

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 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

平成 31 年 (2019 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 30 年度 総括・研究分担報告書

目次

．平成 30 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
．平成 30 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	．．．．． 9
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	．．．．． 13
3 ．EHEC-POT 法の開発	
研究分担者 鈴木 匡弘	
藤田医科大学医学部微生物学講座	．．．．． 18
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	．．．．． 21
．研究成果の刊行に関する一覧表	．．．．． 25

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 （藤田医科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 に限定されていたが、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, O165, O91 も解析可能となった。MLVA43 法で 2018 年分離株の解析を行い、情報提供を開始した。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、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 (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 854 株を解析し、解像度 Simpson's 多様性指数 (SDI) を求めた。また、H30 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 法の解像度の検証

EHEC 0103 (n=337), 0121 (n=278), 0145 (n=129), 0165 (n=20), 091 (n=90) を用いて MLVA43 の解像度を検証した。EHEC 0103 (n=337) は 118 種類の型に、0121 (n=278) は 94 種類の型に、0145 (n=129) は 51 種類の型に、0165 (n=20) は 20 種類の型に、091 (n=90) は 72 種類の型が存在した (表 1)。それぞれの多様性指数 (SDI) は 0.962, 0.964, 0.931, 1 および 0.994 であり、菌株の異同を明らかにするためには十分な性能を持っていることを示した。

MLVA43 法は、EHEC 0157, 026, 0111 の解析のために開発された MLVA17 法に 26 箇所を解析部位を追加したものである。MLVA17 法で利用している 17 箇所の解析部位のうち、EHEC 0103, 0121, 0145, 0165, 091 の型別に貢献していない、つまり解析株全体が単一の結果を示す部位を検討した。表 1 に示すアレル数が 1 となる (SDI は 0 となる) 部位は 0103 で 6 箇所、0121 で 8 箇所、0145 で 11 箇所、0165 で 3 箇所、091 で 8 箇所であった。追加した 26 部位の中では、0103 で 10 箇所、0121 で

16 箇所、0145 で 11 箇所、0165 で 19 箇所、091 で 13 箇所であった。全解析部位のうち、型別に有効な部位は 0103 で 27 箇所、0121 で 19 箇所、0145 で 26 箇所、0165 で 10 箇所、091 で 22 箇所であった。

(2) MLVA43 法を用いた 2018 年分離株の解析
2018 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 2517 株のうち、0103, 0121, 0145, 0165, 091 が 251 株存在した (0103 株 = 126 株、0121 株 = 148 株、0145 株 = 46 株、0165 株 = 4 株、091 株 = 27 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 = 0.794, 0121 = 0.904, 0145 = 0.905, 0165 = 0.750, 091 = 0.955 であった (表 2)。

感染研に MLVA43 依頼があった EHEC 菌株の分離日から感染研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 4 週間以内の株は半数にみえない (43.7%)。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 13 機関) が増加してきた。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。2018 年は 0157/026/0111、計 342 株のデータの名付けが感染研で成されたが、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 8 割を超えた (82.7%)。特に 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が約 4 割であった。

(3) EHEC 0103 の MLVA 法の改善法の検討

EHEC 0103 に関しては、本研究で開発した MLVA43 法の解析では、十分に機能しない可能性が考えられた。これは EHEC 0103 は 0103:H2, 0103:H8, 0103:H25, 0103:H11 が混在する血清群であることが一因である (図 2)。現状では 0103:H2 が主に分離される血清型であることから、0103:H2 の集団事例が疑われる場合には、より詳細に解析する必要性が生じる可能性が考えられた。そこで、4 つの解析部位を 0103:H2 解析用に見出し、必要に応じて使用する準備を整えた。4 部位を追加解析することで、MLVA43 では分離できない (同一の MLVA 型になる) 菌株が分離されることが示された (図 3)。

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。IS-P_0121 と IS-P_0103 は 15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR のシステムとすることを決定し、この方針に基づいて両 IS-P の開発作業を進めた。IS-P_0121 の開発では、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解

析パイプラインを構築し、これを用いて標的部位の決定、PCR用プライマーの作成、PCR条件の最適化を行った。また標的となる15領域をプラスミドにクローニングすることによって陽性コントロールを作成した。IS-P_O103の開発に関しては、昨年取得したO103菌株のゲノム情報を使った高精度系統解析から、O103には複数の亜系統が存在することや参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナー亜系統に属することが判明した。そのため、この問題への対応として、比較的主要な3つの亜系統から1株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得した。その解析から、IS629が標的ISとして問題がないことといずれの株も参照ゲノムとして利用できることが確認できた。

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) IS-P_O111法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証IS629挿入部位の網羅的抽出
- 2) 非特異増幅プライマーの同定
- 3) 菌株識別解像度の低いIS629挿入部位の抽出
- 4) 菌株識別解像度向上に向けた新規IS629挿入部位の検討

が行われた。これらの検討から、IS-P_O111の検出系が整備された。

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。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81個のORFから既存のEHEC用POT法の菌株識別能力向上に寄与する9個のORFを特定することに成功した。改良型POT法では、特にO26およびO111におけるSimpson's indexは0.98以上と実用上十分な菌株識別能力に到達したほか、O103やO145についても同一の検出系でタイピング可能となった。

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・広域散发事例の早期探知
- 3) 実際の事例への対応について

が行われた。早期探知として現状の検出システムではアラートは2018年の1年間で16回検知された。その内訳は、O26・VT1(6)、O157・VT1VT2(4)、O157・VT2(4)、O103・VT1(1)、O121・VT1(1)であった(括弧内は検知回数)。また、実際の事例対応では、記述疫学に加え、患者の所有していた購

入食料品に関する電子情報等から喫食と発症の関連について解析疫学を実施し、特定の野菜について関連の可能性を見出した。遡り調査の結果は特定の産地の可能性を示唆するものであった。産地の可能性を示唆された自治体の農業関連組織を訪問し、当該野菜の栽培・収穫・流通等に関する情報を収集した。肥料の使用方法等を含め、野菜そのものが汚染された可能性は極めて低いものの、井戸水等の使用については情報がなかった。また、流通時のコールドチェーンや意図しない長期保存の問題等が残った。

D. 考察

IS-P_O121・IS-P_O103に関しては、15部位を標的とする1チューブのマルチプレックスPCRを作成することに決定した。2チューブを用いてさらに多数の標的部位を解析する系を作成することも可能であり、解像度の向上もある程度期待できるが、現場での作業の煩雑性やコストだけでなく、プライマーやコントロールの安定的な供給という面を考慮すると、妥当な判断ではあると考えている。

IS-P_O121の開発に関しては、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解析パイプラインを構築できた。これを用いて15箇所の標的部位を決定し、PCR用primerの作成とPCR条件の最適化を行うことができた。また、IS-P_O157などの場合と異なり、特定の株を陽性コントロールとして使用することができないことが判明したが、これに対する対応として、標的となる15領域をプラスミドにクローニングし、そのDNA混合液の陽性コントロールとして配布することとした。PCRの陽性コントロールとしては問題がないと考えている。なお、標的部位の選択において、プラスミド及び同じプロフェージからは一箇所のみを選択するという工夫を行ったが、これにより、IS-P_O157においてみられたプラスミドやプロフェージの脱落による影響を少なくできると思われる。

IS-P_O103の開発においては、O103には複数の亜系統が存在することと参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナーな亜系統に属することが判明した。この予想外の結果への対応として、比較的主要な3つの亜系統から1株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得したが、各株の主要ISはIS629であったことから、IS-P_O103の標的ISをIS629とすることに問題がないと言える。また、これら3株はいずれも参照ゲノムとして利用できる。このような状況から、IS-P_O103の開発作業は当初の予定より遅れているが、79株におけるIS629挿入部位の再検索を終え、IS-P標

的部位の決定を行っているところである。しかし、O121 の解析で開発したパイプラインを用いることができ、PCR 条件の検討に関しても一部は IS-P_O121 のものと重なるため、比較的早期に最終的な標的部位を決定して、プライマー及び陽性コントロールの作成ができると考えている。

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 IS-P_O103 や IS-P_O121 が開発できれば、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、効率化が可能となる。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もつながる。さらに、本分担研究の成果や開発戦略（特にゲノム情報基盤や IS 解析のパイプライン）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応用できるため、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。

