

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
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
（H29-食品-一般-001）

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

平成 30 年（2018 年） 3 月

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
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班
平成 29 年度 総括・研究分担報告書

目次

I. 平成 29 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 1

II. 平成 29 年度分担研究報告書

1. EHEC 0103, 0121 に対する IS-P 法の開発に関する研究
研究分担者 林 哲也 九州大学・大学院医学研究院 5

2. 腸管出血性大腸菌 0111 に対する IS-printing 法の開発に関する研究
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 8

3. EHEC-POT 法の開発
研究分担者 鈴木 匡弘
藤田保健衛生大学医学部微生物学講座 12

4. 食品媒介感染症・食中毒の疫学調査手法の整備に関する研究
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 . . . 14

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 18

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）
平成 29 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 （藤田保健衛生大学医学部微生物学講座・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。O121 に関しては、参照ゲノムの解析から IS600 と IS629 を主要な IS として同定し、この 2 つを標的候補として決定した。さらに、ISMMapper を用いた本研究で取得した 83 株のゲノム情報を利用し、IS600 と IS629 を標的とする IS-P 法の有用性が示唆された。O103 に関しては、国内分離株 73 株のゲノム情報を取得し、30 株のゲノム情報を追加取得中である。参照ゲノムの解析では、IS629 が主要な IS であることが判明し、O103 ではこれを標的 IS とすることに決定した。O111 用の IS-P として、計 600 株の O111 株のドラフトゲノム情報を基に、O111 株間における IS629 挿入部位の多様性を検証し、利用可能であることを見出した。O111 IS-printing 法のプロトタイプを作成し、PCR 条件の至適化を検討した。

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) 法改良の検討も行った。データベースからダウンロードしたゲノムデータを比較、検討し、菌株識別に有効と期待された 35 個の ORF について O157 以外の 6 血清型の分離株を用いた調査を行った。6 個の ORF が既存の EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与することが判明した。

IS-P および POT 法よりも高精度な手法である、MLVA 法の改善も試みた。既存の MLVA 法の対象は EHEC O157, O26, O111 に限定されているが、新規に解析遺伝子座を 26 箇所選定し既存法 (MLVA17 法) に追加することで (MLVA43 法)、O103, O121, O145 も解析可能となった。MLVA43 法では加えて O165, O91 についても解析可能であることが示唆された。NESID データと MLVA データを突合せさせるプログラムの作成と評価、改善案の検討を行った。また、より迅速な集団発生・広域散发事例の探知を目的として、過去データから算出したベースラインとの比較により、特異な患者報告数の増加を機械的に探知するシステムの開発も試みた。2017 年のデータについて遡りて調べたところ、年間のアラート発出件数は 30 件であった。アラート検知のアルゴリズムを感度、特異度、即時性の観点から検証し、改良を検討することが今後の課題である。

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 (0111, 0103, 0121)、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、0103, 0121, 0145 解析用システムを H29 年度に開発し、H30 年度は試行、H31 年度には実用化する。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

分担研究の研究方法の詳細は各分担報告書に詳述されている。

MLVA 法の対象を広げるための新規プライマーセットの作成について示した。

(1) 新規解析遺伝子座の選定

Illumina シークエンサーを用いて 0103 28 株, 0121 22 株, 0145 7 株, 0165 4 株, 026 97 株, 0111 293 株, 0157 1 株のゲノム DNA 配列を取得し、そのアッセンブルデータを基に、リピート配列部位を検索した。

候補遺伝子座に対して PCR 法で増幅反応を確認し、またリピート数の多様性を基に 26 種類の解析遺伝子座を決定した。既存の 17 遺伝子座を解析対象とした MLVA 法 (MLVA17) に新規の遺伝子座を加えた MLVA43 とした。

(2) 新規解析遺伝子座を用いた MLVA 法の検証

0103 159 株, 0121 58 株, 0145 52 株, 0165 37 株, 091 43 株を MLVA43 で解析し、同一株を MLVA17 で解析した結果と比較した。

C. 研究結果

(1) EHEC 0103, 0121, 0145 解析用システムの開発

EHEC 0157, 026, 0111 用に用いている 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 法を比較した結果を図 1 に示した。MLVA17 の解析結果と比較して、異なる血清群間の MST 上での距離が離れており、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。

(2) 2017 年分離株を用いた EHEC 0103, 0121, 0145 MLVA 法の検証

2017 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 2503 株 (2017 年 11 月 22 日現在) のうち、0103, 0121, 0145 が 239 株存在した (0103 株 = 132 株, 0121 株 = 67 株, 0145 株 = 40 株)。本研究で開発した MLVA 法により、それぞれ 43 種 (0103), 29 種 (0121), 16 種 (0145) の MLVA 型に分類された。多様性指数は 0.893 (0103), 0.940 (0121), 0.816 (0145) となった。

林による分担研究では 0121 および 0103 解析用の IS-P の開発が進められた。0121 解析用の IS-P の開発に関連して、83 株のゲノム配列の取得、参照ゲノムを用いた IS の分布解析がなされた。その結果、IS600 および IS629 を標的候補とされた。また、ISMMapper を用いたゲノム情報を用いた IS-P の型別能の検討が行われ、同時に ISMapper の有用性の検討もなされた。0103 解析用の IS-P の開発では、73 株のゲノム情報をえて、現在 30 株の追加解析がなされている。また参照ゲノムの解析が進められ、IS629 を標的とすることが有効であることが示唆された。

大岡による分担研究では 0111 解析用の IS-P の開発として、

- 1) EHEC O111 の IS629 挿入部位の網羅的抽出
- 2) EHEC O111 の IS629 挿入推定部位の詳細な配列解析
- 3) EHEC O111 IS-P 法プロトタイプの前製が行われた。

砂川による分担研究では、

- 1) NESID データと MLVA データの連携
- 2) NESID データを用いた集団発生・広域散発事例の早期探知
- 3) 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が行われた。

D. 考察

IS-P 法に関しては、EHEC 0103, 0121 および 0111

に関しては解析対象とするISの選定がなされた。また、型別能の評価(O121)、プロトタイプを試行(O111)が行われた。ISMapperを用いた *in silico* の解析も有効であることが示され、O103の解析にも応用可能である。

IS-P法対象血清群の拡大により、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EHEC O111, EHEC O103とEHEC O121による食中毒調査の迅速化、高度化、効率化が可能となる。本研究では同時にMLVA法の対象拡大でEHEC O103, O121を含めて、これまでより広範囲なO血清群の分子型別が可能となった。しかしながら、地方衛生研究所で実施することは、解析対象遺伝子座が増加したことで現実的には困難であると想像される。そのため、スクリーニング法(IS-P法およびPOT法)の迅速、簡便な手法の開発の意義は大きい。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もつながる。さらに、本分担研究の成果や開発戦略は、他のEHECや他の腸管病原菌の対策や効率的調査法の開発にも応用できる可能性が高く、食品安全性確保の推進という観点からも大きな波及効果が期待される

