

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）  
総合研究報告書

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。

#### 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(Izumiyama 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 H30 年度までに実施し、H31 年度には地方衛生研究所で試行する。MLVA 法に関しては、O103, O121, O145 解析用システムを H29 年度に開発し、H30 年度は試行、H31・R1 年度には実用化する計画を立てた。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とした。

#### B. 研究方法

分担研究の研究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 O103, O121, O145, O165, O91 を解析し、解像度 Simpson's 多様性指数 (SDI) を求めた。

#### C. 研究結果

(1) MLVA43 法を用いた高精度解析系の開発  
 EHEC O157, O26, O111 用に利用している 17 遺伝子座を用いた MLVA17 法と新規に設定した 26 遺伝

子座を加えた MLVA43 法を比較した。MLVA17 の解析結果と比較して、血清群特異的な MLVA 型が得られることが示唆された。また、同一血清群は 1 あるいは 2 のクラスターに収束し、それぞれのクラスター内の多様性も認められ、良好な MLVA 法が作成されたことが示唆された。各血清群の解析株数と MLVA 型数、および多様性指数を表 1 に示した。全ての血清群の解析において MLVA43 法で見出された型数は、MLVA17 法で見出された型数より多かった。さらに、多様性指数もより高い値を示した。121 および 0145 を対象にした MLVA17 法は多様性指数が 0.9 を下回っていたが、これらの血清群に対しても MLVA43 法は 0.9 以上の多様性指数を示した。

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。

れない。

林による分担研究では

1. ゲノム情報の取得と系統解析
  2. 系統解析
  3. IS 検索と標的 IS の決定
  4. 標的部位の選定と開発パイプラインの構築
  5. IS-P\_O121 プロトタイプの実成と検証及び開発パイプライン等の改良
  6. IS-P\_O121 と IS-P\_O103 最終版の実成
- の各項目で結果が得られた。詳細は、分担報告書を参照されたい。

大岡による分担研究では

- 1) O111 IS-P 法プロトタイプの実成
  - 2) O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証
  - 3) 非特異増幅プライマーの同定
  - 4) O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度の低いプライマーの除去
  - 5) 206 株における IS629 挿入部位の網羅的抽出
  - 6) 菌株識別解像度向上に向けた新規 IS629 挿入部位の検討
  - 7) 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
  - 8) PCR および泳動条件の再至適化
  - 9) PCR コントロール DNA の実成
  - 10) 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
  - 11) マイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いた機関 B による検討
- の各項目で結果が得られた。詳細は、分担報告書を参照されたい。

鈴木による分担研究では

non-0157 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。各血系群における解像度は表 S 1 に示した。

表 S 1 各血清型における菌株識別能力 (同一事例由来株を除く)

血清型	株数	POT 型数	D index
O26	44	36	0.992

O91	31	21	0.968
O103	102	58	0.983
O111	27	26	0.997
O121	58	11	0.702
O145	79	40	0.961
O157	202	66	0.957
O165	35	25	0.978
その他	40	35	0.993

砂川による分担研究では、

- (1) MLVA データと NESID データの連携と統合データの活用に関する検討
- (2) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知に関する検討
- (3) 実際の事例への対応について
- (4) 海外における食中毒調査に関する疫学・病原体情報の連携に関する情報収集

について成果が得られた。詳細は分担報告書を参照されたい。

菌株情報と疫学情報との連携が疑い事例発生初期に難しい現状があったが、感染研に送付される菌株の 77%程度に NESID 番号が付加されるようになったこと、更に付加されない場合においても、本研究で作成した突合プログラムで約 66%において NESID 情報を参照できるような状況になった。

早期探知に関してもアラートレベルを設定し、2019 年において試行したところ、レベル 3 以上の 4 回の事例を見出し、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うことが出来た。

#### D. 考察

O 抗原の多様性からもわかるように腸管出血性大腸菌は多様な菌株集団である。腸管出血性大腸菌感染症の感染源調査、集団事例の原因究明を積み重ねることで、リスク軽減をはかることが重要である。しかしながら、これらの調査を迅速に進めるためには、情報の解析手法を迅速化すること、さらに菌株の同一性を迅速に明らかにすることが重要である。本研究においては、分子型別法の改善・開発と疫学情報の利用法についての開発に着手した。

