

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和1年度 総括研究報告書

食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究

研究代表者 大西 真 （国立感染症研究所細菌第一部・部長）
研究分担者 林 哲也 （九州大学・大学院医学研究院・教授）
研究分担者 大岡 唯祐（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学・講師）
研究分担者 鈴木 匡弘 （藤田医科大学・医学部・准教授）
研究分担者 砂川 富正 （国立感染症研究所感染症疫学センター・室長）

研究要旨

腸管出血性大腸菌の調査を高度化するためのツール開発を行なった。IS-printing (IS-P) 法はスクリーニング法として各地の地方衛生研究所等で広く使用されているが、現時点では O157 と O26 のみに適用可能である。

IS-P に関して、EHEC O121 と O111 用のプロトタイプの検証が、全国地方衛生研究所の協力で実施された。問題点を抽出し、開発系の改善等を実施した。EHEC O103 用の解析系を含めほぼ実用化に向けての検証が終了した。また、迅速・簡易な分子疫学解析法として利用されている PCR based ORF typing (POT) 法の検証も、全国地方衛生研究所の協力で実施された。O121 及び O157 以外の多様な血清型において *D* index 0.997 (O111) ~0.961 (O145) と良好な菌株識別能力を実現した。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、希な血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。IS-P および POT 法よりも高精度な手法である MLVA 法も実際に使用し、データの蓄積がなされた。

また、より迅速な集団発生・広域散発事例の探知を目的として、2018 年に開発した広域事例疑い探知システムの改良を行い、2019 年 6 月より本格的に稼働させた。主な改良点は、2018 年データを用いた試行結果から、発生頻度を考慮しつつ迅速に情報提供を行うためのアラート閾値を設定したことである。結果として、6 月以降に計 4 回厚生労働省の関係部局への情報提供を行い、調査へとつなげることができた。

A. 研究目的

食中毒調査においては、迅速な探知が原因食品を市場から取り除くことにつながるため、全国地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所は EHEC 分離株の分子型別が実施されてきた。各型別法には時間、労力、解像度、多施設間比較の面で長所、短所があるため、複数の方法を組み合わせることで目的に応じて使い分けている。スクリーニング法として IS-printing (IS-P) 法が開発され (Ooka et al. J Clin Microbiol 2009, Mainil et al. J Appl Microbiol 2011)、解像度は低いが簡便・迅速・多施設間比較が容易な IS-P 法で一致した菌株は高解像度である PFGE 法で確認する手順が広がった。さらに、高解像度に多検体解析可能な MLVA 法 (Izumiya et al. Microbiol Immunol. 2010) が感染研と一部の地衛研で実施可能となり、IS-P 法と MLVA 法との組み合わせが最も迅速に結果が得られると考えられてきた。しかし、IS-P 法は O157 と O26 のみに、MLVA 法は O157, O26, O111 のみに可能であり、対象の拡大が望まれる。また、

近年、新規簡易迅速型別法 (PCR-based ORF typing, POT 法) が開発され、様々な病原細菌に応用されてきた。

本研究では IS-P 法 (O111, O103, O121)、EHEC-POT 法については不足するゲノム情報の取得とシステムの開発を H31/R1 年度に地方衛生研究所の協力で試行し、最終的な系の検証を実施した。MLVA 法に関しては、O103, O121, O145 解析用システムを H30 年度から実用化されており、そのデータ蓄積を進めた。また、わが国では分子型別法データと疫学情報との統合が困難となっているため、分子型別法の結果と疫学情報を効率良く簡便に統合するシステムも合わせて開発することを目的とした。

本総括研究報告書では、分担研究の概要と代表者が主として進める MLVA 法の対象拡大について記載する。分担研究の詳細は各分担報告書に詳述されている。

B. 研究方法

分担研究の研究手法の詳細は各分担報告書に詳述されている。

MLVA 法の検証: MLVA 法の対象を広げるための新規プライマーセット (MLVA43)を利用して、EHEC 0103, 0121, 0145, 0165, 091 計 426 株を解析し、解像度 Simpson's 多様性指数(SDI)を求めた。また、H31/R1 年分離株について解析を行い、解像度を検証した。

