

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）

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

令和2年（2020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
令和元年度 総括・研究分担報告書

目次

I. 令和元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. 令和元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 8
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 11
3. 迅速化に向けた簡易法の開発-2（EHEC-POT 法）
研究分担者 鈴木 匡弘 藤田医科大学医学部微生物学講座 24
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 28

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 of the 現場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 of the 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 クラスター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

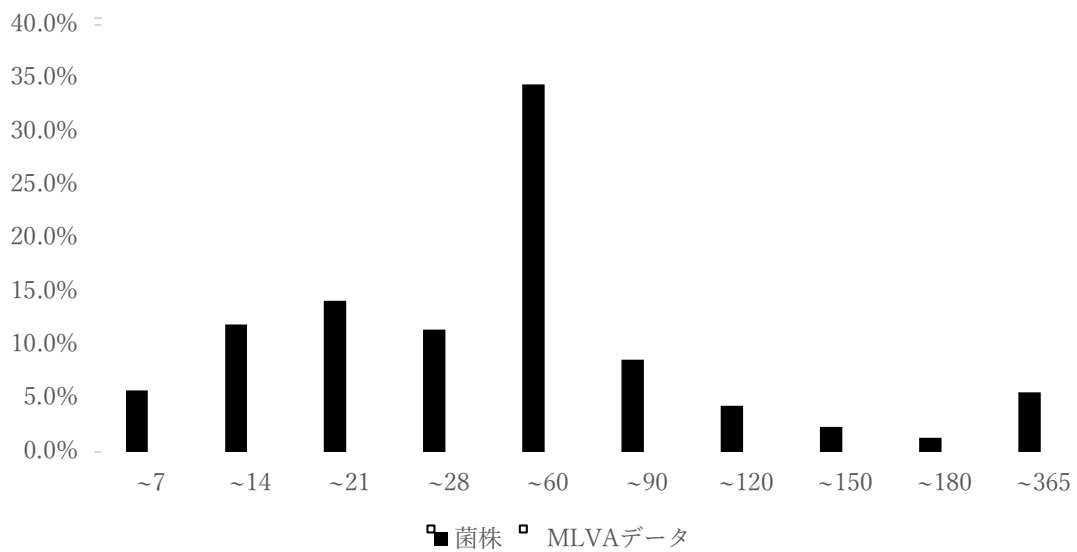
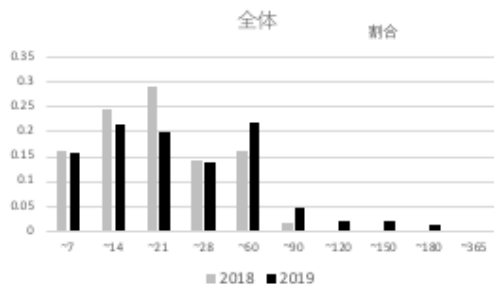
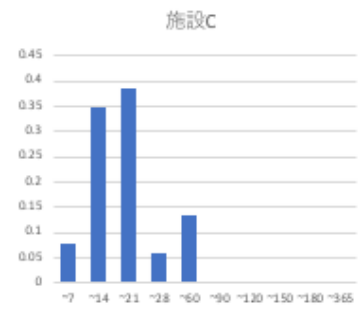
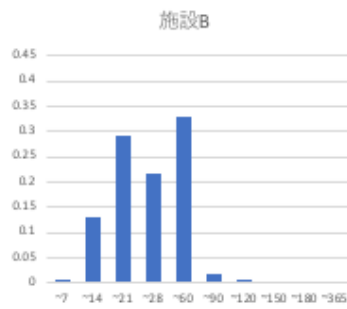
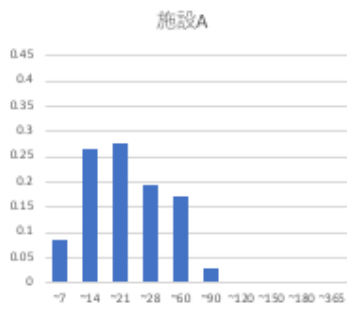