広域に跨る集団事例の場合においては、それぞれの自治体においては散发例として認識されてしまい、積極的な疫学調査を開始する判断が難しい場合が多い。そのため、全国のデータが集約されている既存の発生動向調査のデータを迅速に処理し、事例の異常集積を把握することを目指した。砂川らの処理手法により 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。なお、2019 年に用いたアラート閾値 (図 1) は 2018 年実績に基づく暫定的なものである。感度、特異度、発生頻度等のバランスを考慮しつつ、より迅速に探知するための閾値設定の再検討を行う必要がある。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。

多様な腸管出血性大腸菌のそれぞれを的確に、かつ迅速に解析する手法の開発を検討した。各自治体の検査施設のキャパシティに応じて利用できるスクリーニング目的としての迅速解析法を複数開発し、応用可能な状態にすることが重要と考えた。一つには、EHEC O157 用に当初開発された IS-printing (IS-P)法の適用拡大を目指した。EHEC O121, O103, O111 に関して、実用化可能な系の開発に成功した。IS-printing 法はゲノム情報を有効に活用し、迅速な解析手法として開発された経緯がある。系の開発には、試行錯誤が必要であった。しかしながら、本研究において、プロタイプの開発経緯において、ISMMapper を用いた IS 検索の結果を基に、最も解像度の高い標的部位の決定を行うパイプラインを構築できたことは、この研究での重要な技術的側面である。しかし、プロタイプの開発と検証を行う中で、ISMMapper の予測精度に問題があることが判明し、独自に IShunter (仮称) プログラムを開発した。このプログラムを組み込んで改良した 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、IShunter プログラムは、IS-P システムの開発だけでなく、他の IS 関連研究にも貢献すると期待される。

さらに、PCR-based ORF typing, POT 法の改良とその検証を行った。O157, O121 を除き多様な血清型の EHEC を EHEC-POT 法を用いてタイプ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。

また高精度の菌株識別能力を持つ MLVA 法の適用を拡大するために、解析部位を増やした MLVA43 法を開発し、実用化が実現している。これらの手法の各自治体での実践的な利用のためには、陽性コントロールの配付、研修、適切な内部精度管理手法の提供が必要である。今後、本研究で遂行された実績を利用して、各自治体での利用を促すことを進めて行くことで、迅速な調査・解析が期待される。

#### 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\_O103 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、IS-P\_O103 においても系が確立された。EHEC-POT 法の開発も完了し、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ことが示唆された。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 法と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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) 大西 真、反復配列多型解析 - Multilocus Variable-Number Tandem Repeat 法、食品衛生研究 2019: 69, 7-15.

- (2) 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

- (3) 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

(4)

##### 2. 学会発表

- (1) 松尾真奈、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 : 腸管出血性大腸菌 O121 用 IS printing の開発に向けた O121 に分布する IS の網羅的探索、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 27-29 日、福岡
- (2) 鈴木匡弘、土井洋平、荒川宜親 : ORF 保有パターンによるゲノムの系統解析第 91 回日本細菌学会総会 2018 年 3 月 福岡市
- (3) 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。
- (4) 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
- (5) 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す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。
- (6) 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

- (7) 大岡唯祐、李謙一、桂啓介、伊豫田淳、藺牟田直子、林哲也、大西真、西順一郎：腸管出血性大腸菌O111用IS-printing systemの開発、第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018年11月8-9日、東京
- (8) 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
- (9) 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

- (10) 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

(11)

(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

図1 新規開発 MLVA43 (MLVA17+26) と既存法 MLVA17 との比較

2つの MLVA 法で 0103, 0121, 0145, 0165, 091 株を解析し比較した。解析結果は MST 法で描画した。丸がそれぞれの菌株が示す MLVA 型で、同一の MLVA 型の場合は1つの円が分割して表示した。血清群ごとに色分けされている。異なる MLVA 型との関連は、線の太さと長さで示している