IS-P_O111 に関しては、本年度の解析により、O111 IS-P 法プロトタイプに関して、菌株識別解像度の検証と不具合のあるプライマー（標的部位）の同定が完了した。現在、200 株のドラフトゲノム情報から得た新規 IS629 挿入部位について、菌株識別解像度向上のためのプライマー入れ換えを進め、最終セットの構築を進めている段階にある。来年度は、最終プライマーセットで標的となった各領域に対するプライマーを設計し、PCR 増幅・プラスミドヘクローニングして、濃度調整等を行い、PCR 時のコントロール DNA とする。また、最終セットおよびコントロール DNA を協力機関に試用版として配布し、個々の機関で同様の結果を得られるかを検討し、PCR 機器の違いなどにより不具合が見られた場合には、プライマーおよび PCR を再度至適化し、共通の結果が得られるように検討する。また、今後、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。

POT 法に関しては、今年度の成果では non-O157 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が、ゲノムデータを用いた性能評価では特に ORF 選択に利用可能であった分離株数が多い血清型で性能向上が見られた。特に、O26 および O111 については十分実用域に達していると考えられた。各血清型の分離株によるスクリーニングを追加し、検出 ORF セットの調整を行うことでさらなる菌株識別能力向上の可能性もある。一方、O121 については ORF 保有パターンの多様性が乏しく、POT 法によるタイピングは困難と考えられる。また、O91 は Simpson's index の数値は高くなったが、EHEC-POT 法の対象菌群から外れている可能性がある。

高解像度解析法の開発に開発は完了し、H29 および H30 年分離株について実際に使用した。また、MLVA の積極利用（地方衛生研究所）のため（平成 30 年 6 月 29 日付け事務連絡）、地方衛生研究所で得た MLVA データ（O157/O26/O111）を感染研で名付け等を実施するためのツール作りを行い、H30 年 7 月より実際に運用し、厚労省へのデータ提供を実施した。図 1 に示す通り、菌株の分子型別情報が速やかに共有される有効な手法であると考えられた。

MLVA43 法の利用にあたって注意する必要がある点を以下に示す。

1) EHEC O165 に関しては分離株が増加した際には十分な解像度を示さない可能性があることに注意が必要である。

2) 分離頻度が低い血清群に対する MLVA43 法の解析結果の解釈として、同一菌株を原因とする集団事例が発生した場合には多様性指数が低下することを念頭におく必要がある。一見、解像度の低下が MLVA43 法の技術的な限界であるように見えることもあるが、2018 年の EHEC O121 の同一型は実際、広域食中毒事例と施設内集団事例であったことから、MLVA43 法の利用価値があることを示唆した。

3) 一方で、MLVA43 法でも十分な解析が出来ない場合もある。O103 に関しては、O103:H2 の詳細解析が可能な改良版を作成した。MLVA43 法を基本に、個別必要性に応じて改良が比較的容易にできることを理解しておくことが重要である。

最終年度は MLVA（O157/O26/O111）に関する精度管理の考え方を整理すること、また動物由来株の MLVA データの取得を開始することが更なるデータ蓄積に貢献に繋がる。

NESID データを用いた広域散発事例の早期探知ではいくつか問題点が抽出された。感度・迅速性重視の閾値を内部関係者向けの注意喚起用に用い、これとは別に、本アラート用の閾値を設定するこ

とを検討する必要がある。これにより、内部関係者は迅速に探知してデータの解析とモニタリングをすることができ、外部向け本アラートにおいては、偽陽性の低減が期待できる。表2は、本アラートの閾値を+2SD以上もしくは二週連続で+1SD以上とした場合の、本アラートの検知回数である。2019年は、この新たな基準を用いて広域散発事例疑いの自動探知とアラート発出を試みる。

また、実際の事例探知において広域の可能性の高い事例を探知する試みは有効に機能したと考えられた。ただし、従来通りの制約、すなわち、疫学的な分析結果では原因として断定するには至らず、自治体による初動時点での関連する可能性のある食材を如何に迅速に確保出来るかということが必要であることが分かった。さらに、食材（特に野菜）が汚染されるプロセスを知り、原因究明と対応改善につなげるためには、野菜の衛生管理指針の理解に基づく中長期的な連携関係の構築が必要であると考ええる。

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の開発が進んだ。最終年度では、型別法の検証をさらに進めると同時に、発生動向調査に基づいたアラート発出とその検証を厚生労働省と連携して運用を試みる。

【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

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. 学会発表

大西真:国内の患者由来腸管出血性大腸菌の特性、72回日本細菌学会東北支部総会、2018年8月、仙台市

泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真、腸管出血性大腸菌分離株の分子疫学解析状況について、2018年、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

泉谷秀昌、腸管出血性大腸菌の分子疫学、日本防菌防黴学会第45回年次大会、2018年11月東京
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

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:腸管出血性大腸菌O121用IS-printing systemの開発を見据えたO121に分布するISの網羅的探索と国内分離株における分布状況の調査、腸管出血性大腸菌研究会、2018年11月8~9日、東京

(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 MLVA43 法の各解析部位の評価

MLVA 型	O103 (n=337)		O121 (n=278)		O145 (n=129)		O165 (n=20)		O91 (n=90)	
	# allele	SID	# allele	SID	# allele	SID	# allele	SID	# allele	SID
MLVA 型	118	0.962	94	0.964	51	0.931	20	1.000	72	0.994
MLVA17 で用いている解析部位										
EH111-11T	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
EH111-14BB	2	0.187	1	0	1	0	1	0	2	0.126
EH111-8O	6	0.198	2	0.014	2	0.016	1	0	1	0
EH157-12N	1	0	1	0	2	0.016	1	0	1	0
EH26-7D	3	0.289	1	0	1	0	1	0	1	0
EHC-1Q	13	0.803	9	0.747	5	0.537	1	0	18	0.921
EHC-2C	15	0.420	7	0.550	2	0.016	1	0	4	0.066
EHC-5S	16	0.540	5	0.124	2	0.016	5	0.679	12	0.474
EHC-6U	14	0.687	12	0.215	8	0.321	8	0.879	15	0.732
O157-3W	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
O157-34Y	3	0.254	1	0	2	0.016	1	0	1	0
O157-9M	13	0.374	2	0.007	8	0.399	1	0	2	0.044
O157-25J	1	0	2	0.007	1	0	1	0	1	0
O157-17Z	1	0	1	0	4	0.265	1	0	1	0
O157-19L	2	0.128	1	0	2	0.016	1	0	3	0.168
O157-36AA	1	0.000	2	0.007	1	0	1	0	2	0.106
O157-37V	15	0.467	10	0.208	8	0.264	6	0.632	8	0.647
MLVA43 で追加された 26 箇所解析部位										
Q1701	5	0.446	1	0	1	0	1	0	2	0.022
Q1702	2	0.172	1	0	1	0	1	0	2	0.022
Q1705	3	0.475	3	0.231	4	0.105	1	0	1	0
Q1708	1	0	1	0	4	0.120	1	0	1	0
Q1710	1	0	1	0	8	0.635	1	0	1	0
Q1712	2	0.294	1	0	2	0.016	3	0.279	2	0.106
Q1716	2	0.191	2	0.014	1	0	4	0.553	1	0
Q1724	7	0.449	2	0.007	2	0.016	1	0	2	0.044
Q1725	5	0.216	6	0.517	7	0.759	6	0.705	7	0.190
Q1727	3	0.181	2	0.083	4	0.046	1	0	3	0.242
Q1730	1	0	1	0	1	0	1	0	7	0.387
Q1731	3	0.267	2	0.007	2	0.031	1	0	6	0.537
Q1704	6	0.223	6	0.345	2	0.075	2	0.100	5	0.473
Q1711	1	0	1	0	4	0.216	1	0	1	0
Q1714	1	0	1	0	1	0	3	0.353	1	0
Q1715	1	0	2	0.007	1	0	1	0	1	0
Q1717	1	0	1	0	2	0.016	4	0.642	2	0.022
Q1718	1	0	1	0	2	0.131	1	0	1	0
Q1720	3	0.193	1	0	1	0	1	0	1	0

Q1721	5	0.259	1	0	1	0	2	0.100	1	0
Q1722	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
Q1723	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
Q1726	2	0.012	10	0.794	1	0	1	0	4	0.129
Q1728	11	0.131	1	0	3	0.031	1	0	1	0
Q1729	6	0.399	1	0	3	0.031	1	0	2	0.086