C. 研究結果

(1) MLVA43 法を用いた 2019 年分離株の解析

2019 年に国立感染症研究所に分子型別解析依頼があった、腸管出血性大腸菌 2863 株のうち、0103, 0121, 0145, 0165, 091 が 426 株存在した (0103 株 = 206 株、0121 株 = 81 株、0145 株 = 93 株、0165 株 = 4 株、091 株 = 42 株)。MLVA43 法により、各血清群の菌株に対する多様性指数は EHEC 0103 = 0.878, 0121 = 0.936, 0145 = 0.830, 0165 = 0.750, 091 = 0.971 であった (表 1)。2018 年分離株を用いた解像度の解析と比較して 0145 分離株の解像度が低下したが、これは 8 月下旬から 9 月上旬にかけて東海地方を中心に集積した 19m6006 型 (34 株)によって、見かけ上の解像度の低下と考えられた。

感染研に MLVA43 依頼があった EHEC 菌株の分離日から感染県受領までの日数を図 1 に示した。迅速な解析が可能な MLVA 法であるが、感染研が菌株を受領するまでの日数が 2 週間以内に受領される菌株は 17.7%、4 週間以内のものでも半数にみえない (43.3%)。

感染研に EHEC 分離株の MLVA43 を依頼した施設は 94 施設であった。一方で、EHEC 0157/026/0111 用の解析手法である MLVA17 法を実施する地方衛生研究所 (計 27 機関) が増加し、2018 年 (13 機関) と比較すると倍増した。2018 年より MLVA データに基づいた MLVA 型名の付与は感染研で実施し、地方自治体、厚労省と共有されるようになった。2019 年は 0157/026/0111、計 650 株のデータの型名付けが感染研でなされた。分離日からデータ受領までの日数が 4 週間以内であったものが約 7 割であった (69.8%)。2 週間以内に MLVA データを受付し MLVA 型が共有された菌株数は 36.6% を占めた。施設毎で感染研へデータを送付するまでの日数は異なることが示された。各施設において菌株を病院・検査会社から入手するまでの手順・時間が異なることによって、MLVA 解析データの共有にかかる時間が影響されているのかもしれない。

林による分担研究では 0121 および 0103 解析用の IS-P (IS-P_0121, IS-P_0103) の開発が進められた。

まず、IS-P_0121 プロトタイプの実験での検証が実施された。19 の地衛研から協力が得られ、97 事例 (154 株) の解析結果を得ることができた。その結果、

- (1.1) 判定ができなかった事例の存在
- (1.2) 集団感染事例における不一致例の存在
- (1.3) 予想より低い分離解像度
- (1.4) 分離結果の判定が困難となる例の存在

が見出された。

そこで、ISprinting システムとその開発パイプラインの改善が試みられた

- (2.1) 挿入部位選定に使用するプログラムの開発
- (2.2) 分離解像度の向上に向けたシステムの改善

東京工業大・伊藤研究室と共同で、新たな IS 挿入状況解析プログラムとして IShunter (仮称) を開発し、標的部位選定に使用する解析プログラムとした。IShunter に変更したパイプラインを使用し、プロトタイプ検証で明らかとなった問題点も踏まえて、IS-P_0121 では IS600 と IS629 の標的部位をそれぞれ 13 箇所ずつ選定し、別々のチューブで反応を行うことに変更した。IS-P_0103 でも、IS-P_0121 プロトタイプの検証結果を踏まえて、IS629 の標的部位を 26 箇所選定し、2 チューブで 13 箇所ずつを解析するように変更した。

また、検定使用株の最適化をはかるためにゲノム情報を利用して、0121 は 61 株、0103 は 63 株を検定に使用することになった。

IS-P_0121 最終版の開発版として IS600 の 13 箇所と IS629 の 13 箇所を選定した。選定した挿入部位を使用すると、*in silico* の検定では、61 株を 54 パターンに分離できる。選定した標的部位について、それぞれ 1 チューブずつで判定するマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。作成したプライマーミックスを用いて実サンプルを用いたマルチプレックス PCR を実施し、バンドの増幅具合やバンド間隔などを確認し、さらにプライマーの変更を行い、最終版を作成した。現在、変更したプライマーに対する陽性コントロールの作成のみを残す状況となっている。