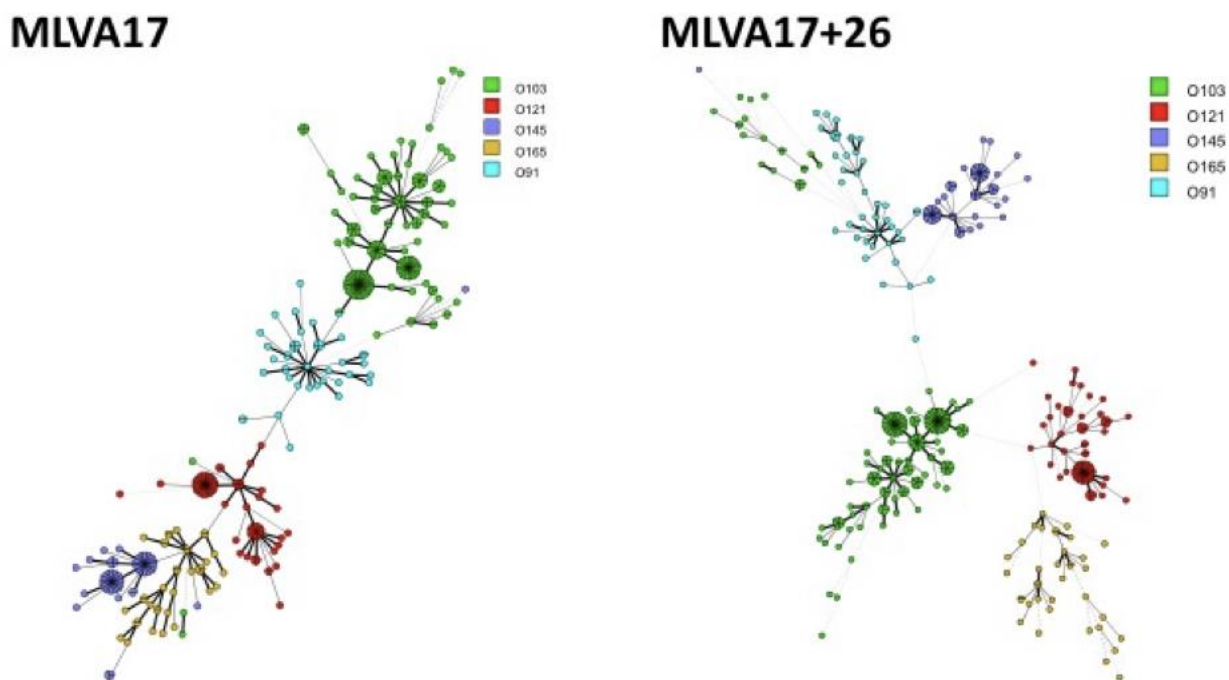


表1 各血清群の MLVA17 および MLVA43 の解像度の比較

	株数	型数		多様性指数	
		MLVA17	MLVA43	MLVA17	MLVA43
0103	159	55	66	0.945	0.959
0121	58	24	34	0.857	0.912
0145	52	14	23	0.787	0.913
0165	37	27	33	0.983	0.994
091	43	33	38	0.982	0.993

## 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

- 【現状】** 事例調査、原因究明には菌株の分子型別による比較解析が必須。疫学情報との連結する方策が必要
- 【目的】** 迅速な分子型別の実施には、キャパシティを勘案して地方（衛生研究所）と国（感染研）とで0群ごとで実施試験項目を整理し、全体として迅速に事例対応を開始するための情報提供を可能とする。
- 【本課題での目標】** 1。迅速な分子型別手法の開発 1)IS-P法の対象の拡大、2) POT法の対象の拡大、2。高精度分子型別手法の開発、3。分子型別法の結果と疫学情報を統合するシステムの開発

### 本研究で開発した手法を基盤にした分子型別手法の利用方法の提案

太字が本課題関連

		O157/O26/O111	O103/O121/O145/O165
国	高解像度法	MLVA (既存法)	<b>MLVA【本研究2-1】 利用開始</b>
地方	高解像度法	MLVA (既存法を一部で実施。 <b>【本研究2-1】で統一化の支援を実施</b> )	MLVA【本研究2-1】の利用を検討する。しかし、少数の菌株の解析では運用コストが高いため要検討
地方	迅速法	IS-P (既存はO157/O26にのみ対応)、POT法	IS-P <b>【本研究1-1】</b> O103, O121, O111を対象とした手法の利用 POT法 <b>【本研究1-2】</b> O121以外での利用