同時に、発生動向調査を病原体情報と組み合わせるツールを開発も重要である。可能な限り機械的に(自動的)に集団発生・広域散发事例の早期探知のためのアラート発出のツール・システムの開発を進めることが重要である。

E. 結論

分子型別法の開発が3つの手法においてほぼ計画通り進められた。また、発生動向調査に基づいたアラート発出および調査を支援するNESIDデータとMLVAデータの連携の2点についてシステ

ム・ツール開発のプロトタイプが開発が進んだ。

【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

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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の網羅的検索、第91回日本細菌学会総会、2018年 3月27-29日、福岡

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

(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

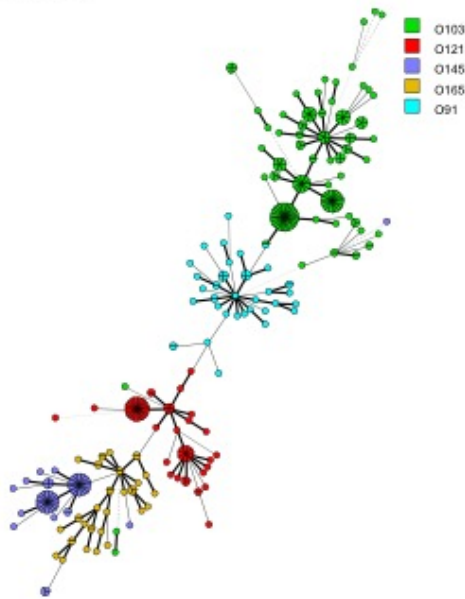
3. その他 なし

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

170615 add5

MLVA17



MLVA17+26

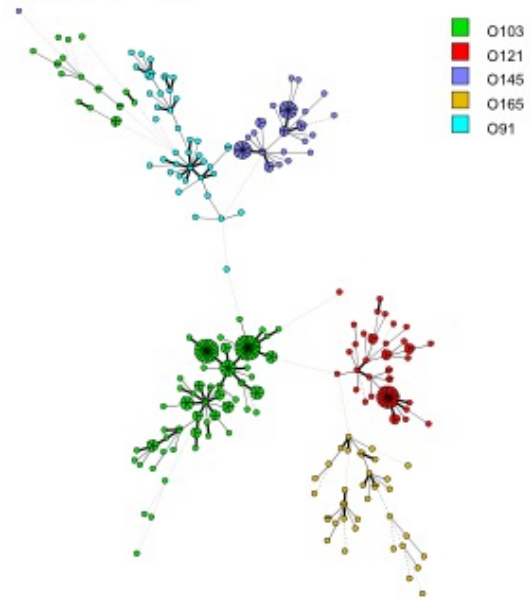


表1 各血清群ごとの MLVA17 および MLVA43 の解像度の比較

	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

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）
平成 29 年度 分担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
分担課題 EHEC O103, O121 に対する IS-P 法の開発に関する研究

研究分担者 林 哲也（九州大学・大学院医学研究院・教授）

研究要旨

IS-printing (IS-P)法は、我々がゲノム情報を利用して独自に開発した迅速かつ簡便な菌株識別手法である。本法は、極めて迅速に施設間等での比較も容易なデータが得られるため、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。本研究では、O121 用および O103 用の IS-P 法 (IS-P_O121 と IS-P_O103) を開発する。O121 に関しては、本年度は 2011～2016 年に分離された 83 株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析を行い、新規の O121 亜系統を同定するとともに、メジャー系統に属する 79 株には地理的にも遺伝系統的にも偏りが無いことが確認した。また、参照ゲノムの解析から IS600 と IS629 を主要な IS として同定し、この 2 つを標的候補として決定した。さらに、ISMMapper を用いた 83 株の解析により、IS600 と IS629 の分布状況によって 83 株を、それぞれ 65 パターンと 74 パターンに型別でき、両方の IS を用いると 79 パターンに型別できた。この結果は、2 つの IS を標的とする IS-P 法の有用性を示唆する。O103 に関しては、2007～2017 年の国内分離株 73 株のゲノム情報を取得し、30 株のゲノム情報を追加取得中である。参照ゲノムの解析では、IS629 が主要な IS であることが判明し、O103 ではこれを標的 IS とすることに決定した。O103 の高精度系統解析や ISMapper を用いた解析は、30 株のゲノム情報を追加取得後に実施する予定である。

A. 研究目的

EHEC 感染症の事例調査のために各種の分子型別法が開発され、現在は目的に応じて複数の方法が組み合わせて使われている。IS-printing (IS-P)法は、我々がゲノム情報を利用して独自に開発した迅速かつ簡便な菌株識別手法である。本法は、解像度は低いものの極めて迅速に施設間等での比較も容易なデータが得られるため、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。また、多検体処理が容易な高解像度解析法 (MLVA 法) との組み合わせによって、より強力な分子型別が可能となっている。しかし、現時点では、IS-P 法は O157 と O26 のみに適用可能であり、対象を拡大することが望まれる。本分担研究では、これまでの IS-P 法開発の経験を活かして、O121 用および O103 用の IS-P 法 (以下、IS-P_O121 と IS-P_O103) を開発する。

B. 研究方法

1. 本研究開始時点では、O121 のゲノム情報は我々と国立感染症研究所の共同研究によって蓄積出来ていたが (76 株)、O103 のゲノム情報は蓄積できていなかった。解析の基準となる株の完全

長配列 (参照ゲノム) に関しては、O103 については 2009 年に我々が決定しており、O121 についても未発表ではあるが既に我々が決定している。そこで、国立感染症研究所が収集した EHEC 分離株の中から 100 株の O103 を選択し、ゲノム情報の取得を行った。O121 についても、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使うべきであると判断し、近年分離された 85 株のゲノム情報を新たに取得した。ゲノム情報の取得にはイルミナシーケンサーと Platanus アッセムブラーを用いた。クオリティの検定は、scaffold の総長 (>5 Mb) と CheckM 解析によるコンプリートネス値 (>95%) に基づいて行った。

2. IS-P 標的候補の検索等を行う前段階として、菌株の偏り (特定の亜系統への集中など) の有無を検討した。具体的には、各株において全ゲノムレベルで SNP を同定し (SNP 同定法の詳細については割愛)、これを基に RAxML を用いて最尤法による高精度系統解析を行った。

