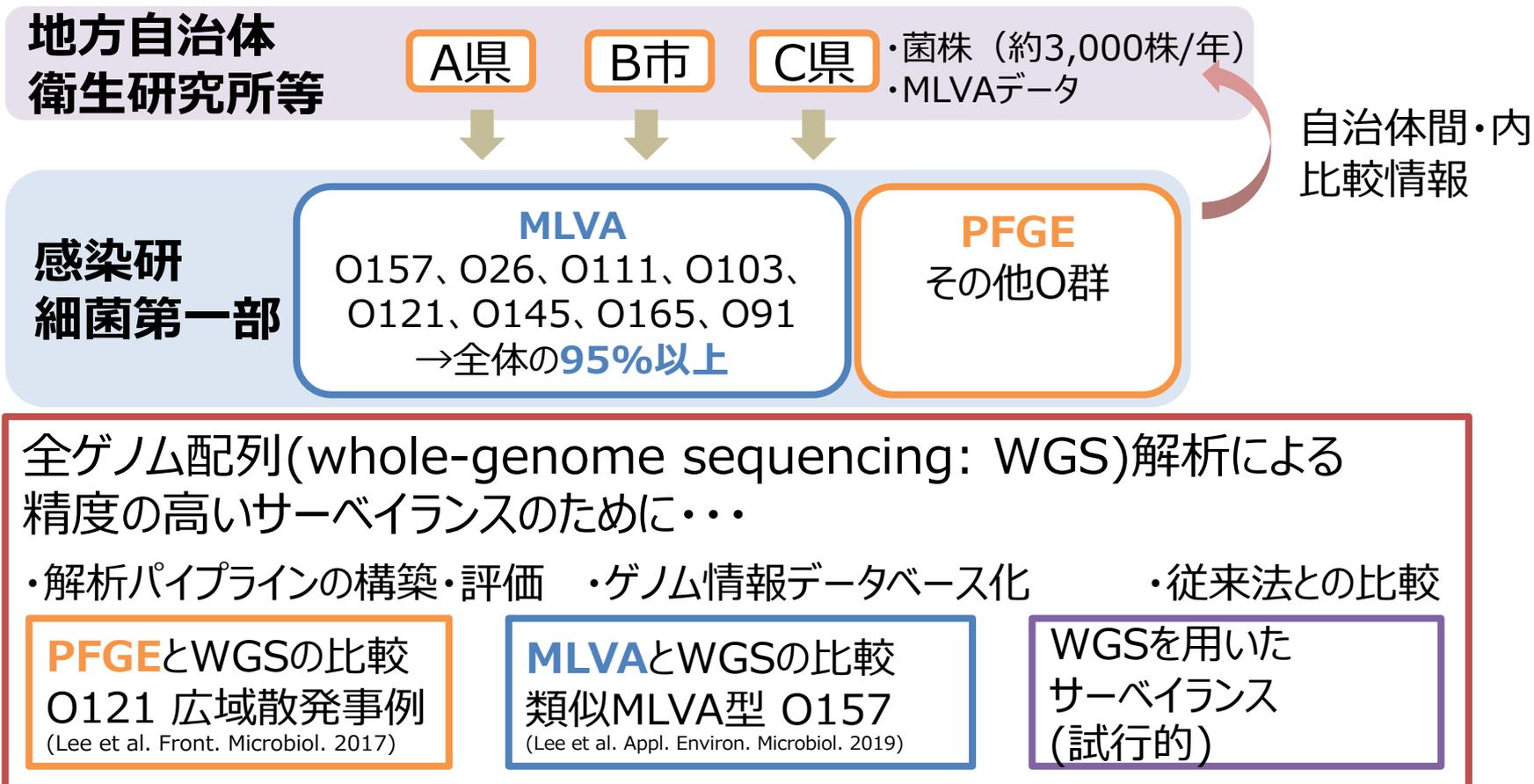
2022.06.30



国立感染症研究所・細菌第一部

李 謙一

# EHECの全国サーベイランス



# WGSを用いたサーベイランス：対象菌株・目的

## 2012～'21年のEHEC菌株数

Year	全株	MLV対象 O群の型数（同一MLVA型は含まない）									PFGE対象 O群
		O157	O26	O111	O121	O103	O145	O165	O91	計	
2012	2,840	17	1	0	0	0	0	0	0	18	2,818
2013	3,350	695	216	47	0	0	0	0	0	958	1,293
2014	2,786	646	213	45	0	0	0	0	0	903	237
2015	3,187	573	234	51	0	2	0	0	0	860	870
2016	2,679	586	221	44	28	48	16	8	21	972	28
2017	3,362	597	246	52	33	46	19	8	30	1,031	595
2018	2,972	679	231	55	46	53	27	4	30	1,105	186
2019	2,896	524	163	59	35	55	21	4	25	886	791
2020	2,271	521	170	58	28	58	18	4	30	887	263
2021	2,119	476	145	64	19	46	9	4	29	792	317