表2 2018年分離株を用いた MLVA43 法の解像度の評価

	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。

図1 分離日から感染研受領日の日数の分布

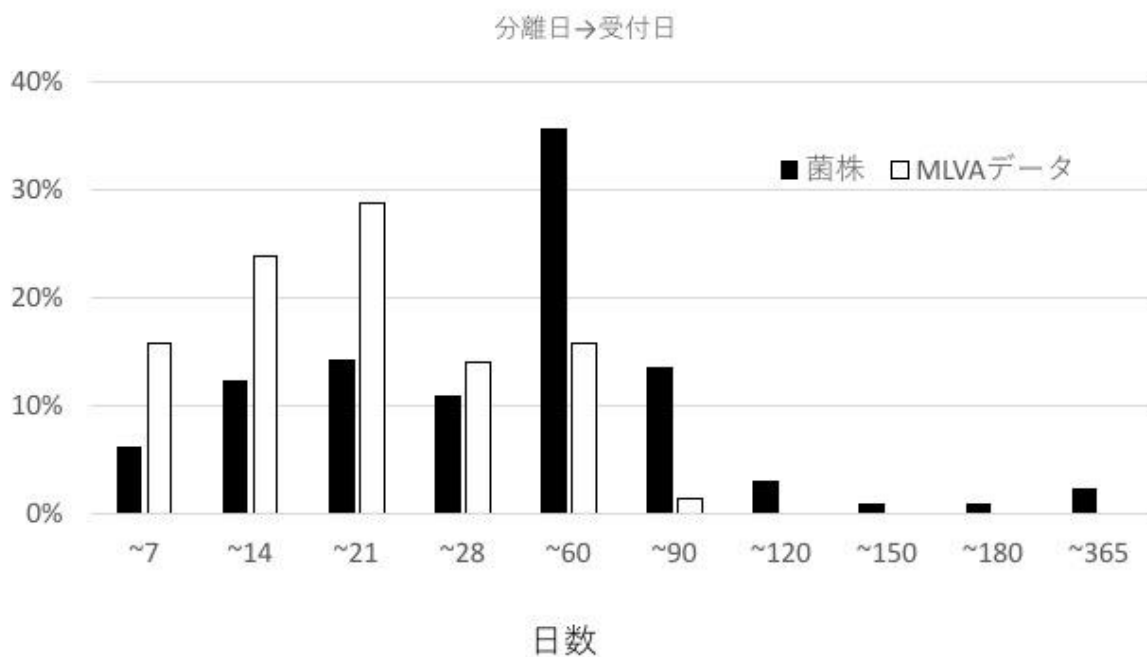


図2 血清群O103のEHECのMLVA型別

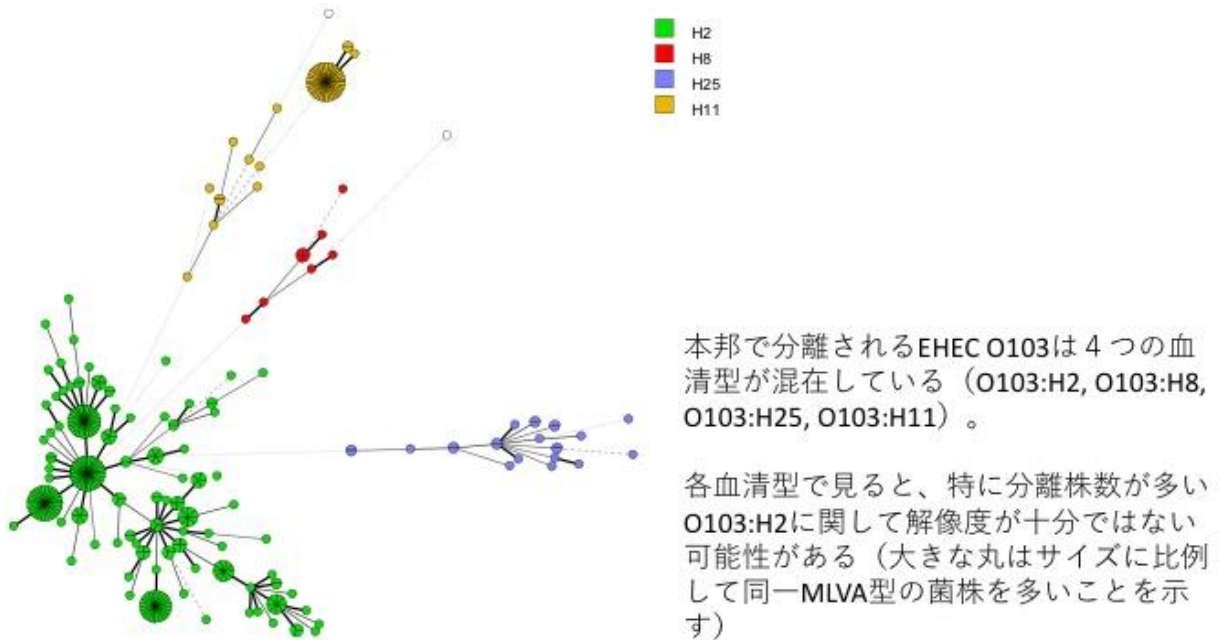
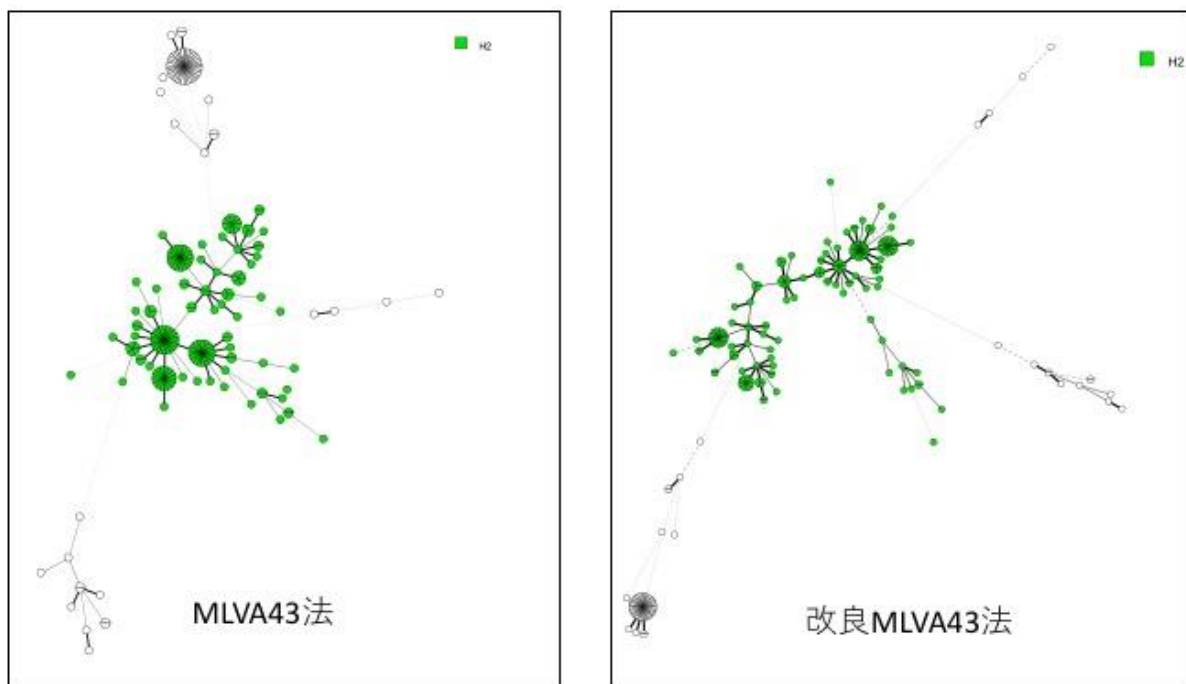


図3 血清群O103のEHECのMLVA型別の改良



色が付いている丸がO103:H2菌株のMLVA型を示す。MLVA43法では同一型となる菌株も、改良MLVA43法(4部位追加)でさらに詳細な解析が可能となった。

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 30 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、施設間等での比較も容易なデータが極めて迅速に得られるため、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 用及び O103 用の IS-P 法（IS-P_O121 と IS-P_O103）を開発する。本年度は、IS-P_O121 と IS-P_O103 は 15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR のシステムとすることを決定し、この方針に基づいて両 IS-P の開発作業を進めた。IS-P_O121 の開発では、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解析パイプラインを構築し、これを用いて標的部位の決定、PCR 用プライマーの作成、PCR 条件の至適化を行った。また標的となる 15 領域をプラスミドにクローニングすることによって陽性コントロールを作成した。IS-P_O103 の開発に関しては、昨年取得した O103 菌株のゲノム情報を使った高精度系統解析から、O103 には複数の亜系統が存在することや参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナー亜系統に属することが判明した。そのため、この問題への対応として、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得した。その解析から、IS629 が標的 IS として問題がないことといずれの株も参照ゲノムとして利用できることが確認できた。このような状況から、IS-P_O103 の開発は当初予定より遅れたが、O121 の解析で開発したパイプラインを用いることができることなどから、比較的早期に標的部位を決定し、プライマー及び陽性コントロールの作成ができると考えている。