IS-P_0103 最終版の開発として、同様に対象部位 26 箇所を選定し、13 箇所ずつ判定を行う 2 チューブでのマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。作成したプライマーミックスを用いて実サンプルを用いたマルチプレックス PCR を実施し、バンドの増幅具合やバンド間隔などを確認したところ、26 箇所のうち 2 箇所が判定には不適であることが判明した。そこで改めて他の挿入部位から 2 箇所を選定し直し、最終的なプライマーセットを作成した。このセットの *in silico* の検定では、63 株を 41 パターンに分離できる。現在、変更した標的部位に対する陽性コントロールの作成のみを残す状況となっている。

大岡による分担研究では O111 解析用の IS-P の開発として、

- 1) O111 IS-P 法プロトタイプからのプライマー選別および改良
- 2) PCR および泳動条件の再至適化
- 3) PCR コントロール DNA の作製
- 4) 協力機関におけるプライマーセットおよびコントロール DNA の検討

が行われた。PCR コントロール DNA の結果から、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 1NR (986bp) と 2NR (887bp) および 6R (502bp) と 7R (475bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。集団事例由来株の解析では、計 12 事例の解析が行われ、いずれの事例由来株も同一のバンドパターンを示すことが示された。

鈴木による分担研究では non-O157 の腸管出血性大腸菌 (EHEC) の迅速・簡易な分子疫学解析法として PCR based ORF typing (POT) 法改良の検討を行った。愛知県衛生研究所保有株および感染症研究所提供株 DNA を使った検討、並びに全国 14 カ所の地方衛生研究所にプライマー、Taq ポリメラーゼ、陽性コントロール DNA を送付し、各地方衛生研究所における保存株を用いた EHEC-POT 法の評価を行った。解析対象株は O26 46(44)株、O91 34(31)株、O103 113(102)株、O111 30(27)株、O121 72(58)株、O145 97(79)株、O157 202(202)株、O165 39(35)株、その他 45(40)株の合計 678(618)株のデータが得られた (かっこ内は集団事例を除いた株数)。EHEC-POT 法によって、O121、O157 を除く血清型の EHEC を汎用的にタイピングすることができた。

集団事例 (21 事例) 由来の 60 株については、20 事例由来の 57 株では同一集団内で同一 POT 型となった。しかし O121 による 1 事例については、3 株中 1 株が異なる POT 型となった。

砂川による分担研究では、

- 1) MLVA データと NESID データの連携と活用等の検討
- 2) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知

が行われた。

MLVA クラスタの規模別の発生頻度を見ると、規模が 2 の事例が最も多く、規模が大きくなるにつれて発生頻度は減少した。規模が 9 以上で発生頻度は大きく低下し、11, 13, 16, 17, 20, 21, 23 の規模の事例がそれぞれ一回ずつであった。規模が 9 以

上の事例 (計 7 回) は、全体の発生回数 (84 回) の約 8%であった。

アラートのレベルごとの閾値を砂川図 1 のように設定した。最も高いレベル 4 は、2018 年データを用いた試行では年間の発生回数が 5 回であり、このレベルに至った場合は直ちに厚生労働省への情報共有を行うこととした。レベル 2 以下の場合、内部注意喚起及び監視強化を行うこととした。レベル 3 は他の情報と合わせて総合的に判断し、場合によっては厚生労働省への情報共有を行うこととした。

図砂川 1. 各レベルの閾値設定と、2018 年データにおける発生回数

		ベースラインからの逸脱度	
		+1SD以上2SD未満	+2SD以上または2週連続で+1SD以上
患者インベント数/週	1~ 9件	レベル 1 14回	
	10~ 19件	レベル 2 3回	レベル 3 2回
	20件~	レベル 2 + 2回	レベル 4 5回