図2 MLVAデータの感染研送付までの日数の分布



	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



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）
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、施設間での比較も容易なデータを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（地衛研）で広く使用されているが、O157 と O26 のみに適用可能である。そこで本研究では、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 についてはプロトタイプを作成し、プライマーセットと陽性コントロールを各地の地衛研に配布して現場での試用を依頼した（プロトタイプの検証）。その結果、いくつかの問題点が浮上したのでその改善に取り組んだ。また、昨年度開発した、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において使用していた ISMapper には判定精度の問題が認められたため、東工大・伊藤研究室と共同で、IS 挿入状況を高精度に判定することのできる解析プログラムを開発し、パイプライン全体の精度を向上させた。さらに最終的な IS-P システムを、26 部位を標的とする 2 チューブのマルチプレックス PCR とすることに変更し、分離解像度の向上を目指した。改良した解析パイプラインを用いて IS-P_O121 と IS-P_O103 の 26 箇所の標的部位を選定し、プライマーセットを作成した。プライマーセットの最終的な最適化と陽性コントロールの追加作成が残っているが、2 つの IS-P システムがほぼ完成できたといえる。

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、目的に応じて複数の方法が組み合わせて利用されている。IS-printing (IS-P) 法は、我々の研究室が独自に開発したゲノム情報を利用した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が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、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である。しかし、O157 と O26 のみに IS-P 法は適用可能であり、対象を拡大することが望まれる。そこで本分担研究では、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

昨年度までの O121 および O103 の系統解析と IS 挿入状況の網羅的解析によって、IS-P_O121 については IS600 と IS629 を、IS-P_O103 について

は IS629 を標的 IS として決定した。また、IS-P_O121 のプロトタイプを構築し、プライマーセット、プロトコル、陽性コントロールを作成した。これらを踏まえて、以下の開発研究を進めた。

1. IS-P_O121 プロトタイプの検証

作成したプライマーセット、プロトコル、陽性コントロールを、各地の地衛研に配布し、実際の菌株を対象とした検証を依頼した。その結果を基に、作成パイプラインの見直しや標的部位数の変更含む種々の改良作業を行なった。

2. IS-P 作成パイプラインの改良

(1) IS 挿入状況解析プログラムの開発

IS の挿入状況については ISMapper を用いて網羅的に解析していた。しかし、実際の PCR での判定結果との間に差異があるということ等が判明したため、より精度の高い解析プログラムの開発を行った。

(2) 解析パイプラインの変更

IS 解析プログラムの変更と標的部位数の変更に伴い、昨年度に構築した解析パイプラインを変更した。

(3) 検定使用株の最適化

IS-P 開発に使用してきた菌株の中には非常に近縁の株が含まれており、解像度の検定に問題があること判明したため、近縁菌株を除外して使用菌株を最適化した。

3. IS-P_O121 と IS-P_O103 の標的部位の選定と最終的な IS-P システムの作成

上記のパイプラインを用いてマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。

(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. IS-P_O121 プロトタイプの検証

IS-P_O121 プロトタイプ (15 箇所の IS-P 標的部位に対するプライマーセット、プロトコル、陽性コントロール) を、近年 O121 が分離された地衛研に配布し、現場での検証を依頼した。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。

(1) 判定ができなかった事例

5 事例 (7 株) ではバンドが得られなかった。これまでの解析で、O121 のマイナー系統に属する株には IS600 と IS62 が存在しないことから、これらの株はマイナー系統に属する可能性が高いと判断される。

(2) 集団感染事例における検証結果

残りの 92 事例のうち、31 事例が集団感染事例であり、そのうち 16 事例では事例内でバンドパターンが一致した。残りの事例では同一事例内でバンドパターンが一致せず、特に 7 事例では、15 箇所の標的部位の中の特定の 1 箇所の判定結果が異なることが不一致の原因であった。この部位については、培養中に挿入されている IS が脱落することが我々の別研究で確認されたため、IS-P の標的部位としては不適切と判定した。

(3) 分離解像度の検討

各地衛研で解析された 92 事例での IS-P による型別パターンは 62 パターンであり、想定よりもやや低い分離解像度であった。また、IS-P_O121 のプロトタイプ作成に使用した 79 株から抽出した DNA を使って実際の PCR 解析を行い、ISMMapper の結果と比較したところ、結果が異なる挿入部位を多数認め、ISMMapper の判定精度に問題があることが判明した。