3. IS-P 標的候補の検索を行うため、両血清型の参照ゲノムに含まれる IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を、ISFinder による検索とその検索結

果の個別解析により正確に決定した。また、上記で取得したゲノム情報と ISMapper を使って、主要 IS の各菌株での分布を解析するとともに、参照ゲノムには存在しない IS 挿入部位を検索した。

(倫理面への配慮)

本分担研究では、分離菌株とそのゲノム情報のみを扱うため、特別な倫理面での配慮は必要としない。

C. 研究結果

1. O121 の解析

(1) 国立感染症研究所から、2011~2016 年に分離された 85 株の分与を受け、ゲノム配列を取得した。O121 51104 株(西田、他：未発表)を参照ゲノムとして同定した全ゲノム SNP を用いて、これらの菌株(配列精度に問題のあった 2 株を除く 83 株)の高精度系統解析を行った結果、83 株は大きく 2 つの系統に分かれることが判明した。メジャー系統には 79 株が含まれ、その中では地理的にも遺伝系統的にも明らかな偏りがないことを確認した。マイナー系統に属する 4 株の分離地域にも偏りはなかった。

(2) 参照ゲノムの解析から、21 種類(111 コピー)の IS を同定し、IS600 と IS629 が主要な IS であることが判明した(28 コピーと 21 コピー)。このうち、プロファージとプロファージ様 Integrative element 及びプラスミドに挿入されているものは、それぞれ 24 コピーと 15 コピーであった。また、今回同定した 21 種類の IS のうち 4 種類 (ISO121-1~ISO121-4) は、既知の IS と 95%以下の相同性を示すため、新規の IS であると考えられた。以上の解析から、O121 では IS600 と IS629 がメインの IS であるため、両者を標的候補として以下の解析を行うこととした。

(3) ISMapper を用いた参照ゲノムの解析 (ISMapper の有用性の検証) では、参照ゲノム上に存在する 28 コピーの IS600 のうち、7 コピーは近傍に繰り返し配列等が存在するに検出できなかったが、21 コピーは ISMapper で検出でき、十分な精度があることが確認できた。さらに、ISMapper を用いた 83 株の検索により、IS600 の分布状況によって 83 株を 65 パターンに型別でき、参照配列上に存在しない 6 コピーの IS600 も同定できた。

IS629 に関する同様の解析では、参照ゲノム上に存在する 21 コピーの IS629 のうち 18 コピーが ISMapper で検出でき、IS629 の分布状況によって 83 株を 74 パターンに型別できた。また、参照配列上に存在しない 5 コピーが同定で

きた。

さらに、IS600 と IS629 の分布状況を合わせて用いると、83 株が 79 パターンに分類された。

2. O103 の解析

(1) 73 株(2007~2017 年の国内分離株、2014 年以降が中心)のゲノム情報を取得した。残り 30 株のゲノム情報は現在取得中である。全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析は、そのゲノム情報取得後に実施する予定である。

(2) 参照ゲノム (O103 12009 株) の解析では、27 種類 (93 コピー) の IS を同定し、IS629 が主要な IS であることが判明した (31 コピー)。このうち、プラスミドに挿入されているものは、それぞれ 9 コピーであった。また、今回同定した 27 種類の IS のうち 2 種類 (ISO103-1 と ISO103-2) は、新規の IS であると考えられる。この結果から、O103 では IS629 を標的 IS とすることに決定した。

(3) ISMapper を用いた解析は、(1) の精度系統解析と同様に、30 株のゲノム情報を追加取得した後に実施する予定である。

D. 考察

O121 のゲノム情報の取得に関しては、先行研究で取得済みの国内分離株の分離年が古く、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使うべきであると判断し、当初予定を変更し、2011~2016 年の分離株 85 株のゲノム情報を取得した。O103 に関しては、予定した 100 株のうち、73 株の情報は取得できたが、残り 30 株分については現在取得中である。

両血清型の参照株における IS の詳細な解析から、O121 では IS600 と IS629 が、O103 では IS629 が主要な IS であることが判明した(この解析で、新規 IS を同定したことは、本来の研究目的とは異なるが細菌学的には重要な研究成果である)。この結果から、O103 では IS629 を標的として決定して良いと考えられたが、O121 については IS600 と IS629 の両方を標的とする方向で検討すべきと考えられる。実際に、ISMapper を用いた *in silico* の解析では、IS600 のみでも 83 株が 65 パターンに、IS629 のみでも 74 パターンに型別できたが、両方を用いると 79 パターンに分類された。

ISMapper を用いた IS の検出に関しては、O121 の解析では、プロファージなどの上存在する IS などについては問題があるものの、参照株をモデルとした予備的な解析でも、83 株の解析でも、染色体バックボーン上の IS に関しては問題なく検出できた。また、参照配列上に存在しないコピーも同定できた。今回開発する IS-P 法では、

できる限り染色体バックボーン上の IS をターゲットとすることを考えているため、ISMMapper による IS 検索法は、今後実施する O103 の解析にも有効であると思われる。

83 株の O121 の高精度系統解析で、メジャー系統とは異なる系統が見出されたことは、予想外の発見である。このマイナー系統に属する 4 株は、ISMMapper による検索でも、IS600 と IS629 は検出できず、メジャー系統との遺伝的距離も、O157:H7 と O55:H7 との距離とほぼ同じレベルであることから、メジャー系統とは系統的に大きく離れた O121 亜系統であると考えられる。これら 4 株にも志賀毒素遺伝子やその他の EHEC 病原遺伝子が存在することは確認している。従って、この系統は IS600 と IS629 を用いた IS-P 法の適応外となるが、有症患者から分離されていることから、今後の分離動向については注意が必要である。

今後の計画としては、O103 の追加ゲノム情報の取得と系統解析や ISMapper による解析を進め、さらに両血清型において ISMapper を使った解析で同定された多数の IS コピー（挿入部位の異なるコピー）の中から、実際の IS-P 法で PCR 標的とするコピーを決定することになるが、in silico の解析から得られる各コピーの分布頻度は、極めて有用な基礎情報となる。

生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い EHEC 食中毒では、集団感染事例を迅速かつ正確に特定し、原因や感染経路を特定することが重要である。しかし、原因や感染経路等が判明しないケースも多数存在する。本研究で IS-P_O103 や IS-P_O121 が開発できれば、これと疫学情報との効果的な統合を可能とする仕組みを構築することによって、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 EHEC O103 と EHEC O121 による食中毒調査の迅速化、高度化、効率化が可能となる。また、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もつながる。さらに、本分担研究の成果や開発戦略は、他の EHEC や他の腸管病原菌の対策や効率的調査法の開発にも応用できる可能性が高く、食品安全性確保の推進という観点からも大きな波及効果が期待される。