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（地衛研）で広く使用されている。また、多検体処理が容易な高精度解析法（MLVA 法）との組み合わせによって、より高精度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 O157 用と O26 用 IS-P 法の開発経験を活かして、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

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（感染研）の共同研究によって蓄積できていたが（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、昨年度は、感染研が収集した EHEC 分離株の中から 100 株の O103 を選択し、73 株のゲノム情報を取得した。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 83 株のゲノム情報を取得した。また、これらの情報を基に高精度系統解析を行い、メジャー系統に属する 79 株と、大きく系統が異なるマイナー系統に属する 4 株を同定した。さらに、両血清型の参照ゲノムに含まれる IS の種類やコピー数などを検索し、O121 の主要 IS として IS600 と IS629 を、また、O103 の主要 IS として IS629 を同定し、それぞれの IS-P 法の標的 IS に決定した。O121 については、上記

83 株の IS600 と IS629 の分布を検討した結果、マイナー系統に属する 4 株には IS600 と IS629 は少数のコピーしか存在しないことから、IS-P_O121 の対象としては考慮しないこととした。一方、メジャー系統に属する 79 株については、IS600 と IS629 を用いた IS-P_O121 には十分な解像度が期待できることを確認した。以上の結果を基に、本年度は以下の解析を行った。

1. O121 の解析

(1) メジャー系統に属する 79 株における ISMapper を用いた IS600 と IS629 の分布・局在情報を基に、挿入部位近傍の配列の解析を行い、近傍に IS の存在する IS コピーを同定した。これらを標的候補から除外した後、IS600 と IS629 挿入部位の上流下流に分けて 4 セットの IS 挿入部位データセットを作成し、クラスタリング解析を行うことにより、最も解像度の高い組み合わせを選択できる解析パイプラインを構築した。

(2) 上記のパイプラインを用いて 15 箇所の IS600 または IS629 の挿入部位を標的部位として決定し、マルチプレックス PCR 用のプライマーを作成した。また、酵素、プライマー濃度等に関する至適条件を検討した。

(3) 配布用の陽性コントロールを作成するため、IS-P の標的となる 15 領域を pUC プラスミドにクローニングした。

2. O103 の解析

(1) 昨年度に取得した 73 株のゲノム配列から、全ゲノムレベルで各株の SNP を同定し (SNP 同定法の詳細については割愛する) この情報を基に RAxML を用いて最尤法による高精度系統解析を行った。

(2) 上記の解析結果から、O103 には複数の系統が存在し、以前に完全長配列を決定した参照ゲノム株は、マイナーな系統に属することが判明したため、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、ナノポア社の MinION を用いて long read sequencing を行った。さらに Unicycler を用いてイルミナ配列との hybrid assembly を行い、3 株の完全長配列を取得した。また各株において、ISFinder を用いて IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を検討した。

(3) ISMapper とは異なる IS 解析プログラムである ISseeker の性能 (検出感度と正確性) を検討した。また、ISMapper を使って、79 株における IS629 挿入部位を再度解析した。さらに、O121 の解析で開発したパイプラインを用いて、最終的な IS-P 標的部位の決定を行った。

(4) IS-P データの検証用データとして、新たに 29 株の O103 を収集し (感染研からの分与が難しかったため、各地の地衛研から直接分与を受け

た) 他の菌株と同様にイルミナシーケンサーと Platanus アッセンブラーを用いてゲノム配列を取得した。

(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 においても O103 においても、最終的な IS-P 法としては、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR のシステムとすることに決定した。

2. O121 の解析

(1) メジャー系統に属する 79 株の ISMapper を用いた解析と挿入部位近傍配列の解析から、近傍に IS の存在する IS コピーを同定し、これらを除いた IS600 と IS629 挿入部位の上流下流それぞれについて、19 箇所の標的候補部位を決定した。これらを組み合わせた 4 セットの標的候補部位データセットを作成し、クラスタリング解析を行うことにより、最も解像度の高い組み合わせを選択できる 15 箇所の IS600 と IS629 の挿入部位を最終的な PCR 標的部として選択した (候補部位選定のパイプラインの構築)。この際、プラスミド及び同じプロファージ (別研究の解析で保存性が高いことが判明している Stx2 ファージを除く) からは 1 箇所のみを選択することにより、プラスミドやプロファージの脱落による影響を抑える工夫をした。

(2) 決定した 15 箇所の標的部位を標的としたマルチプレックス PCR 用のプライマーを作成し、使用する酵素の種類やプライマー濃度等に関して条件検討を行い、PCR 条件の至適化を行った。

(3) 上記の 15 標的部位が 1 株のゲノム上には存在しないため、特定の株を陽性コントロールとして使用することができないことが判明した。そこで、IS-P 法の標的となる 15 領域を pUC プラスミドにクローニングし、配布用の陽性コントロールを作成した。現在、この陽性コントロールに含める各プラスミドの濃度に関して最終的な検討を行っているところである

3. O103 の解析

(1) 73 株のゲノム配列を基に高精度系統解析を行った結果、O103 には複数の亜系統が存在すること、また以前に我々が完全長配列を決定した株 (参照ゲノム予定株) は、マイナーな亜系統に属することが判明した。この結果に対応するため、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、long read sequencing とイルミナ配列との hybrid

assembly を行い、3 株の完全長配列を新たに取得した。完全長配列を用いて、各株における IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を検討したところ、IS629 が主要 IS であった。この結果から、IS-P_O103 の標的 IS を IS629 から他の IS に変更する必要がないことを確認した。

(3) ISseeker の性能 (検出感度と正確性) を検討した結果、read mapping による新規挿入部位の検索に関しては、ISMMapper の方が適していると考えられた。そこで、IS-P 標的候補部位の検索を行うため、79 株における IS629 挿入部位の検索を、3 株の完全長配列を加えて、ISMMapper を用いて再度実施した。現在、この結果を基に、O121 の解析で開発したパイプラインを用いて、15 箇所 IS-P 標的部位の決定を行っているところである。

(4) 新たに 29 株の O103 を各地の地衛研から収集し、他の菌株と同様にゲノム配列を取得した。本データは、IS-P データの検証用に使用する予定である。

D. 考察

最終的な IS-P としては、IS-P_O121・IS-P_103 とともに、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR を作成することに決定した。2 チューブを用いてさらに多数の標的部位を解析する系を作成することも可能であり、解像度の向上もある程度期待できるが、現場での作業の煩雑性やコストだけでなく、プライマーやコントロールの安定的な供給という面を考慮すると、妥当な判断ではあると考えている。

IS-P_O121 の開発に関しては、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解析パイプラインを構築できた。これを用いて 15 箇所の標的部位を決定し、PCR 用 primer の作成と PCR 条件の至適化を行うことができた。また、IS-P_O157 などの場合と異なり、特定の株を陽性コントロールとして使用することができないことが判明したが、これに対する対応として、標的となる 15 領域をプラスミドにクローニングし、その DNA 混合液の陽性コントロールとして配布することとした。PCR の陽性コントロールとしては問題がないと考えている。なお、標的部位の選択において、プラスミド及び同じプロファージからは一箇所のみを選択するという工夫を行ったが、これにより、IS-P_O157 においてみられたプラスミドやプロファージの脱落による影響を少なくできると思われる。

IS-P_O103 の開発においては、O103 には複数の亜系統が存在することと参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナーな亜系統に属することが判明した。この予想外の結果への対応とし

て、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得したが、各株の主要 IS は IS629 であったことから、IS-P_O103 の標的 IS を IS629 とすることに問題がないと言える。また、これら 3 株はいずれも参照ゲノムとして利用できる。このような状況から、IS-P_O103 の開発作業は当初の予定より遅れているが、79 株における IS629 挿入部位の再検索を終え、IS-P 標的部位の決定を行っているところである。しかし、O121 の解析で開発したパイプラインを用いることができ、PCR 条件の検討に関しても一部は IS-P_O121 のものと重なるため、比較的早期に最終的な標的部位を決定して、プライマー及び陽性コントロールの作成ができると考えている。

今後の計画としては、IS-P_O121 に関しては、現在、陽性コントロールに含める各プラスミドの濃度の検討が終了次第、各地の地衛研にプライマー、プロトコル、陽性コントロールを配布し、現場で試験的な利用の段階に進むことができると考えている。IS-P 標的部位の決定を現在行っている IS-P_O103 に関しても、早期に現場で試験的な利用の段階に進むことができると考えている。