(4) 分離結果の判定

非特異バンドのためにバンドパターンの判定で問題が生じた例が多数報告された。これは、IS-P_O121 では IS600 と IS629 を 1 チューブで同

時に反応させていることが影響していると考えられた。また、バンドが非常に薄くなる標的部位があることや、バンドの間隔が狭いために判定が難しくなっている例も確認された。

2. ISprinting システムとその開発パイプラインの改善

(1) 挿入部位選定に使用するプログラムの開発

ISMMapper の判定精度には問題があることが判明ため、類似のプログラムである ISseeker を用いてみたが、ISMMapper と同様かそれ以下の結果であった。そこで、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) を開発した。ISMMapper、IShunter、PCR の結果を比較して精度評価を行ったところ、IShunter は ISMapper と比べて偽陽性・偽陰性判定が少なく、IS-P 開発に適していることが確認できたため、標的部位選定に使用する解析プログラムを IShunter に変更することとした。

(2) 分離解像度の向上に向けたシステムの改善

プロトタイプで試行結果を踏まえて、IShunter に変更したパイプラインを使用し、改めて 15 箇所の挿入部位を選定したところ、十分な分離解像度を得ることができないということが判明した。そこで、分離解像度を向上させるために標的となる挿入部位の数を増やすことにした。また、プロトタイプ検証で明らかとなった非特異バンドの出現やバンド間隔の狭さといった問題点も踏まえて、IS-P_O121 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_O103 でも、IS-P_O121 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。

(3) 検定使用株の最適化

O121 については主要系統に含まれる 79 株、O103 については 73 株を使用して IS-P システムの開発を進めていたが、系統解析の結果から、SNP 距離が非常に小さい株 (非常に近縁の株) が複数含まれていることが判明した。これらの株では IS の挿入状況も類似していると推定されるため、解像度の判定に影響を及ぼす。そこで、SNP 距離が 10 以下となる株をクラスタリングし、同一クラスターから一株だけを代表株として使用することとした。その結果、O121 は 61 株、O103 は 63 株を検定に使用することになった。

3. IS-P_O121 最終版の開発

改良した開発用パイプラインを用いて、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。

4. IS-P_O103 最終版の開発

改良した開発用パイプラインを用いて、IS629 の 26 箇所を選定した。選定した挿入部位について、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になっている。

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、新型コロナウイルス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考えられる。

E. 結論

IS-P_O121 のプロトタイプ of 各地の地衛研で検証結果等を基に、開発用パイプラインを改善し、最終的なシステムとして、IS-P_O121 と IS-P_O103 のいずれについても、26 部位を標的とした 2 チューブのマルチプレックス PCR を作成した。現在、一部の陽性コントロールの作成が残っているが、作成が完了次第、各地の地衛研へ配布できる状況となり、本開発研究の目標である IS-P_O121 と IS-P_O103 はほぼ完成できたといえる。

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

1) 腸管出血性大腸菌 O121 : H19 の乳糖分解性に関与する遺伝因子の特定, 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, 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) 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, 中村佳司, 谷口愛樹, 西田留梨子, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 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

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）
令和元年度 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）
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所・上席専門員）
木全 恵子（富山県衛生研究所・副主幹研究員）
原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所・主任研究員）
若林 友騎（大阪健康安全基盤研究所・研究員）
西嶋 駿弥（大阪健康安全基盤研究所・研究員）
江藤 良樹（福岡県保健環境研究所・専門研究員）

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の重症合併症を発症するリスクの高い感染症であり、多数の集団感染事例を含めて毎年 3,500-4,000 例の報告されている。これまで様々な行政対応がなされてきたものの、原因や感染経路等が判明しないケースも多数存在する。毎年報告される血清型は O157 が中心であり、次いで O26, O103, O111 などの報告数が多いが、それ以外の血清型も増加している。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て昨年度までに作製した O111 IS-P 法プロトタイプを改良して最終的なプライマーセット（FS, RS ver.2 の 2 セット）を構築した。また、各標的領域の PCR 産物をプラスミドへクローニングし、PCR の陽性コントロール DNA として作製し、それらを用いた PCR 条件および PCR 産物の泳動条件の至適化を行った。プライマーセットと PCR 陽性コントロール DNA を協力機関に試用版として配布し、分離株および集団感染事例由来株を用いて、各機関の設備による有効性を検討した。