E. 結論

O121 に関しては、2011～2016 年に分離された 83 株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析を行った結果、これまでに報告のない新規の O121 亜系統を同定するとともに、メジャー系統に属する 79 株には地理的にも遺伝系統的にも明らかな偏りがないことが確認できた。また、参照ゲノムの解析から、IS600 と IS629 が主要な IS であり、この 2 つが標的候補になることが判明した。さらに、ISMMapper を用いた解析により、IS600 の分布状況によって 83 株を 65 パターンに型別でき、参照配列上に存在しない 6 コピーが同定できた。IS629 に関する同様の解析でも、83 株を 74 パターンに型別でき、参照配列上に存在しない 5 コピーが同定できた。さらに、両方の IS を用いると、83 株が 79 パターンに分類され、この両 IS を標的とする IS-P 法の有用性が示唆された。O103 に関しては、2007～2017 年の国内分離株 73 株のゲノム情報を取得し、30 株のゲノム情報を追加取得中である。参照ゲノムの解析では、IS629 が主要な IS であることが判明し、O103 ではこれを標的 IS とすることに決定した。高精度系統解析や ISMapper を用いた解析は、30 株のゲノム情報を追加取得した後に実施する予定である。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

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 の網羅的検索、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 27-29 日、福岡

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

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）
平成 29 年度 分担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
分担課題 腸管出血性大腸菌 O111 に対する IS-printing 法の開発に関する研究

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）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は溶血性尿毒症症候群や脳症など生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い感染症であり、食中毒調査において様々な集団感染事例を特定し、その原因を明確にすることが重要である。しかしながら、これまで様々な行政対応がなされてきたものの、EHEC 感染症の報告数は毎年 3,500-4,000 例と依然として多数にのぼり、血清型も O157 が中心となるが、O26, O103, O111 などの報告数も多く、原因や感染経路等が判明しないケースが多数残されている。我々はこれまでに EHEC O157 株間での挿入配列 IS629 の多様性を利用し、簡便迅速菌株識別システムとして、検査現場での利用も可能な O157 IS-printing 法を開発してきた。本研究では、そのシステムを応用して、EHEC O111 について IS-printing 法を開発することを目指した。本年度は、計 600 株の O111 株のドラフトゲノム情報を基に、O111 株間における IS629 挿入部位の多様性を検証し、菌株識別解像度の高い挿入部位の同定を行った。その結果、菌株識別に利用可能と考えられる IS 挿入部位が、約 70 カ所（全ゲノム配列が決定された参照株 11128 株で既に同定されている 30 カ所を含む）同定された。また、IS 挿入部位周辺の配列が確認されている参照株 11128 株の IS629 挿入部位を標的として、O111 IS-printing 法のプロトタイプを作成し、PCR 条件の至適化を検討した。

A. 研究目的

生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い EHEC による食中毒調査において、様々な集団感染事例を特定し、その原因を明確にすることで、様々な衛生規範、基準の作成、改訂につながってきた。しかしながら、EHEC 感染症の報告数は 3,500-4,000 例と依然として多数にのぼり、血清型も O157 が中心となるものの、O26, O103, O111 などの報告数も多く、原因や感染経路等が判明しないケースが多数残されている。EHEC 感染症の事例調査のために、これまで各種分子型別法が開発され、複数の方法を組み合わせて目的に応じて使い分けているが、中でも、解像度は低いものの極めて迅速に比較的容易なデータが得られるスクリーニング法である IS-printing 法 (IS-P 法) と多検体処理が容易な高解像度解析法である MLVA 法との組み合わせが最も効果的とされている。しかしながら、IS-P 法は O157 と O26 のみに適用可能であり、分離頻度の比較的高い O111 や O103 についてはまだ存在しない。本研究では、O111 について、菌株識別解像度の高い IS-P 法を開発し、臨床検査の現場で安定した結果が得られるように反応系の最適化を行う

ことを最終目標とする。

B. 研究方法

平成 27-29 年度 感染症実用化研究事業「ゲノム解析に資する下痢原性細菌感染症サーベイランスの強化及びゲノム解析を利用した迅速診断法の開発に向けた研究（感染研・伊豫田淳代表）」で取得された O111 約 600 株のドラフトゲノム情報（イルミナ MiSeq データ）を利用し、以下の流れで行った。

- 1) 全ゲノム系統樹を用いた株の選定
600 株のドラフトゲノム配列を用いて進化系統樹を作成した。その中から、系統の離れた 200 株を選定した。
- 2) MiSeq データからの IS629 配列の網羅的抽出
解析対象株 200 株の MiSeq リード配列に対して、挿入配列 IS629 を含むリードを blastn により検索した。そのうち、MiSeq ペアリードの一方のみ挿入配列 IS629 を含むリードを選別し、対となるリード配列を網羅的に抽出した。
- 3) 200 株における IS629 挿入部位の推定

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム配列を参照配列とした。項目 2) で抽出した MiSeq リード配列を Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA)を用いてマッピングし、各株における IS629 の挿入部位を推定した (図 1)。

4) 推定された IS629 挿入部位の詳細な配列解析
項目 4) で推定された IS629 挿入部位について、O111 IS-P 法の標的としての有用性を検討するため、推定挿入部位の前後 1 kbp 付近の配列を得られるように外部プライマーを設計し、IS 内部プライマーとの PCR およびシーケンシングを実施した。解析は国立感染症研より精製 DNA の提供を受けた 200 株を対象に行った。

5) O111:H- 11128 株の IS629 挿入部位 (30 カ所) を標的とした O111 IS-P 法プロトタイプを作成

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株に関しては、IS629 挿入部位約 30 カ所が既に同定されている。この株の IS 挿入部位を標的とし、O111 IS-P 法のプロトタイプを作成した。まず、IS629 の内部に共通な外向きの IS 内部プライマーを設計し、次に、各 IS 挿入部位の近傍領域に IS 内部プライマーと対をなす外側プライマーを設計した。その際、プライマー間の距離は 100 bp から 1 kbp の範囲内で、さらに標的ごとに PCR 増幅サイズが異なるように設計した (図 2)。プライマーの増幅効率の確認には、11128 株の精製ゲノム DNA を鋳型として用い、PCR 酵素には KOD Multi&EPI (東洋紡) を使用した。PCR 増幅産物のバンド解像度の確認には、2% のアガロースゲルを用いた。

(倫理面への配慮)
該当しない。

C. 研究結果

1) IS629 挿入部位の網羅的抽出

O111 株 200 株の MiSeq リードを参照株へのマッピングした結果、IS629 が挿入されていると推定され、菌株識別解像度の向上に有効と考えられる領域を約 70 カ所同定した。この中には、参照株に存在する部位含まれており、新規 IS629 挿入部位としては約 40 カ所同定されたことになる。