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 IS-P_O103 や IS-P_O121 が開発できれば、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、効率化が可能となる。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もつながる。さらに、本分担研究の成果や開発戦略 (特にゲノム情報基盤や IS 解析のパイプライン) 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応用できるため、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

IS-P_O121・IS-P_103 とともに、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR を作成することに決定し、この方針に基づいて両 IS-P の開発作業を進めた。IS-P_O121 に関しては、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解析パイプラインを構築でき、これを用いて標的部位の決定し、PCR 用プライマーの作成と PCR 条件の至適化を行った。また、IS-P 標的となる 15 領域をプラスミドにクローニングすることによ

って、PCR の陽性コントロールを作成した。IS-P_O103 の開発においては、O103 には複数の亜系統が存在することや参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナーな亜系統に属することが判明したため、この問題への対応として、比較的 주요な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得した。IS-P_O103 の標的 IS を IS629 とすることに問題がないこと、またはいずれの株も参照ゲノムとして利用できることが確認できたが、IS-P_O103 の開発作業は当初の予定より遅れた。しかし、O121 の解析で開発したパイプラインを用いることができ、PCR 条件の検討に関しても一部は IS-P_O121 のものと重なるため、比較的早期に最終的な標的部位を決定して、プライマー及び陽性コントロールの作成ができると考えている。

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

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: 腸管出血性大腸菌 O121 用 IS-printing system の開発を見据えた O121 に分布する IS の網羅的探索と国内分離株における分布状況の調査、腸管出血性大腸菌研究会、2018 年 11 月 8~9 日、東京

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 30 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る。そのため、集団感染事例を特定し、感染源を明確にすることが重要であるが、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 例と依然として多く、血清型も O157 が中心であるものの、O26, O103, O111 などの報告数も多い。また、原因や感染経路等が判明しないケースも多数残されている。我々はこれまでに EHEC O157 ゲノムにおいて挿入配列 IS629 の局在が株間で多様である点を利用し、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、参照株である 11128 株の IS629 挿入部位を標的とした O111 IS-P 法プロトタイプ（FS1~3, RS1~3 の 6 セット[計 52 カ所]）を構築した。それをを用いて系統の異なる 206 株についての菌株識別解像度検定を実施した結果、206 株を 149 パターンに識別することが出来た。また、この検定により、非特異的増幅がみられる、PCR 増幅効率が低い、菌株識別解像度が低い（PCR 陽性が 5 株未満、あるいは 190 株以上）、FS および RS（IS 両サイド）で結果が同じになる等の非効率なプライマーを同定し、選別・除去することによって FS, RS とともに 12 領域のプライマーの選定が完了した。

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

1) O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証

昨年度の研究で参照株 11129 株の IS629 挿入部位の情報を基に O111 IS-P 法プロトタイプ（FS1-3, RS1-3 の 6 プライマーセット[標的部、計 52 カ所]）の構築が完了した。本年度は、O111 分離株のゲノム DNA を用いてプロトタイプの菌株識別解像度についての検証を行った。検証には、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）を基に高精度系統解析を行い、その中から系統の離れた 206

株を選定して実施した。PCRにはKOD-Multi&EPI(東洋紡)を用い、PCR反応液の組成は計15 μ l(template DNA 1 μ l、外部プライマーミックス[各4.5 μ M] 1 μ l、IS629内部プライマー[25 μ M] 1 μ l、2 \times PCR buffer 7.5 μ l、MilliQ水 4.2 μ l、KOD-Multi&EPI酵素 0.3 μ l)、PCRプログラムは94 $^{\circ}$ C 2min、30サイクル(98 $^{\circ}$ C 10秒、58 $^{\circ}$ C 30秒、68 $^{\circ}$ C 1分)、電気泳動は2% Agarose S(ニッポンジーン) in 0.5 \times TBEバッファーを用い、PCR反応液1 μ lを泳動するという条件で実施した(図1)。得られたPCR増幅バンドの有無(有りを「1」、無しを「0」)をデジタル化し、Clusterソフトを用いてバンド情報を基にしたデンドログラムを作成した(図2)。

2) 非特異増幅プライマーの同定

項目1)で実施したPCR結果判定に際し、目的サイズと明らかに異なるバンドが検出される株があった場合、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別PCRを行って、どのプライマーに由来する非特異増幅バンドかを同定した(図3)。

3) 菌株識別解像度の低いIS629挿入部位の抽出

O111 IS-P法プロトタイプからの菌株識別解像度向上ならびに検査現場で対応可能なプライマーセット(2プライマーセット)の最終構築のため、まず、プロトタイプにおいて識別解像度が低いIS629挿入部位の同定を試みた。項目1)の解析結果から、PCR陽性が5株未満、180-190株、190株以上という基準で該当領域を抽出し、必要に応じて該当プライマーを除去した。

4) 菌株識別解像度向上に向けた新規IS629挿入部位の検討

昨年度の研究において200株のドラフトゲノム情報から新たに同定したIS629挿入部位の中で、図4において菌株識別解像度が低かった系統を中心に解像度向上が見込まれる標的部位を抽出した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

1) O111 IS-P法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証 IS629挿入部位の網羅的抽出

系統の離れたO111 206株について、IS-P

法プロトタイプ6プライマーセットを用いたPCRを実施した。その結果、各プライマーセットにより泳動パターンに違いが見られることが分かった(図1: FS1セットの泳動例)。6セットのPCRにより得られたバンドパターンを基にclusterソフトでデンドログラムを作成した(図2)。その結果、206株が149パターンに分かれること、同じバンドパターンを示す株が2株(23タイプ)、3株(7タイプ)、4株以上(5タイプ)検出されること、また、計52領域の標的に対して検出バンドの本数が15本未満の株が19株存在することなどが明らかとなった。

2) 非特異増幅プライマーの同定

図3の例に示すように、FS1-3およびRS1-3のプライマーセットによるマルチプレックスPCR結果を検証する際、増幅されたバンドの中に目的サイズと明らかに異なるものが見られる株が複数検出された。これらの株について、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別PCRを行うことで、その非特異増幅バンドがどのプライマーに由来するかを同定した。この解析により、計8個の外側プライマーをプロトタイプから削除した。

3) 菌株識別解像度の低いIS629挿入部位の抽出

項目1)の解析結果から、PCR陽性が5株未満であった部位を9カ所、180-190株でPCR陽性であった部位を8カ所、190株以上でPCR陽性であった部位を2カ所同定した。この結果を基に、同定した計19カ所のうち、190株以上でPCR陽性であった1カ所を除く18カ所について標的候補から削除した。なお、190株以上で陽性となった1カ所については、PCRの陽性コントロールとして採用した。

項目2)、項目3)の過程を経てプロトタイプから採用されたプライマーセットでは、206株が108パターンに分かれ、菌株識別解像度が極端に下がる系統も見られた(図4)。

4) 菌株識別解像度向上に向けた新規IS629挿入部位の検討

200株のドラフトゲノム情報から新たに同定したIS629挿入部位について、項目2)、3)で選別したプライマーセットの結果から得られたデンドログラム(図4)の結果にその有無をプロットした結果、菌株識別解像度が図5のように164パターンへと向上した。

D. 考察

本年度の解析により、O111 IS-P 法プロトタイプに関して、菌株識別解像度の検証と不具合のあるプライマー(標的部位)の同定が完了した。現在、200 株のドラフトゲノム情報から得た新規 IS629 挿入部位について、菌株識別解像度向上のためのプライマー入れ換えを進め、最終セットの構築を進めている段階にある。

来年度は、最終プライマーセットで標的となった各領域に対するプライマーを設計し、PCR 増幅・プラスミドヘクローニングして、濃度調整等を行い、PCR 時のコントロール DNA とする。また、最終セットおよびコントロール DNA を協力機関に試用版として配布し、個々の機関で同様の結果を得られるかを検討し、PCR 機器の違いなどにより不具合が見られた場合には、プライマーおよび PCR を再度至適化し、共通の結果が得られるように検討する。また、今後、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

O111 IS-P 法プロトタイプの検証により、不具合のあるプライマーなどを削除した結果、系統の異なる O111 分離株 206 株を 108 パターンに分類することが出来た。現在、200 株のドラフトゲノム情報から得た新規標的部位を加えてさらに菌株識別解像度を高め、最終的に FS, RS の 2 プライマーセットで対応できるシステムの構築を進めている。今後、実際の検査現場で安定した結果を得