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

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

H29-30 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[標的部位、計 52 か所]）の構築が完了し

た。また、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 600 株のドラフトゲノム情報（イルミナ MiSeq データ）を基に行った高精度系統解析により選定した 206 株を用いてプロトタイプの検定を行い、菌株識別解像度が高くなる標的領域を選定し FS, RS ver.1 の 2 セット（標的部位、計 24 か所）を構築した。本年度は、菌株識別解像度の低い系統について解像度を上げるため、それらの系統に特異的に存在する IS629 挿入部位を標的部位としたプライマーを FS, RS プライマーセットに新たに追加した。

2) PCR および泳動条件の再至適化

PCR には KOD-Multi&EPI（東洋紡）を用い、PCR 反応液の組成は計 15 μ l（鋳型 DNA 1 μ l、外部プライマーミックス[各 5 μ M] 0.75 μ l、IS629 内部プライマー[50 μ M] 0.75 μ l、2 x PCR buffer 7.5 μ l、MilliQ 水 4.7 μ l、KOD-Multi&EPI 酵素 0.3 μ l）、PCR プログラムは 94°C 2min、30 サイクル（98°C 10 秒、58°C 30 秒、68°C 1 分）で PCR 機器として Biometra 社の T-professional を用いて行った。菌株からの鋳型 DNA 調整は、アルカリボイル法を用いた。電気泳動は 1.5-3.0 % の濃度で Agarose S（ニッポンジーン）in 0.5 x TBE バッファーおよび NuSieve™ 3:1 アガロース in 0.5 x TBE バッファーを用い泳動機器として MyRun を使用し、PCR 反応液 1 μ l を泳動するという条件で実施した。

3) PCR コントロール DNA の作製と精度管理

項目 1) で作製した ver.2 プライマーセットに用いた各標的領域（計 24 領域）について、各標的部位の外部プライマーと IS629 内部プライマーを用いて KOD-Multi&EPI 酵素で PCR 増幅し、PCR purification kit（Qiagen）で精製した。DNA Ligation Kit（Mighty Mix; Takara）を用いて T-vector pMD20 プラスミド（Takara）へクローニングし、コンピテントセル DH5 α （Takara）へ形質転換した。形質転換された株から各標的領域を含むプラスミドをそれぞれ QIAprep Spin Miniprep kit（Qiagen）を用いて精製した。精製したプラスミド DNA を鋳型として当該プライマーペアによる PCR 増幅を行い、標的サイズの PCR 増幅産物が得られることを確認した。

4) 協力機関へのプライマーセットおよびコントロール DNA の配布

項目 1) および項目 3) で作製した O111 IS-P 法プライマーセット（FS ver.2, RS ver.2 の 2 セット）と PCR コントロール DNA を協力機関である富山県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、福岡県保健環境研究所の 3 機関へ送付し、実際に分離株（異なる事例由来株および集団感染事例由来株）を用いて、個々の機関が使用している PCR 機器や泳動機器を用いて検討し、機器の違いによる増幅効率や泳動像の差異を検証した。

（倫理面への配慮）

該当しない。

C. 研究結果

1) O111 IS-P 法プロトタイプからのプライマー選別および改良

前年度に構築した FS1-3 について、解像度が高くなるよう選定した 12 か所の標的 IS 挿入部位のうち 2 か所については、ver.1 プライマーセットにおいて PCR 増幅サイズが類似しているため、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2 か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。RS1-3 についても、FS1-3 と同様、ver.1 プライマーセットにおいて PCR 増幅サイズが類似しているため、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2 か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。