2) IS629 挿入推定部位の詳細な配列解析

項目 1) で同定された挿入部位について、参

照株の該当領域にプライマーを設計し、200 株を対象とした PCR および配列決定を実施した。現在までに 10 カ所の標的部位についてプライマー設計と PCR が完了しており、当該領域の配列取得作業を進めている段階にある (現在も解析を継続中)。

3) O111 IS-P 法プロトタイプの作製

図 2 に示すように 11128 株ゲノム上に存在する IS 挿入部位 30 カ所を標的に F/R プライマーセットの設計を試みた。そのうちの 5 カ所については、IS 挿入部位前後 1 kbp の配列がゲノム上に複数存在することから、非特異増幅を避ける目的で PCR の標的から除外した。また、2 カ所の挿入部位に関しては F 領域が上記と同様の理由で標的から除外された。最終的に F セット、R セットはそれぞれ 25 領域、27 領域を標的とし、それぞれを 3 組 (1st-, 2nd-, 3rd-F primer set, 1st-, 2nd-, 3rd-R primer set) に分けて計 6 PCR で判定出来る反応系とした。プライマー長は 19-21 bp、Tm 値は 58~62°C になるよう設計した。PCR 条件の最適化の判定には、11128 株の精製ゲノム DNA を鋳型として使用し、PCR 酵素には KOD-Multi&Epi (東洋紡ライフサイエンス) を使用した。詳細な PCR と電気泳動条件、PCR 増幅産物の泳動結果を図 3 に示した。PCR 増幅効率、電気泳動でのバンドパターンの識別には問題がないことを確認した。

D. 考察

本年度の解析により、O111 株 200 株のドラフトゲノム配列情報を用いて、200 株のゲノム上の IS629 挿入部位を多数推定することが出来た。現在、IS-P 法の標的として利用可能かどうかを検証するため、挿入部位周辺の配列決定を行い、株間での配列保存性や菌株識別解像度の検討を試みている。

全ゲノム配列決定株 11128 株の IS 挿入部位 30 カ所を標的としてプライマーを設計した IS-P 法プロトタイプに関しては、現在 27 カ所を標的として 3 組 (各 F, R) のプライマーセットを作成しており、PCR 条件については、今回実施した手法である程度の最適化が出来たと考えられるが、PCR 増幅効率をより改善するための検討も必要と思われる。今後、新たに同定された約 40 カ所の情報を加えて、さらに標的部位を厳選する必要がある。来年度は、得られた IS 挿入部位周辺の配列情報を精査し、より解像度の高いプライマーセットを作成して、最終的には 1 組の F, R セットとしての完成を目標として進める。

また、600株の系統解析の結果と比較し、分離頻度の高い系統に関して菌株識別解像能が得られていない場合には、その系統の株を複数株新たに選定し、ドラフトゲノム配列情報を用いた追加解析を行って、標的部位を抽出することも想定しておく必要がある。

E. 結論

系統の異なるO111分離株200株のドラフトゲノム配列を用いた参照株11128株へのマッピング解析により、IS-P法の標的となるIS629挿入部位を約70カ所(参照株におけるIS挿入部位30カ所を含む)同定することができた。また、11128株のIS挿入部位約30カ所を標的とし、IS-P法のプロトタイプとなるプライマーセットを構築した。実際の検査現場で菌株コロニーから粗精製したDNAを用いて安定した結果が得られるようにするためには、まだ検討の余地があるものの、PCR反応条件ならびに泳動条件の至適化もある程度完了した。マッピング解析により、200株のゲノム上に11128株のIS挿入部位と同じ挿入部位が多数検出されていることから、プロトタイプにおいてもある程度の菌株識別解像度が得られると思われる。次年度以降、本研究で同定した200株で新たに同定されたIS挿入部位を精査し、IS-P法の標的としてプロトタイプで作成した標的と入れ替えることにより、より菌株識別解像能の高い挿

入部位を標的としたプライマーセットに更新することが期待される。最終的には、当初の解析対象株600株についてのIS-P結果を蓄積し、検査現場で利用可能なO111 IS-P法を完成する。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

【PCR反応液】 [15 µl scale]

Template DNA	1
Primer outside mix (4.5µM each)	1
Primer IS629Inside (25pM)	1
2x PCR buffer	7.5
D.W.	4.2
KOD-Multi-&EPI	0.3
Total	15

* primer final conc.: 0.3µM

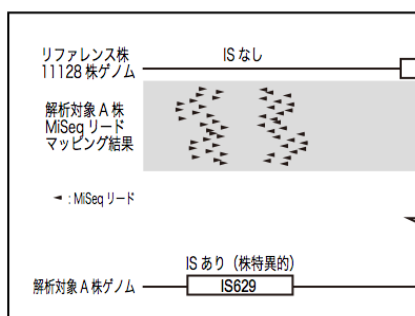
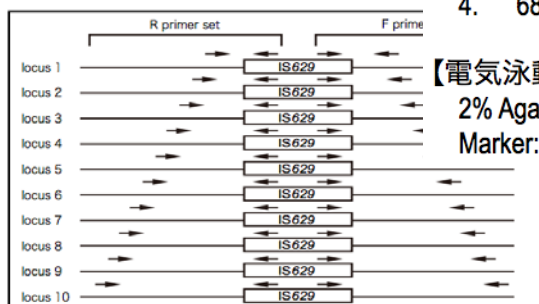


図1 マッピングによるIS629挿入があるかどうかを推定

【PCRプログラム】3 step

1. 94°C 2 min
2. 98°C 10 sec step 2-4: 25 cycles
3. 58°C 30 sec
4. 68°C 1 min

マッピングの結果から、解析対象株にIS

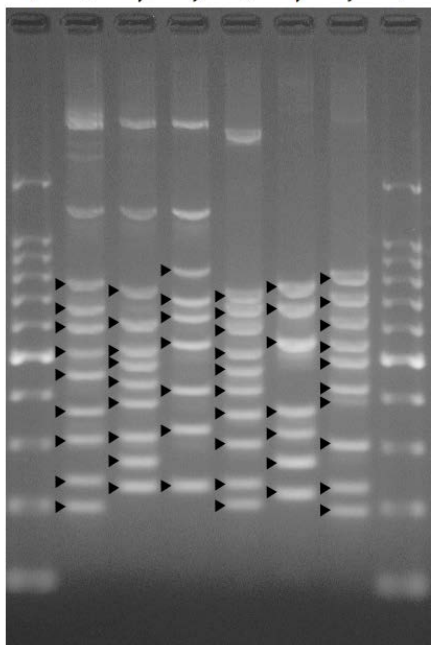


【電気泳動】

2% Agarose S in 0.5 x TBE
Marker: 100 bp ladder

図2 O111 IS-P法の模式図. IS内部に外側へ向けて設計したIS内部プライマーと対になるように外側プライマーを設計することで、ISの前後にFセット、Rセットを設計する。