るため、協力機関で試用版の検討を行い、得られた結果をフィードバックして、プライマー等の最適化を進める。また、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 PCR 反応条件ならびに泳動条件の至適化も実施し、最終的に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

大岡唯祐、李謙一、桂啓介、伊豫田淳、蘭牟田直子、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

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

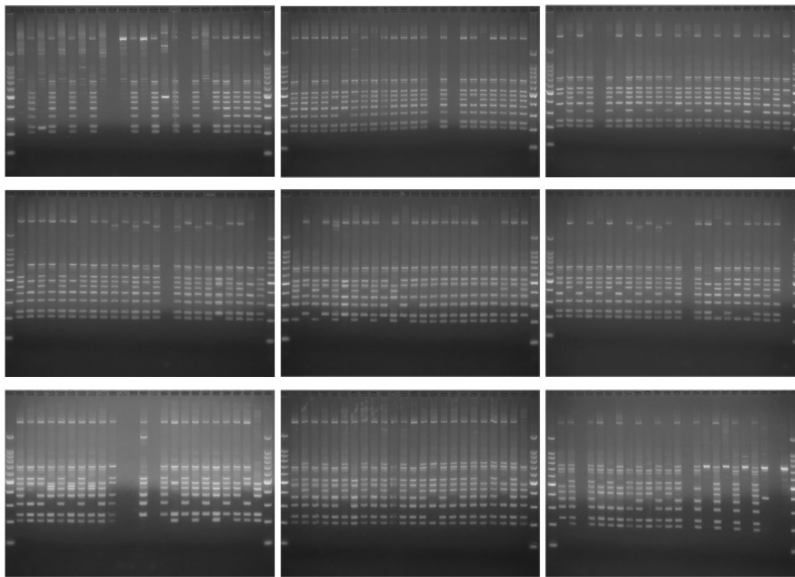


図1 O111 IS-P 法プロトタイプによる 206 株の PCR・電気泳動結果の例 (FS1 プライマーセット)。
206 株で異なるバンドパターンが得られているが、全くバンドが検出されない株やほぼ全株で検出されているバンドがある。

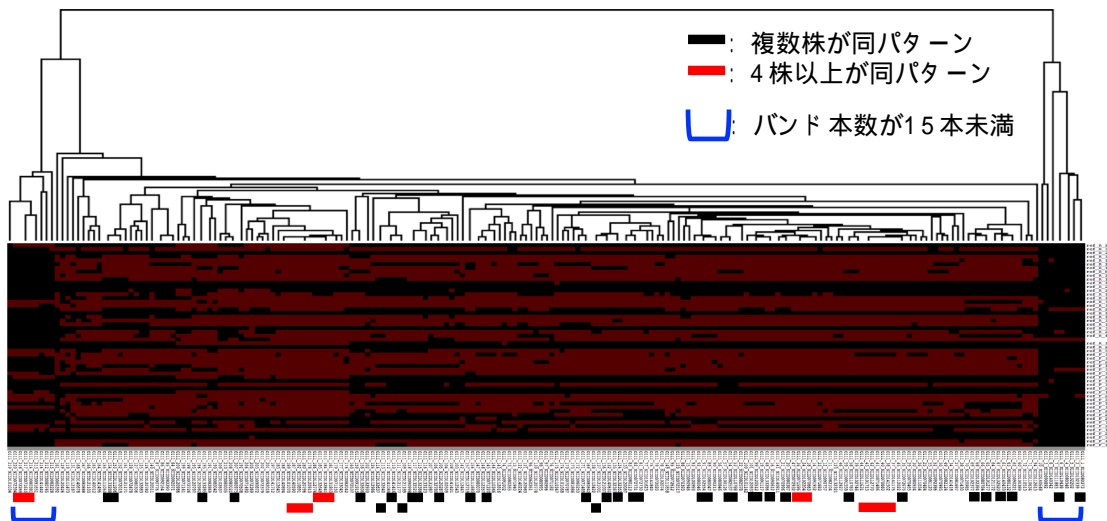


図2 O111 IS-P 法プロトタイプ 6 プライマーセットによる PCR 結果のデンドログラム
FS1-3 および RS1-3 の 6 プライマーセットによる結果から、149 パターンに分類されたが、複数株が同じパターンを示す場合なども見られた。

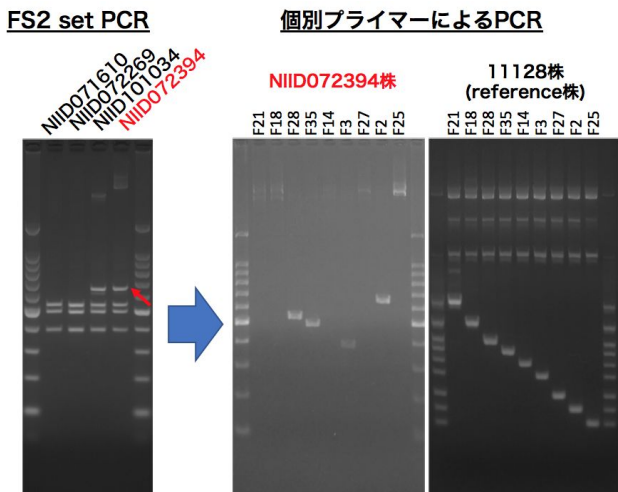


図3 非特異増幅によるバンド検出とその原因プライマーの同定の例 (FS2 セット、NIID072394 株)
NIID072394 株 (および NIID101034 株) で見られた非特異増幅バンド (赤矢印) について個別 PCR による検証の結果、F2 プライマーにより該当バンドが検出されることが判明した。

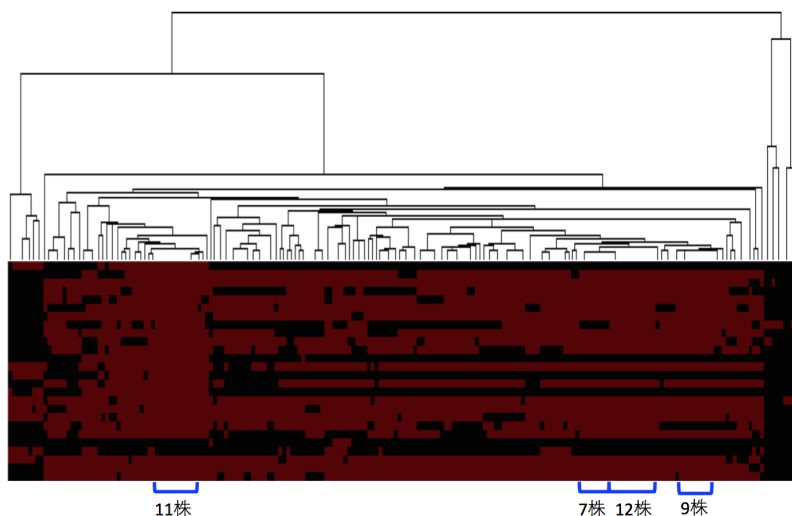


図4 PCR増幅効率が低い、非特異増幅があるプライマーを除去した後の菌株識別解像度.

項目2), 3)で該当するプライマーを除去した結果、菌株識別解像度が108パターンに下がり、特に解像度が下がる系統が4グループ検出された。

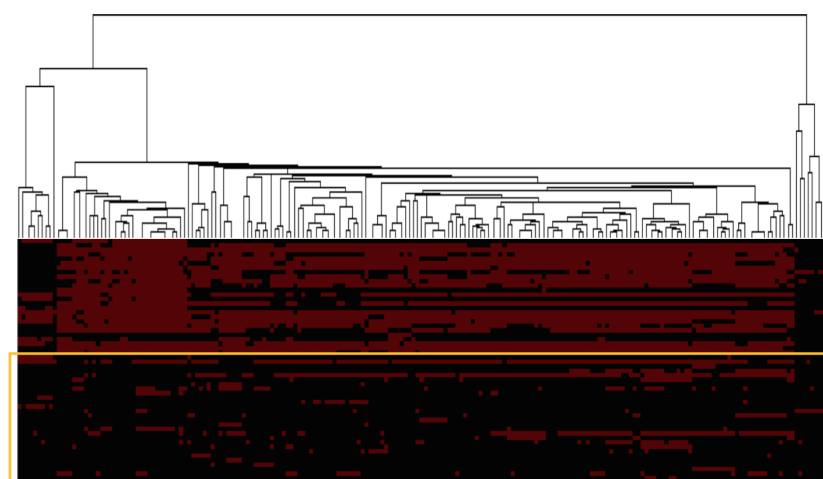


図5 新規IS629挿入部位(29カ所)の情報追加による菌株識別解像度の向上

図4のデータに新規IS629挿入部位(計29カ所)の情報を追加することにより、108パターンであった菌株識別解像度が164パターンにまで向上した。

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 30 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 （藤田医科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 81 個の ORF から既存の EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与する 9 個の ORF を特定することに成功した。改良型 POT 法では、特に O26 および O111 における Simpson's index は 0.98 以上と実用上十分な菌株識別能力に到達したほか、O103 や O145 についても同一の検出系でタイピング可能となった。