FS, RS の ver.1 プライマーセットについて、前年度に 200 株のドラフトゲノム情報を基に菌株識別解像度の向上に繋がる株および系統特異的な IS629 挿入部位について、全ゲノム配列決定株 11128 株のゲノム情報から推定される挿入部位周辺にプライマーを設計し、挿入部位の配列を決定した。そのうち、特に菌株識別解像度の向上に繋がる 4 領域を選定した。前述の FS, RS ver.1 プライマーセットにおいて除去したプライマーの PCR 増幅バンドサイズと入れ替える形で新たに 4 領域を検出可能なプライマーを設計し、それらを加えたものを FS, RS ver.2 プライマーセットとした。また、この 2 プライマーセットを用いて系統の離れた 206 株について解析を行った

結果、113パターンに分かれる(図1)ことを確認した。

2) PCR および泳動条件の再至適化

項目1)でプライマーの入れ替えを行ったことにより、PCR および PCR 増幅産物の電気泳動の条件を再検討した。PCR 条件については、前年度に構築した至適条件で問題なく機能したが、電気泳動条件については、1.5-3.0%のゲル濃度で検討を行い、MyRun による電気泳動では1.5%で最も明確な泳動像が得られることが明らかとなった(図2)。

3) PCR コントロール DNA の作製

項目1)で作製したFS ver.2, RS ver.2 プライマーセットに含まれる計24か所のIS629挿入部位について、クローニングベクターpMD20へクローニング、精製した。標的部位のうち1か所は形質転換株の増殖効率が悪かったため、大量培養しPlasmid Midi kit (Qiagen)を用いて精製した。クローニング成否の確認は、各精製プラスミドについて標的部位を増幅したプライマーを用いて行ったが、いずれも単一バンドのみ検出されたことから、FS ver.2 および RS ver.2 のそれぞれの鋳型DNAとなるよう、各精製プラスミドを各20ng/μlになるよう混合した。

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

FS ver.2 および RS ver.2 プライマーセットを用い、協力3機関(A, B, C)において、臨床分離株とPCRコントロールDNAを用いたPCRおよび泳動に関する検討を実施した。
機関A：散発事例由来株10株および3つの集団感染事例由来株(事例①6株, 事例②6株, 事例③6株)の計28株(表3)を用いて検討した。Mupidを用いた泳動では、3%ゲルでバンドの識別が容易であることが分かった。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)のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2では5R(637bp)と9R(306bp)の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、全ての株で異なるバンドパターンが得られた(図3a)。また、集団感染由来株では3事例ともに同一バンドが検出された(図3b)。
機関B：散発事例由来株12株および集団感染事例由来3株の計15株(表4)を用いて検討した。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)のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2では5R(637bp)と9R(306bp)の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3株が同じバンドパターンであったが残り異なるパターンとなった(図4a)。また、集団感染由来株では3事例ともに同一バンドが検出された(図4a)。また、Mupidを用いた泳動では3%ゲルでバンドの識別が容易であった(図4a, b)。

機関C：散発事例由来株21株および8つの集団感染事例由来株(8事例, 計25株)の計46株(表5)を用いて検討した。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。また、RS ver.2では5R(637bp)と9R(306bp)の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3組計8株が同じバンドパターンを示し、バンドが検出されない株も2株(O111であることを確認済み)存在した(図5a, 表4)。また、集団感染由来株では8事例ともに同一バンドが検出された(図5b, 表4)。またMupid-exU(Mupid)を用いた泳動では1.5%で良好な結果が得られた。

マイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いた機関Bによる検討：通常のゲル電気泳動と同様、FS ver.2では4F(644bp)と5F(620bp)、RS ver.2では1NR(986bp)と2NR(887bp)、6R(502bp)と7R(475bp)のバンドがそれぞれ判別しにくいことが明らかになった(図6)。しかしながら、RS ver.2の6R(502bp)と7R(475bp)については、菌株により判別できる場合もあり、株間でIS挿入部位に多様性がある可能性が示唆された(図7)。

D. 考察

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。

E. 結論

O111 IS-P 法プロトタイプを改良し、FS ver.2 RS ver.2 の 2 プライマーセットを構築した。菌株識別解像度は 206 株を 113 パターンに分類するにとどまったが、同じパターンを示す株がゲノム高精度系統解析で比較的近縁の株であること、また、3 つの協力機関で実施した試用により、本システムが集団感染検出および菌株識別能において有用である可能性が示唆された。