100 bp ladder
1st_R set
2nd_R set
3rd_R set
1st_F set
2nd_F set
3rd_R set
100 bp ladder



▶: 陽性バンド
(F set 計 27 本, R set 計 25 本)

図3 O111 IS-P法プロトタイプに至適条件およびPCR産物泳動結果. 至適条件でPCRを行った結果、参照株11128株DNAを用いた場合、Fセット(計27本)、Rセット(計25本)がバンドはほぼ均一に検出されており、PCR増幅サイズの識別も可能である。

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）
平成 29 年度 分担研究報告書

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
分担課題 EHEC-POT 法の開発

研究分担者 鈴木 匡弘 （藤田保健衛生大学医学部微生物学講座・准教授）
研究協力者 山田 和弘 （愛知県衛生研究所・主任）

研究要旨

近年増加している 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。データベースからダウンロードしたゲノムデータを比較、検討し、菌株識別に有効と期待された 35 個の ORF について 0157 以外の 6 血清型の分離株を用いた調査を行った。6 個の ORF が既存の EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与することが判明した。さらに有効な ORF の検索を進めることで、多くの EHEC 血清型株を汎用的にタイピングできる POT 法の開発が可能であると期待される。

A. 研究目的

EHEC 感染症の原因菌として以前は 0157 が最も多く 026 と 0111 を加えた 3 血清型が大半を占めていたが、近年は上記 3 血清型に加え、0103 や 0121 等多様な血清型が検出されるようになった。さらに EHEC による diffuse outbreak も毎年のように報告され、全国で検出される EHEC の分子疫学情報を迅速に把握する手段を講じることが急務である。短時間かつ容易に実施可能で、遺伝子型の共有が容易である分子疫学解析法として 0157 については IS-printing system が市販され、全国の地方衛生研究所に普及している。しかし、0157 以外の血清型については簡易なタイピング方法は利用されておらず、その開発・普及が望まれる。

一方、愛知県衛生研究所では、マルチプレックス PCR による簡易な分子疫学解析法として PCR based ORF typing (POT) 法を開発し、大腸菌も含め 4 菌種について市販され、医療現場における感染管理に利用されている。POT 法では菌株毎の保有状態が異なる ORF の検出パターンを遺伝子型とするが、市販されている大腸菌用 POT 法は主に ST131 の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌をターゲットとしている。そのため、EHEC をタイピングした場合、菌株識別能力が低く、実用的ではない。EHEC をターゲットとした POT 法のセットも開発されているが、菌株識別能力は不十分で全国調査に利用できるレベルには達していない。そこで、本研究では新たな検

出 ORF を追加することで EHEC 用 POT 法の菌株識別能力を向上させ、実用的な分子疫学解析法に改良することを目的とする。

B. 研究方法

In silico による ORF の探索

ゲノムデータとしてインターネットデータベース上の EHEC 026、091、0103、0111、0121、0145 の全ゲノム情報（ドラフト配列を含む）を使用した。ゲノムデータはアノテーション情報あるいは prodigal による ORF 予測結果に基づき ORF 単位に分割した。ORF 塩基配列を比較し、ユニークな ORF のセットを作成し、さらに各ゲノムにおける前述の ORF の有無を検索し、1, 0 に置き換えることで、ゲノムデータを二値化した。二値化したゲノムデータを比較し、各血清型の EHEC 株を特徴付ける ORF の探索を行った。

分離株を用いた ORF 保有状態調査

In silico で予測された検出 ORF 候補の中からプライマー設計が可能であった 35 個の ORF について、愛知県衛生研究所で保存されている EHEC を用いて、ORF 保有状態を調査した。用いた株は 026 25 株、0103 8 株、0111 7 株、0121 3 株、0145 3 株、0165 2 株である。

（倫理面への配慮）

本研究は公開データおよび患者データが切り

離された分離菌株のみを扱うため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

検討した全ての血清型で汎用的に菌株識別できると予測された ORF は見つからなかったが、2-4 血清型で菌株識別に利用可能と予測される ORF が 40 個見つかった。この 40 個の ORF の保有パターンによって、in silico においては検討で用いたゲノムデータ株の多くが識別可能であった。40 個の ORF のうち、プライマー設計が可能であった 35 個についてプライマーを作成した。

分離株による 35 個の ORF の保有状態調査の結果、35 個すべては菌株により保有状態は異なっていたが、EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与したのは 6 個のみであった。この 6 個を従来の EHEC 用 POT 法と組み合わせると、従来分けられなかった株の多くが識別可能となった。

D. 考察

In silico による検索から多くの検出候補 ORF が見いだされたが、分離株を用いた調査では利用可能なものは限られていた。用いたゲノムデータの多くはドラフトであったことから、検索から漏れた配列が多く存在した可能性がある。また、データの多くは海外の研究者が登録したと考えられることから、日本で検出されるものとは遺伝的な特徴が異なる可能性も考えられる。

今回は non-0157 の EHEC 保存株が少なかったため、分離株による検討が十分とはいえない。株数を増やし、検討を加えることが必要である。

今回の検討は限定的であったにもかかわらず、

既存の EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与する ORF が見つかっている。有効な ORF をさらに探索することで、多くの EHEC に汎用的に使える POT 法の揮発が期待できる。

E. 結論

既存の EHEC 用 POT 法を改良するために必要な、菌株識別用 ORF はまだ存在し、さらに探索を進めることで、多くの EHEC 血清型を分子疫学解析可能な、EHEC 用 POT 法の開発が可能である。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

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

(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

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）
平成 29 年度 分担研究報告書

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
分担課題 食品媒介感染症・食中毒の疫学調査手法の整備に関する研究

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）
研究協力者 加納 和彦（国立感染症研究所感染症疫学センター・研究員）
研究協力者 高橋 琢理（国立感染症研究所感染症疫学センター・研究員）
研究協力者 駒瀬 勝啓（国立感染症研究所感染症疫学センター・再任用研究員）
研究協力者 齊藤 剛仁（国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官）