一部株を  
WGS

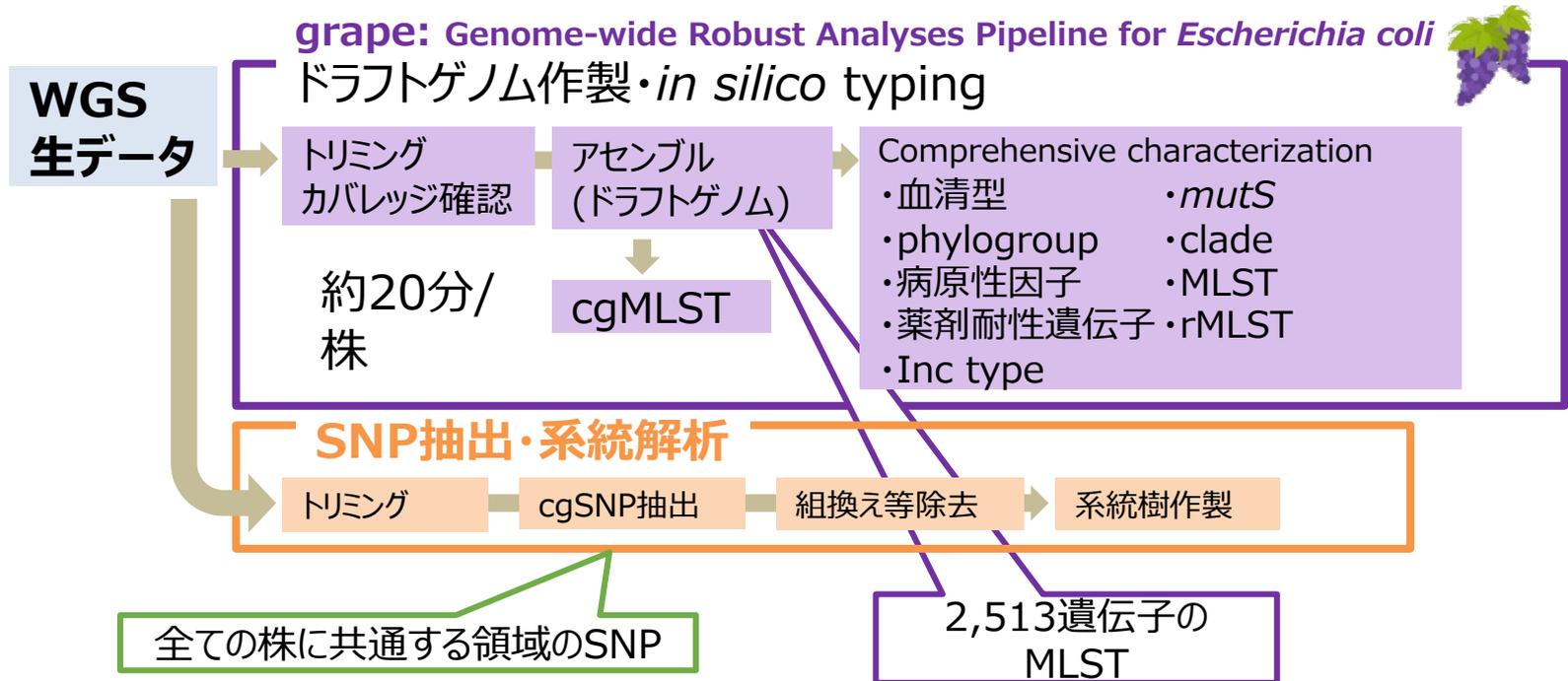
全株のWGS  
\*同一MLVA型  
を除く

### 目的

- ・従来法（MLVA等）の評価
- ・より精度の高いクラスター検出（集団感染/散発株の関連性）
- ・長期的な流行系統の検出

# WGS解析パイプライン

ほぼ自動で基本的な解析（血清型、保有遺伝子、系統樹）ができる体制を構築



# WGSデータベース化と迅速解析法の確立



集団感染株の  
WGS

**cgMLST  
データベース**  
=大規模解析向き

国内EHEC  
約8,000株

公共データベース  
(主に海外株)  
約20万件

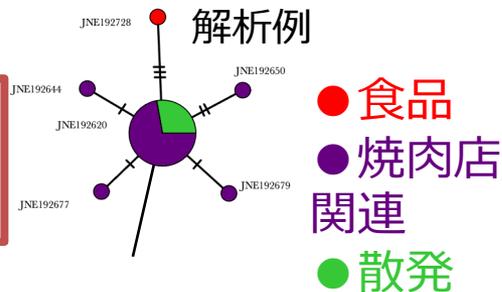
・国内EHECのcgMLST・  
cgSNPのデータベース化

**cgSNP  
データベース**  
=詳細解析向き

国内EHEC  
約8,000株

・新たなゲノム情報が得られた  
際に、迅速にデータベースから  
近縁株を抽出する手法を確立

国内・海外株データベースから  
迅速に(4日~)  
最も近縁な株を抽出



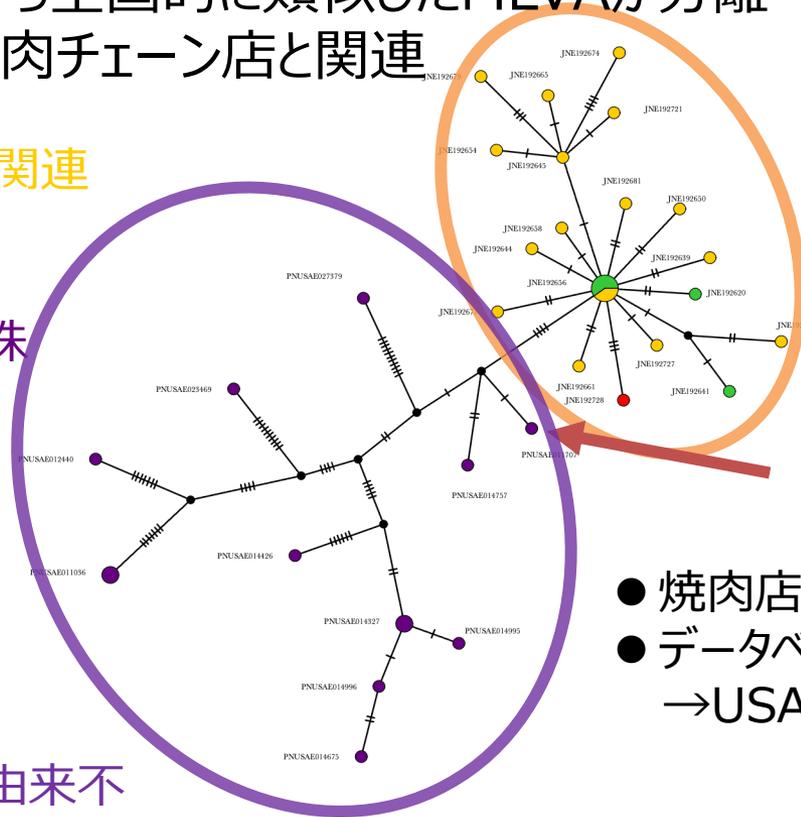
その他国内・海外株とは40SNP以上異なる

# 2019年焼肉店食中毒と海外株

## 【背景】

- 2019年11月から全国的に類似したMLVAが分離 (19c058)
- 一部の株は、焼肉チェーン店と関連

- 焼肉店関連
- 食品
- 散発
- アメリカ株



日本19c058  
● 焼肉店関連  
● 散発例  
→8SNP以内

由来不明USA株  
と最小で5SNP