A. 研究目的

食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）においては、できる限り迅速に探知することが重要である。特に EHEC が原因である場合、被害が甚大になることがあることから、分子疫学的手法による早期の検出が必要である。EHEC 食中毒の原因菌として以前は O157 が最も多く O26 と O111 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、O103 や O121 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 O157 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、O157 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 - 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、主要な血清型に対して汎用的に用いることができる、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 O26、O91、O103、O111、O121、O145 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。（H29 年度）

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 81 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。

マルチプレックス PCR 反応系の設計

菌株識別能力向上への貢献度が高い ORF について、マルチプレックス PCR 反応系による検出を可能となるよう、プライマー設計を行った。

菌株識別能力の評価

利用可能な菌株の不足を補うため、ダウンロードしたデータを用いて POT 型を予測し、Simpson's index を計算した。用いたデータ数は、026 が 115 株、091 が 39 株、0103 が 88 株、0111 が 86 株、0121 が 47 株、0145 が 37 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 81 個見つかった。この 81 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。81 個の ORF についてプライマーを作成した。

分離株による 81 個の ORF の保有状態調査の結果、81 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する 9 個の ORF を特定することができた。この 9 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。

追加された 9 個の ORF を検出するため、従来の 1 反応系の EHEC-POT 法に加え、追加の反応系を設計した。新たに設計したマルチプレックス PCR には前述の 9 個の ORF に加え、*stx2* と *eae* 及び大腸菌のマーカーを加えた 12-plex PCR とした。

保存株におけるタイピング結果は 25 株の 026 は 21 種類の POT 型に、8 株の 0103 は 5 種類の POT 型に、7 株の 0111 は 6 種類の POT 型に、また、0121、0145、0165 の株はそれぞれ異なる POT 型となった。

ダウンロードしたゲノムデータによる Simpson's index は 026 で 0.991、0111 で 0.984、0103 で 0.974 と良好な菌株識別能を示し、特に 026 と 0111 では顕著な識別能向上が実現された。

また、0145 では 0.956 とやや菌株識別能力はやや低かった。一方、0121 については 0.534 と実用域から外れていた。091 については 0.974 と Simpson's index は良好な数値となったが、検出される ORF が少なかった。

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、データの欠落などが原因となった可能性がある。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が、ゲノムデータを用いた性能評価では特に ORF 選択に利用可能であった分離株数が多い血清型で性能向上が見られた。特に、026 および 0111 については十分実用域に達していると考えられた。各血清型の分離株によるスクリーニングを追加し、検出 ORF セットの調整を行うことでさらなる菌株識別能力向上の可能性もある。一方、0121 については ORF 保有パターンの多様性が乏しく、POT 法によるタイピングは困難と考えられる。また、091 は Simpson's index の数値は高くなったが、EHEC-POT 法の対象菌群から外れている可能性がある。

国立感染症研究所から分与された EHEC の DNA を用いた検討を進めており、その結果も踏まえ最終的な検出 ORF セットを決定することで実用的な手法になると期待される。

E. 結論

H30 年度までの検討によって、実用性の向上した EHEC-POT 法が完成しつつある。分離株を用いた調整を加えることで血清型汎用的に使える POT 法とすることができる。

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
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 |

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 30 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・主任研究官）
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・主任研究官）
研究協力者	土橋 酉紀	（国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官）
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）
研究協力者	高原 理	（国立感染症研究所感染症疫学センター・非常勤職員）
研究協力者	神谷 元	（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、データの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としている。本年度は、前年に作成した MLVA-NESID データ突合プログラムの実行と改良を行った。2018 年のデータでは、約 34%（352/992 件）において目視による確認と手動突合（候補の中から選択）が必要となり、この作業を効率的に行うためのウェブインターフェースを作成した。突合したデータの活用法については引き続き検討が必要である。また、前年度に開発した広域散发事例探知システムをシーズンを通して稼働させ、問題点の抽出と改善策の検討を行った。問題点のひとつとして、閾値を感度・迅速性を重視して設定したために偽陽性と思われるアラートが多く発生したことが挙げられる。また、探知したアラートが偽か真かの判断が困難であるため、本省や自治体向けのアラートが遅れる問題もあった。このため、感度・迅速性重視の閾値を内部関係者向けの注意喚起用に用い、もう一段階、本アラート用の閾値を設定することを検討した。これにより、内部関係者は迅速に探知してデータの解析とモニタリングをすることができ、外部向け本アラートにおいては、偽陽性アラートの低減が期待できる。今後も、広域散发事例の早期探知に向けた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。さらに、長期的な視点から、実際の広域事例の発生要因の調査について、食材そのものを管理する農林部局との連携が欠かせないことが考えられる。具体的に、食品衛生分野における HACCP との連携、農業分野における GAP との連携について、システムを幅広く含めていくための必要な情報を国内外から収集し、実装するシステムの一部具体的に反映させていくことを検討する。

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）を連携させるシステムの開

発を行う。本年度は、前年に作成した MLVA-NESID 突合システムを年間を通して稼働させ、より効率良く突合を行えるようにシステムの改良を試みる。

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、より早期に広域散发事例の疑いを探知することを目的として、過去の報告数データとの比較から自動でアラートを発出するシステムの開発を行う。広域散发疑い事例の早期探知

と、探知後の継続的なモニタリングを行うシステムを構築し活用することで、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。本年度は、前年に開発したシステムを試験的に運用し、問題点の抽出と改善策の検討を行うこととした。また、探知後の情報提供を迅速にするため、データ解析の自動化、効率化も重要な課題であるため、解析や作図等を自動化するエクセルツールの開発を試みた。

実際の事例への適用についても一部行い、広域事例の探知、分析、さらには感染源の探索について活動を行った。

B. 研究方法

(A) MLVA データと NESID データの連携

MLVA データと NESID データの突合アルゴリズムは、表 1 に示す項目 (1) ~ (5) について、全ての項目の合致条件を満たすものが NESID データの中に存在し、かつそれがひとつに絞られるとき、そのデータを機械的に突合せた。条件を全て満たすものが複数ある場合は、備考欄の記載内容等を活用して、目視によりその中から選択することとした。条件を全て満たすものがひとつもない場合は、合致する項目が多い順に候補のデータを出し (最大 10 例)、その中から目視により選択することとした。MLVA データにおいて、住所、年齢、性別のデータが欠損している場合は、NESID データの絞り込みができないため、突合不可能とした。

表 1 MLVA、NESID データの突合項目と合致条件

分類	MLVA データ項目	NESID データ項目	備考
(1) 住所	「患者等の住所(都道府県)」 「患者等の住所(市、郡、町村)」	「当該者住所」or 「上記病院・診療所の所在地」	・必須(記載がない場合はNG) ・市町村は、MLVA データの文字列が NESID データに含まれていないば一致とみなす
(2) 年齢	「年齢」	「診断時の年齢」	・必須(記載がない場合はNG) ・MLVA データの年齢表記に対応 n (歳) 代 $n-1 \sim n+1$ n 歳未満 $= 0 \sim n-1$ n か(ケケ)月 $= 0$ を一致とみなす
(3) 性別	「患者性別」	「性別」	・必須(記載がない場合はNG) ・MLVA データの性別表記に対応 M(半角/全角)→男 F(半角/全角)→女
(4) 発症日	「発症日」	「発病年月日」	・記載がある場合のみチェック ・7日以内のスレは許容する
(5) O 血清型	「送付書の O-H」 「感染源 O-H」 「157/111/26」 「Other」	「O(入力値)」	・記載がある場合のみチェック

これらの作業を効率的に行えるように、自動突合の実行、候補の表示、候補の中からの選択を簡単にできるウェブツールを作成した。「症状」、「備考欄」の自由記載データ等、候補からの選択の際に参考になるデータを同時に出力するように工夫した。