2019 年 6 月からこのアラート閾値によりシステムを稼働させた結果、アラートレベル 1 以上が 24 回発生した。うち、最終的にレベル 3 まで至った事例が 3 回、レベル 4 まで至った事例が 2 回発生した。レベル 3 以上のうち 4 回のアラートで、厚生労働省 (食品監視安全課及び結核感染症課) への情報提供を実際に行った (O26VT2・第 20 週, O145VT2・第 36 週, O157VT1VT2・第 44 週, O157VT2・第 46 週)。性別・年齢分布の偏りと直近の報告の増加傾向を考慮して早めの情報提供を行うことも可能であった)。

D. 考察

各地衛研における IS-P_O121 のプロトタイプ検証により、IS-P システム全体に関する問題点を洗い出すことができた。改良した IS-P 開発パイプラインは一定の精度を維持したまま大部分の作業をオートメーション化しているため、他の菌での IS-P システムの開発への応用が容易である。また、この改良過程で開発した IShunter プログラムは、IS-P システムの開発だけでなく、他の IS 関連研究にも貢献できると思われる。IS-P システムの開発に関しては、一部の陽性コントロールの作成のみを残すのみの状態であり、新型コロナの問題が落ち着いた段階でプライマーセット、プロトコル、陽性コントロールのセットを各地の地衛研へ配布する予定である。

重症合併症を併発する EHEC 食中毒では、集団

感染事例を迅速に検出し、原因や感染経路を特定することが重要であるが、原因や感染経路等が判明しないケースも多い。本研究で作成した IS-P_O103 や IS-P_O121 は、他の分子疫学解析手法や疫学情報と効果的に統合することによって、国内で相当数の患者発生があるにもかかわらず迅速型別手法が開発されていない O103 EHEC と O121 EHEC による食中毒調査の迅速化、高度化、効率化に貢献でき、結果として、より多くのケースで原因を明らかにすることで、より適切な食品の取り扱い方法の提案、問題点の抽出が可能となり、より安全な食品の提供につながると期待される。また、本研究の開発戦略は、他の EHEC や腸管病原菌に対する対策や効率的調査法の開発にも利用できると思われる。

IS-P_O111 に関しては、本年度は、昨年度までに作製した6本のPCRからなるプロトタイプ(FS1-3, RS1-3) からプライマーを選別し、最終版として FS ver.2, RS ver.2 の2プライマーセットを構築した。また、PCR コントロール DNA として、各プライマーペアの PCR 増幅産物をクローニングして混合したポジティブコントロール DNA とセットで配布することにより、PCR および泳動が機能していることを容易に確認できるものとした。協力機関による試用の結果、PCR 機器により増幅効率に違いが出ること、また、泳動機器の違いにより泳動パターンが異なることなどの問題点が見られたことから、本セットの実用化には、プライマーセットの微修正（プライマー配列や各プライマーの混合比）や泳動機器の違いを考慮した精度管理が必要と考えられる。マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いた解析においてバンドサイズが異なるプライマーがあることから、株間で IS 挿入部位の配列に多様性がある場合もあり、増幅産物を判別しやすいサイズに変更するなどの工夫も必要と考えられる。また、3 機関で使用された株において、散発事例由来株でも同じパターンを示す株があり、加えて2株で全くバンドが検出されなかったことから、今後 PFGE やドラフトゲノム解析などによりこれらの株の類似度や系統関係を調べ、必要に応じてプライマーセットの改良を行う必要がある。なお、集団感染事例由来株では、全ての事例で同じバンドパターンを示したことから、本プライマーセットが集団感染の検出や菌株識別にある程度有用性があることが示された。

O157、O121 を除き多様な血清型の EHEC を EHEC-POT 法を用いてタイピングすることができた。EHEC-POT 法は特定の血清型に特化せず、多くの EHEC 分離株に適用することができると