- 焼肉店・散発株は同一クローン
- データベース株との比較  
→USA株と近縁

USA  
いずれも由来不明

# お願い①：動物由来STECのWGS

技術的には原因となる  
農場・動物まで  
さかのぼることが可能

原因動物・農場が  
分かれば、  
**原因となる食品・伝播  
経路**が分かる可能性



動物由来株の収集

WGS・ヒト由来株との比較  
※結果は分与元で発表  
ただいて差し支えありません

協力いただける方は  
感染研・細菌第一部  
李 謙一 まで  
[leek@niid.go.jp](mailto:leek@niid.go.jp)

# お願い②：EHEC患者のメタゲノム解析

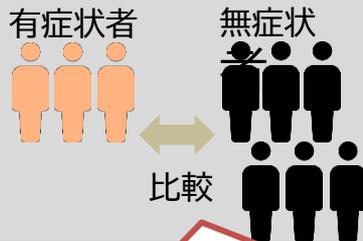
研究費：文部科研（基盤C）2021-2024年

“メタゲノム解析による腸管出血性大腸菌の病態解明および高精度診断法の確立”

目的: 主にメタゲノム解析を用いて…  
・EHEC/HUS事例に特異的な菌叢を特定する  
・迅速・高精度なHUS診断法の確立

伊豫田さん・HUS  
診断依頼検体の利用

## 1. 集団感染事例の解析



## 2. HUS事例の解析

- 2.1. 重症例菌叢の解明・原因特定
- 2.2. 小型シーケンサーによる迅速診断法の確立

## 3. 腸内細菌がEHECへ与える影響の検証

地方衛研から集団感染時の検体を収集

期待される成果:

- ・プレ/プロバイオティクス等EHEC制御法につながる知見
- ・EHEC、HUS診断の高精度化

協力いただける方は  
感染研・細菌第一部  
李 謙一 まで  
[leek@niid.go.jp](mailto:leek@niid.go.jp)