研究要旨

本分担グループでは、感染症発生動向調査事業（NESID）の患者データ・病原体（菌株）データと国立感染症研究所病原体部が有するより詳細な菌株データ（MLVA データ等）を連携させて、データ可視化と基本解析ができるシステムを開発することを目標にし、今年度は主に、NESID データと MLVA データを突合させるプログラムの作成と評価、改善案の検討を行った。今回作成した突合プログラムでは、2017 年の MLVA データ 2,873 件のうち、自動的に突合できたものは 1,895 件（66.0%）であった。現時点では残りの約 34%のデータが突合できておらず、突合アルゴリズムの改善により成功率を上げていく必要がある。同時に、入力エラーを極力減らす仕組みを検討していくことも重要な課題のひとつとみなされた。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、過去データから算出したベースラインとの比較により、例年には見られない特異的な患者報告数の増加を機械的に探知するシステムの開発も試みた。2017 年のデータについて遡りで調べたところ、年間のアラート発出件数は 30 件であった。アラート検知のアルゴリズムを感度、特異度、即時性の観点から検証し、改良を検討することが今後の課題である。また、アラート後の迅速な状況把握のための可視化・基本解析システムの開発、さらに突合した MLVA データを参照できるようにシステムを拡張するなど、一連のシステムの開発と改良を継続して行っていく予定である。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症事例発生時の調査・対策上の課題として、患者情報（疫学情報）と病原体情報（菌株情報）の連携が迅速に行えないことが従前より指摘されている。本分担グループにおいては、感染症発生動向調査事業（NESID）の患者データ・病原体（菌株）データと国立感染症研究所病原体部が有するより詳細な菌株データ（MLVA データ等）を連携させて、データ可視化と基本解析ができるシステムの開発を行う。その最初のステップとして、NESID データと MLVA データを突合させるプログラムを作成し、既存データに対する結果から問題点の整理とアルゴリズムの改善の検討を行う。また、詳細な菌株データが得られていない初期の段階において、より早期に集団発生・広域散発事例の疑いを探知することを目的として、患者報告数のベースライン（過去データを基に算出）からの逸脱を機械的に探知するシステムの開発を行う。疑い事例の早期探知、継続的なモニタリング、さらに詳細な菌株情報を合

わせた総合的なリスク評価を行う基盤を構築することで、事例発生時の調査及び介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上大きな貢献が期待出来る。また、患者情報、詳細な病原体情報の連携に基づく疫学調査の改善は、日本以外でも重要な課題であるとの情報を聞くことから、どのような対応がなされているかについて、主要国に対して情報収集を行うことも活動の一つとした。

B. 研究方法

（1）NESID データと MLVA データの連携

NESID に届出された EHEC 症例の患者データと、国立感染症研究所細菌第一部が有する MLVA データを突合させるプログラムを作成した。MLVA データの項目のうち、報告都道府県、患者の年齢、性別、住所（市町村）の 4 項目の値が完全に一致する症例を NESID データから検索するプログラムとした。データが欠損している場合は、欠損している項目は使用せず他の項目が完全に一致してい

るものを抽出した。このプログラムを 2017 年診断のデータ (NESID : 3,904 件、MLVA : 2,873 件) に対して実行し、突合が成功した (ひとつの NESID データに絞り込めた) 割合を算出した。

(2) NESID データを用いた集団発生・広域散発事例の早期探知

血清群毒素型別のベースラインとアラート発出の閾値を決定するため、2012~2016 年に届出された EHEC 症例のデータを用いて、血清群毒素型ごとに週別報告数の平均値、及び標準偏差 (SD) を算出した。過去 5 年 (2012~2016 年)、前後 1 週の週別報告数のデータ (計 15 個) の平均値をベースラインとし、ベースライン+1SD をアラート発出の閾値とした。平均値及び標準偏差の算出は、無症状者を含む全症例の場合と、有症状者のみの場合のそれぞれについて行った。また、IASR で報告されている方法 [文献 1] により各年の各血清群毒素型の週別「イベント数」(症例のクラスタ化後にクラスタ件数と散発症例数の合計) を算出し、これについても同様に、全症例、有症状者のみのそれぞれについてベースラインと閾値を決定した。症例数 (無症状者含む)、症例数 (有症状者のみ)、イベント数 (無症状者含む)、イベント数 (有症状者のみ) の 4 つの指標にいずれかにおいて、閾値 (過去平均+1SD) を越えた場合にアラートを発出するシステムを構築した。4 つの指標の大小関係から、a) 集団発生疑い (文献 1 の方法により、10 症例以上のクラスタを含むもの)、b) 広域散発疑い、c) 定期検便等の検査による無症状者のまとまった症例報告、などのように、想定される状況に分けてアラートを発出するシステムとした。なお、当該年データのクラスタ化は、迅速性の観点から、文献 1 のクラスタ化手法のうち目視確認によりクラスタ化する部分 (表の (1) の 3)、(2)) は省力し、自動でクラスタ化した結果を用いた。

(3) 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

2017 年度については、オーストラリア連邦政府保健省 (Australian Government Department of Health) からの紹介で、オーストラリア・メルボルンで 2018 年 3 月 27-28 日開催された、OzFoodNet に関係する疫学者の会議にオブザーバーとして、同国における食品媒介感染症・食中毒事例における疫学・病原体情報の評価・情報共有を行う場でのやり取りに参加した。

(倫理面への配慮)

疫学情報に含まれる個人情報の保護に十分な配慮しながら実施した。NESID 患者データからは

氏名、生年月日、住所の市町村以降のデータを削除し匿名化した上で解析に使用した。

C. 研究結果

(1) NESID データと MLVA データの連携

2017 年診断のデータについてプログラムにより自動的な突合を試みた結果は、2,873 件の MLVA データのうち、突合できたものが 1,895 件 (66.0%)、複数の NESID データが合致したものが 427 件 (14.9%)、合致する NESID データが見つからなかったものが 551 件 (19.2%) であった。

(2) NESID データを用いた集団発生・広域散発事例の早期探知

2017 年の NESID データを用いて (遡りで) アラート発出件数を調べたところ、2017 年一年間のアラート発出件数は 30 件であった (表)。O26 VT1 のアラート (9 件) が最も多く、次いで O157 VT1VT2、O157 VT2 及び O157 VT 型不明 が多かった (いずれも 4 件) (表)。アラート内容の内訳は、a) 集団発生疑いが 6 件、b) 広域散発疑いが 15 件、a) と b) の混合が 4 件、c) 検便等による無症状者増加が 5 件であった。

血清群毒素型	アラート件数
O26 VT1	9
O157 VT1VT2	4
O157 VT2	4
O157 VT型不明	4
O103 VT1	3
O111 VT1	2
O121 VT2	2
O145 VT2	1
O157 VT1	1
合計	30

表. 2017 年の血清群毒素型別アラート発出件数

(3) 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

2018 年 3 月 27-28 日にかけて、オーストラリアで開催された食中毒に関する疫学・病原体情報の評価・情報共有を行う OzFoodNet の会議に参加した。