しかしながら、使用する機器の違い等により条件を検討する必要があるなど、改良の余地があることも明らかとなった。今後、プライマーセットや PCR コントロール DNA の微修正と条件の再至適化を行い、最終的に検査現場で利用可能な O111 IS-P 法を完成するとともに研究成果を学術論文として公表する予定である。

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

表 1 FS ver.2, RS ver.2 プライマー情報

FS ver.2

	primer name	primer_F	length	Tm	product size	
IS629 outside primer F	1NF	TAG	G	19	60	896
	2NF	GAG	AG	20	60	803
	3F	GCG	G	19	58	711
	4F	CTG	GAG	20	62	644
	5F	ACG	C	19	62	620
	6F	CCG	G	19	58	531
	7F	GCG	C	19	58	485
	8F	GCG	TG	20	62	387
	9F	ATG	C	19	62	312
	10F	GAG	TG	21	60	272
	11F	GCG	C	21	60	234
	12F	GAG	GCC	21	62	201
IS629 inside primer R	IS629IN-R2	CTCAGGGAGTTTAGTCTCCAGG	22	66	-	

RS ver.2

	primer name	primer_R	length	Tm	product size	
IS629 outside primer R	1NR	GTC	C	19	62	986
	2NR	CCG	CAAG	22	60	887
	3R	TCC	A	19	58	776
	4R	CAG	CA	20	60	711
	5R	ATG	GC	20	58	637
	6R	GAG	CA	19	58	502
	7R	ACG	C	19	62	475
	8R	GAG	AC	19	62	364
	9R	TCC	CG	19	62	306
	10R	GAG	GC	19	60	274
	11R	CAG	G	19	58	236
	12R	CAG	A	20	60	198
IS629 inside primer F	IS629IN-F3	TCTGGCAGCCTGAGTTCACAG	22	66	-	

※NF, NR : Ver.2 で新たに追加した標的部位に対するプライマー

※プライマー配列については未発表データのため非公開

表 2 使用した PCR および電気泳動機器

	PCR機器	泳動機器
機関A	TaKaRa TP650 PCR Thermal Cycler Dice Standard	Mupid
機関B	TaKaRa TP350 PCR Thermal Cycler Dice Touch	Mupid
機関C	Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	Mupid-exU(Mupid)
鹿児島大	Biometra T-professional	MyRun

表3 機関Aの解析株情報

No.	菌株名	分離年	O	H	
S1	1581	1998	111	NM	
S2	2151	2002	111	NM	
S3	2320	2004	111	NM	
S4	2429	2005	111	28	
S5	3002	2008	111	NM	
S6	3041	2009	111	NM	
S7	3111	2010	111	NM	
S8	3497	2013	111	NM	
S9	3703	2015	111	NM	
S10	3713	2015	111	NM	
集団感染事例①	O1	1853	2000	111	NM
	O2	1882		111	NM
	O3	1883		111	NM
	O4	1884		111	NM
	O5	1885		111	NM
	O6	1886		111	NM
集団感染事例②	O7	2695	2006	111	NM
	O8	2701		111	NM
	O9	2702		111	NM
	O10	2703		111	NM
	O11	2704		111	NM
	O12	2705		111	NM
集団感染事例③	O13	3188	2011	111	NM
	O14	3190		111	NM
	O15	3192		111	NM
	O16	3195		111	NM
	O17	3196		111	NM
	O18	3197		111	NM

表4 機関Bの解析株情報 ●：同じバンドパターン

	菌株番号	分離年	O抗原型	H抗原型	Stx;RPLA	備考	
散発事例株	PV221	1997	111	NM[8]	1		
	11H461	1999	111	NM[8]	1		
	● 13H38	2001	111	UT[8]	1+2		
	14H163	2002	111	NM[8]	1+2		
	PV06-50	2006	111	NM[8]	1+2		
	PV07-37	2007	111	NM[8]	1		
	● PV07-55	2007	111	8	1		
	PV07-157	2007	111	UT[8]	1+2		
	● PV08-103	2008	111	NM[8]	1+2		
	PV12-41	2012	111	NM	1		
	PV13-59	2013	111	NM	1		
	PV14-37	2014	111	NM	1		
	集団感染事例	PV15-30	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
		PV15-31	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
PV15-32		2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族	