### 本研究の進捗状況

		H29-H31/R1年度 進捗
IS-P O121 法 IS-P O103 法		ともに、系統解析、新規参照株のデータ取得。プライマリーセットの設計、条件検討を実施した。 IS-P O121 法 19の地方衛生研究所に配布し検証。 新たなIS検索プログラムを開発し、解析パイプラインを再構築 IS-P O103 法 IS-P O121法の検証結果に基づいて、同様に新規解析パイプラインで改善を施した。
IS-P O26法 (計画外の追加プロジェクト)		既存法の改善を試行したが、上記の開発を進行させるため断念した。

## 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

【現状】事例調査、原因究明には菌株の分子型別による比較解析が必須。疫学情報との連結する方策が必要

【目的】迅速な分子型別の実施には、キャパシティを勘案して地方(衛生研究所)と国(感染研)とで0群ごとで実施試験項目を整理し、全体として迅速に事例対応を開始するための情報提供を可能とする。

【本課題での目標】1. 迅速な分子型別手法の開発 1) IS-P法の対象の拡大、2) POT法の対象の拡大、2. 高精度分子型別手法の開発、3. 分子型別法の結果と疫学情報を統合するシステムの開発

本研究で開発した手法を基盤にした分子型別手法の利用方法の提案

太字が本課題関連

		O157/O26/O111	O103/O121/O145/O165
国	高解像度法	MLVA (既存法)	<b>MLVA【本研究2-1】</b> 利用開始
地方	高解像度法	MLVA (既存法を一部で実施。 <b>【本研究2-1】</b> で統一化の支援を実施)	MLVA【本研究2-1】の利用を検討する。しかし、少数の菌株の解析では運用コストが高いため要検討
地方	迅速法	IS-P (既存はO157/O26にのみ対応)、POT法	IS-P <b>【本研究1-1】</b> O103, O121, O111を対象とした手法の利用 POT法 <b>【本研究1-2】</b> O121以外での利用

本研究の進捗状況

		H29-H31/R1年度 進捗
IS-P O121 法		ともに、系統解析、新規参照株のデータ取得。プライマーセットの設計、条件検討を実施した。 IS-P O121法 19の地方衛生研究所に配布し検証。 新たなIS検索プログラムを開発し、解析パイプラインを再構築 IS-P O103法 IS-P O121法の検証結果に基づいて、同様に新規解析パイプラインで改善を施した。
IS-P O103法		
IS-P O26法 (計画外の追加プロジェクト)		



## 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

**【現状】** 事例調査、原因究明には菌株の分子型別による比較解析が必須。疫学情報との連結する方策が必要

**【目的】** 迅速な分子型別の実施には、キャパシティを勘案して地方(衛生研究所)と国(感染症)とで0群ごとで実施試験項目を整理し、全体として迅速に事例対応を開始するための情報提供を可能とする。

**【本課題での目標】** 1. 迅速な分子型別手法の開発 1) IS-P法の対象の拡大、2) POT法の対象の拡大、2. 高精度分子型別手法の開発、3. 分子型別法の結果と疫学情報を統合するシステムの開発

本研究で開発した手法を基盤にした分子型別手法の利用方法の提案

太字が本課題関連

	O157/O26/O111	O103/O121/O145/O165
国	MLVA (既存法)	<b>MLVA【本研究2-1】</b> 利用開始
地方	MLVA (既存法を一部で実施。 <b>【本研究2-1】</b> で統一化の支援を実施)	MLVA【本研究2-1】の利用を検討する。しかし、少数の菌株の解析では運用コストが高いため要検討
地方	IS-P (既存はO157/O26にのみ対応)、POT法	IS-P <b>【本研究1-1】</b> O103, O121, O111を対象とした手法の利用 POT法 <b>【本研究1-2】</b> O121以外での利用

### 本研究の進捗状況

	H29-H31/R1年度 進捗
IS-P O121 法 IS-P O103法	ともに、系統解析、新規参照株のデータ取得。プライマーセットの設計、条件検討を実施した。 IS-P O121法 19の地方衛生研究所に配布し検証。 新たなIS検索プログラムを開発し、解析パイプラインを再構築 IS-P O103法 IS-P O121法の検証結果に基づいて、同様に新規解析パイプラインで改善を施した。
IS-P O26法 (計画外の追加プロジェクト)	既存法の改善を試行したが、上記の開発を進行させるため断念した。