参加者は各州の各州に配属されている疫学者、ラボ担当者、食品標準化部門、農水部門、感染症サーベイランス担当者であり、日本からは駒瀬、高橋が参加した。他に米国から参加者があった。今回の主たる議題は全ゲノム解析の導入について、その利点、弱点、サーベイランスでの活用などで、どのような状況で用いるのが効果的であるかについてのグループディスカッションが行わ

れた。日本の食中毒対応の状況について簡単な報告を行った。具体的な内容としては、日本における、食中毒と感染症の扱いの違い、食中毒部門と感染症部門、複数自治体間、地方自治体と国の情報共有の重要性について議論した。

また、2017年のEHECアウトブレイクについて、2つのピークについて、最初の散発事例（ピーク）早期探知が課題であることを示した上で、対策として実施される予定となっていることの紹介として、自治体間と国の協議会を設置すること、ガイドラインの改正、共通IDの導入、地方衛生研究所（以下、地衛研）でのMLVA導入について議論した。これらの報告に、以下のようなコメントが寄せられた。

- 探知はOzFoodNetの疫学者が情報共有を定期的に行っていることにより成立する
- 検査情報と疫学情報はオーストラリアでは州レベルで統合される（いくつかの州では自動照合）
- 州のDBから国に決まった情報が報告される（州と国の間では、どのような情報が提供されるか、取り決めに従う）

また、OzFoodNetの概要についての説明を受けた。OzFoodNetは2000年に設立され、国が資金を提供している州をまたがる組織である。各州に配属されている疫学者、ラボ担当者、食品標準化担当、農水部門等の担当者などからなる。毎週のリモート会議で州ごと食中毒の発生状況について報告し、疫学担当メンバー間で情報共有される。年に3回は全体のFace-to-Faceのミーティングを実施する。また、異常が発生した場合は、他のOzFoodNetメンバーに迅速にメールで情報共有し、食中毒情報は各州から国のシステムに報告する枠組みとなっている。

いくつかの州（NSW、Victoria）では、州のDBから患者情報、疫学情報、ラボ情報が自動的に国のシステムに報告される。これらの異常探知は目視と5年平均・SDを利用している。また、州における情報の統合についてはラボに送られる検体は個人情報つきであり、ラボから対象者に対して直接問い合わせが可能となっており、個人情報を元に疫学情報と検査情報が州レベルのDB上で自動的に統合される。

なお、今後、OzFoodNetにおける全国共通調査表、データベースの登録事項について情報を提供してもらえることになった。

D. 考察

（1）NESIDデータとMLVAデータの連携

1件のMLVAデータに対して複数のNESIDデータが合致したのものには、プロファイルが似た複数の

症例が存在した例（例えば保育園での集団発生では、報告都道府県、性別、年齢、住所（市町村）が同一の症例が複数存在することが有り得る）や、データ欠損により突合に使える項目数が少なく絞り込みが不十分であった例があった。反対にひとつも候補が見つからなかったものは、データの入力ミスや表記の揺らぎ（特に住所などの手入力項目）による不一致や、情報の取得時期が異なったことによる不一致（年齢等）が理由として考えられた。突合アルゴリズムの改善案としては、4項目が全て一致するNESIDデータが見つからない場合は、他の項目が一致するものを抽出する、年齢のズレはある程度許容する、等のことが挙げられる。ただし突合の基準を緩くした場合は誤った突合になる可能性が増大するので、他の情報（症状等）を見る等、人の目によるある程度の確認が必要になることはやむを得ないと考えられた。

入力エラーを考慮した突合アルゴリズムを検討すると同時に、入力エラーが発生する前の、データ生成のより初期の段階で両者を紐づける仕組みとして考えることも重要である。地衛研検等で検体が得られた段階において、予め検体にNESID患者データのIDを紐づけ、データベース化するシステムを構築することが最も理想的である。他にも、例えばMLVAデータ入力時に、該当するNESIDデータの候補を検索し参照することができれば、入力支援になるとともに入力エラーの頻度の低減につながると考えられる（その時点でNESIDデータとの紐づけもでき効率的でもある）。また、データ帳票の入力規則を整理しておくことも、入力ミスを減らし突合率を上げるうえで重要であり、今後の検討課題のひとつである。

（2）NESIDデータを用いた集団発生・広域散発事例の早期探知

アラートの内容として最も多かったのは、広域散発疑い（イベント数の閾値超過）であった（年間15件）。当該年のデータはクラスタ化を全自動で行っており、クラスタ化が不十分であることから、イベント数（＝クラスタ件数＋散発症例数）が過大評価される傾向がある。特に10症例未満の集団発生は、偶然の集積との区別が難しく自動ではクラスタ化ができていない。このため、イベント数の閾値超過のアラートは、10症例未満集団発生のクラスタ化不全により発出されるものが含まれる。アラート発出はその後の継続的なモニタリングやリスク評価のエントリーポイントのひとつであり、アラートが発出されたものについてはデータをよく吟味し、適切なリスク評価を行っていくことが大切である。アラート検知アルゴリズムを感度・特異度・即時性の観点から検証を行うとともに、状況把握のための可視化と基本解

析システムの開発、さらには突合した MLVA データを参照できるようにシステムを拡張することが今後の課題である。

(3) 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

オーストラリアにおける OzFoodNet の視察の結果、日本とは異なる点として、全国レベルでの情報共有が日本に比べて頻繁に行われておることが確認された。OzFoodNet 所属の疫学者が各州に配置され、緊密に情報連携が行われていること、ラボ検体は原則個人情報つきで提供されるため、疫学情報、患者情報との統合が容易である事がその原因と考えられる。また、オーストラリアでの食中毒対策は、国レベル、州レベルで実施される。そのため、全国共通調査表や州や国でのシステム上のデータフォーマットに関して詳細を把握することが重要であると思われた。これらについては引き続き情報交換を進めることについて、合意した。提供された情報に基づき、日本において有用な点を今後検討する。

E. 結論

本分担グループでは、事例発生の早期探知、継続的なモニタリング、患者データと細菌データの連携、一元化された情報を基に総合的なリスク評価を行うための基盤システムの構築を目的とし、本年度は、(1) 患者データと MLVA データの突合プログラムの作成と評価及び改善案の検討、(2) 事例疑いの早期探知のためのアラート発出システムのプロトタイプ版の開発と評価、(3) 海外情報収集 (オーストラリア OzFoodNet 視察) を行った。特に (1)、(2) について、今後大いに改

善の余地があり、継続して開発及び改良を行っていく予定である。従来から行われてきた日々の NESID 登録症例の監視、週間まとめ等を土台にして、IT 技術を活用した機械的な探知、詳細な菌株データとの連携・可視化システムを加えることで、効率的で迅速な事例探知と適切なリスク評価が行える仕組みの構築を検討していくこととした。

【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 0157 発生状況」

<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/2016/08/438d03t01.gif>

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					