考えられる。

その一方、O157 及び O121 による分子疫学調査はできないと考えられた。この研究では O157 を対象血清としなかったため菌株識別能の確保が十分に行われていない。O157 に関しては MLVA や IS-printing が普及しているため、新たな手法の必要性は低いと考えられる。O121 についてはきわめて多様性の少ないグループであり、POT 法の原理では十分な菌株識別能を実現することはできないと考えられた。MLVA 等、POT 法以外の手法でタイピングする必要がある。全国 14 カ所の地方衛生研究所にプライマーセット及び Taq ポリメラーゼを送付し、検討した結果全ての施設で良好な PCR 反応結果が得られている。また、ほとんど（21 事例中 20 事例）の集団事例において、同一事例の POT 型は同一となり、遺伝子型が安定して得られることも確認できた。このことから EHEC-POT 法は多くの施設で実施可能であり、大部分の EHEC 血清型のタイピングと遺伝子型共有に有効であることが示された。MLVA が普及している血清型（O157、O26、O111）以外の diffuse outbreak 監視に EHEC-POT 法は有効と考えられる。メーカーによるキット販売あるいは改良 EHEC-POT 法のプロトコル開示によって、全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、マイナーな血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

広域事例疑いを早期に探知することができれば、事例発生時の初動調査および介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上の貢献が期待出来る。NESID の届出データを用いた広域事例疑いの早期探知の取り組みにより、2019 年においては、広域事例の疑いとして厚生労働省への情報提供を4回実施し、複数の自治体に対する喫食状況調査等の早期の実施に結びつけることができた。また、迅速探知により早められた調査開始を汚染源の同定につなげるための全体のスキームについて、関係機関との調整を含めた検討を行うことも今後の課題である。

E. 結論

IS-P_O121、IS-P_O111 のプロトタイプの各地の地衛研で検証結果等を基に、問題点の抽出がなされた。IS-P_O121、IS-P_O101 に関しては、開発用パイプラインを改善し、最終的な解析系の開発が完了した。また、EHEC-POT 法によって、O121 と O157 を除くほとんど全ての血清型の EHEC を、実用上問題の無い菌株識別能力で、汎用的に分子疫学解析できる。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、マイナーな血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

MLVA43 法および IS-P と POT 法の組み合わせにおいて様々な施設で解析が可能となり、NESID データを用いた広域散発事例の早期探知と組み合わせることで、広域集団事例の発生時にも迅速な対応の準備が完了したと考えられる。今後、これらの解析手法の普及に努めていく必要がある。

【参考文献】

IASR Vol. 37 p. 161-162 「牛生肉・牛生レバー規制強化後の牛生肉および牛生レバーを原因とする腸管出血性大腸菌 O157 発生状況」
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/2016/08/438d03t01.gif>

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2018年に分離された腸管出血性大腸菌のMLVA法による解析。IASR、第40巻、81-82、2019年5月
- 2) Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M. Effective surveillance using multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for enterohemorrhagic Escherichia coli O157. Appl Environ Microbiol 2019. 85. 10.1128/AEM.00728-19

2. 学会発表

1) 中村佳司、谷口愛樹、西田留梨子、後藤恭宏、小椋義俊、伊豫田淳、大西真、林哲也、腸管出血性大腸菌 O121 : H19 の乳糖分解性に関する遺伝因子の特定、第 162 回日本獣医学会学術集会、2019

年 9 月 10 日-12 日、筑波。

- 2) 谷口愛樹、中村佳司、西田留梨子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也：O121:H19 EHEC 用 IS-printing system の開発に向けた IS の網羅的探索と国内分離株での IS 分布状況解析、第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19~21 日、名古屋
- 3) 中村佳司、谷口愛樹、西田留梨子、後藤恭宏、小椋義俊、林哲也、EHEC O121:H19 の継代培養中に生じる乳糖分解性の変化に関わる遺伝的メカニズムの解明、第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19~21 日、名古屋。
- 4) 谷口愛樹、中村佳司、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也：腸管出血性大腸菌 O103:H2 における高精度系統解析と完全長配列決定株のゲノム構造比較、第 14 回日本ゲノム微生物学会年会、2020 年 3 月 6~8 日、名古屋
- 5) 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2018 年における腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析。第 40 回日本食品微生物学会学術総会、2019 年 11 月、東京都
- 6) WGS 解析による MLVA の評価と効率的腸管出血性大腸菌 O157 サーベイランス手法の確立、ポスター、李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真、EHEC Working Group、第 92 回日本細菌学会総会、2019/4/23、国内
- 7) Whole Genome Sequence-based Surveillance Method and the Comparison with Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis in Enterohemorrhagic Escherichia coli O157、口頭・ポスター、K. Lee, H. Izumiya, S. Iyoda, M. Ohnishi, EHEC Working Group、ASM microbe 2019、2019/6/22