2018 年 5~10 月の期間に、概ね週に一度のペースで、突合システムを用いて MLVA データと NESID データの突合を行った。

(B) NESID データを用いた広域散発事例の早期探知

前年度に開発した広域散発事例探知システム

を、シーズンを通して稼働させ、問題点の抽出と改善策の検討を行った。過去 (2012-2016 年) のイベント数りの平均値をベースラインとし、感度と迅速性を重視して、アラートの閾値を平均 + 1 SD に設定した。ただし、患者数が 10 例未満の場合はアラートを出さないようにした。2018 年のデータは、自動クラスタリングにより家族内感染クラスタ、同一保健所から報告された 10 例以上の集積による症例数増加の影響を取り除いた後に、ベースライン及び閾値との比較を行った。アラート検知後は、目視によるモニタリングを行った。

また、検知後の速やかな状況把握と情報提供のために、集計や作図の作業の効率化を目的として、エクセル VBA を用いて、自動集計・作図ツールの開発を行った。

(C) 実際の事例への対応について

(B) において開発したツールにより、某自治体を中心とする実際の事例を探知し、公衆衛生上の対応を行った。

(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

(A) MLVA データと NESID データの連携

2018 年 5~10 月の MLVA データ (自治体による NESID-ID の記載がなかった 992 件) のうち、自動で突合できたものは 650 件 (約 66%) であった。残りの 352 件のうち、備考欄や症状等のデータを参考にして手動で突合ができたものが 149 件、データ不足により突合不可能であったものが 193 件であった。

(B) NESID データを用いた広域散発事例の早期探知

アラートは 2018 年の 1 年間で 16 回検知された。その内訳は、026・VT1 (6)、0157・VT1VT2 (4)、0157・VT2 (4)、0103・VT1 (1)、0121・VT1 (1) であった (括弧内は検知回数)。

(C) 実際の事例への対応について

2018 年 8 月 (第 35 週) に某自治体を中心とする 0157VT2 散発例 (イベント数) の増加を、システムが探知した。自治体による事例探知時点で、可能性のある食材の収去等がなされていない。自治体とのやり取りを行い、症例定義を設定し記述疫学を実施した。本事例の詳細については

自治体による詳細な情報の公表、及び食中毒としての行政対応が行われていないことから詳細については触れない。記述疫学に加え、患者の所有していた購入食料品に関する電子情報等から喫食と発症の関連について解析疫学を実施し、特定の野菜について関連の可能性を見出した。遡り調査の結果は特定の産地の可能性を示唆するものであった。産地の可能性を示唆された自治体の農業関連組織を訪問し、当該野菜の栽培・収穫・流通等に関する情報を収集した。肥料の使用方法等を含め、野菜そのものが汚染された可能性は極めて低いものの、井戸水等の使用については情報がなかった。また、流通時のコールドチェーンや意図しない長期保存の問題等が残った。

D. 考察

(A) MLVA データと NESID データの連携

MLVA データと NESID データの自動突合、及び手動突合（候補の中から選択）を効率的におこなえる Web ベースのシステムを開発した。MLVA データにおける NESID-ID 記載率は 2018 年 6 月以降に大きく上昇したものの、2018 年シーズン後半（9、10 月）においても 70%程度であったことから、今後も NESID-ID 未記載の MLVA データが一定数存在することが想定される。今回開発した MLVA-NESID 突合システムは、今後もこれらのデータの突合のために活用できる。また、あらかじめ記入されていた NESID-ID の記載ミスの発見のために利用することも可能である。

MLVA データと NESID データの紐づけができるようになり、連携されたデータの効果的な活用方法の検討が今後の重要な課題のひとつである。

(B) NESID データを用いた広域散発事例の早期探知

本システムの問題点として以下の点があげられる。

- 1) 自動クラスタリングではクラスタ化できない集団発生クラスタが存在し、クラスタリング後件数が過大評価となる
- 2) 感度と迅速性の観点から閾値を低めに設定しているため、偽陽性と思われるアラートが多数発生する
- 3) アラート検知後は目視によるモニタリングを行うが、誤検知であるかどうかの判断は難しく、基準を設けていないために判断の迷いから自治体等への情報提供に遅れが生じる可能性がある

1)は、目視確認時に症例間に明らかな関連が見

られた場合は、それらを手動でクラスタリングし、その後再評価できるようにシステムを改良する。

2)及び3)を克服するために、感度・迅速性重視の閾値を内部関係者向けの注意喚起用に用い、これとは別に、本アラート用の閾値を設定することを検討する必要がある。これにより、内部関係者は迅速に探知してデータの解析とモニタリングをすることができ、外部向け本アラートにおいては、偽陽性の低減が期待できる。表 2 は、本アラートの閾値を +2SD 以上 もしくは 二週連続で +1SD 以上とした場合の、本アラートの検知回数である。2019 年は、この新たな基準を用いて広域散発事例疑いの自動探知とアラート発出を試みる。

表 2 血清型・毒素型別アラート検知回数

		チーム内注意喚起 (> +1SDかつ症 例数(無症候含む) 10件以上)	本省への情報提供 (チーム内アラート 後、+2SD以上も しくは二週連続で+ 1SD以上)
O157	VT1VT2	4	2
O157	VT2	4	3
O26	VT1	6	0
O103	VT1	1	0
O121	VT1	1	1
合計		16	6

(C) 実際の事例への対応について

開発したシステムによる重要な広域の可能性の高い事例を探知する試みは有効に機能したと考えられた。ただし、従来通りの制約、すなわち、疫学的な分析結果では原因として断定するには至らず、自治体による初動時点での関連する可能性のある食材を如何に迅速に確保出来るかということが必要であることが分かった。さらに、食材（特に野菜）が汚染されるプロセスを知り、原因究明と対応改善につなげるためには、野菜の衛生管理指針の理解に基づく中長期的な連携関係の構築が必要であると考えられる。

E. 結論

本分担グループでは、患者（NESID）データと菌株（MLVA）データの連携とその活用、広域散発事例の早期探知と継続的なモニタリングを行うためのシステムの構築を目的とし、本年度は、（1）MLVA-NESID データ突合システムの改良、（2）広域散発事例探知システムの問題点の抽出と改善策の検討、（3）自動集計・作図ツールの開発、を主に行った。今後も、継続的にこれらの

システムの評価と改良を行う。また、長期的な視点から、実際の広域事例の発生要因の調査について、食材そのものを管理する農林部局との連携が欠かせないことが考えられる。具体的に、食品衛生分野における HACCP との連携、農業分野における GAP との連携について、システムを幅広く含めていくための必要な情報を国内外から収集し、実装するシステムに一部具体的に反映させていくことを検討する。また、実際の事例を通じた改善も重要であり、積極的に対応していく。

【参考文献】

- 1) 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 該当なし

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
大西 真	反復配列多型解析 - Multilocus Variable -Number Tandem Repe at 法	食品衛生研 究	69	7-15	2019

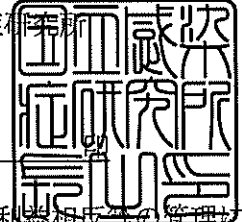
平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 細菌第一部 部長
(氏名・フリガナ) 大西 真・オオニシ マコト

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

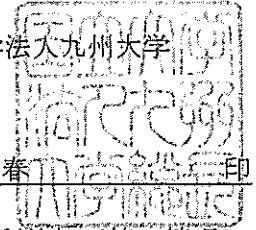
6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人九州大学
 所属研究機関長 職名 総長
 氏名 久保 千春



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 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
- 研究者名 （所属部局・職名）大学院医学研究院・教授
（氏名・フリガナ）林 哲也（ハヤシ テツヤ）

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし、一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容：)

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

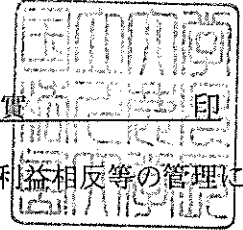
年 月 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人鹿児島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 前田 芳實



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医歯学総合研究科・講師
(氏名・フリガナ) 大岡 唯祐・オオオカタダスケ
4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

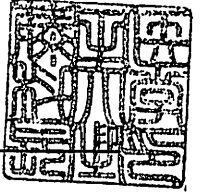
平成31年3月7日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 藤田医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 星長 清隆



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 藤田医科大学医学部 准教授
(氏名・フリガナ) 鈴木 匡弘 (スズキ マサヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

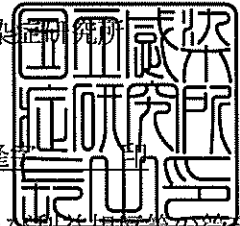
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
所属研究機関長 職名 所長
氏名 脇田 隆



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 感染症疫学センター・室長
(氏名・フリガナ) 砂川 富正 (スナガワ トミマサ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。