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 2019年分離株を用いた MLVA43法の解像度の評価

2019	0157	026	0111	0103	0121	0145	0165	091
菌株数	1497	474	153	206	81	93	4	42
SDI	0.994	0.977	0.948	0.878	0.936	0.830	0.75	0.971
2018	0157	026	0111	0103	0121	0145	0165	091
菌株数	1509	576	81	126	148	46	4	27
SDI	0.993	0.976	0.965	0.794	0.904	0.905	0.75	0.955

MLVA43法は0157, 026, 0111も解析可能であるため、感染研では0103, 0121, 0145, 0165, 091を含む8つの血清群は共通のMLVA43法で解析をしている。

下段は2018年分離株における解像度

図1 分離日から感染研受領日までの日数の分布

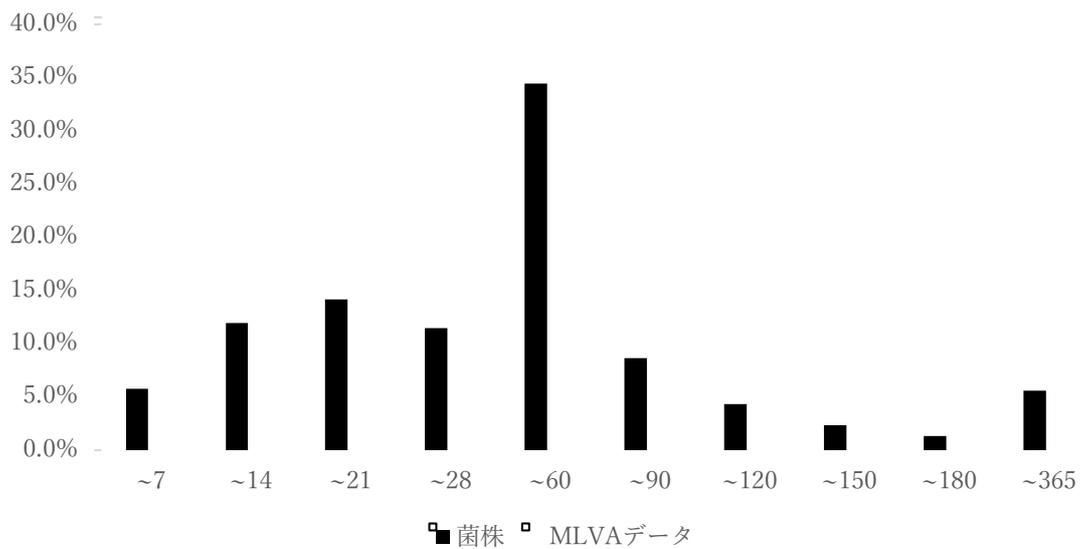
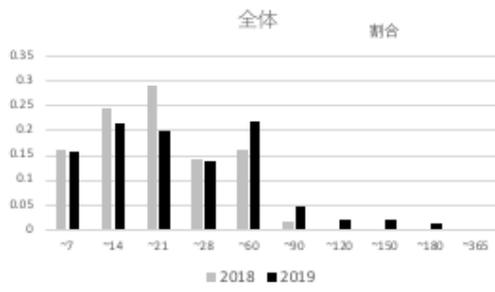


図2 MLVAデータの感染研送付までの日数の分布



	14日以内 (%)	28日以内 (%)
全体 (2019年)	36.6	69.8
施設A	34.5	81.0
施設B	13.7	64.5
施設C	42.3	86.5