図1 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる 206 株による PCR 結果のデンドログラム
 206 株 2 プライマーセットによる結果から、113 パターンに分類された。

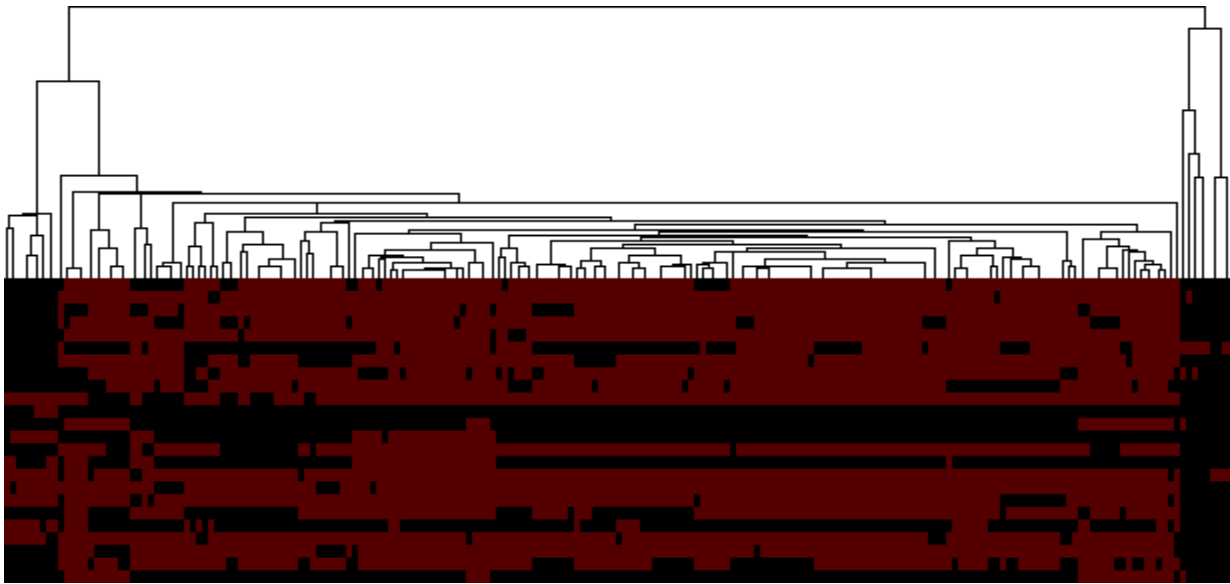
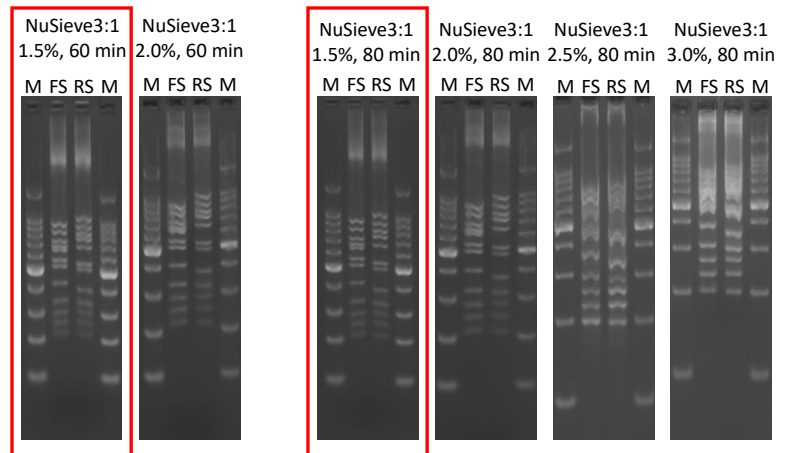


図2 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる PCR および泳動条件の検討

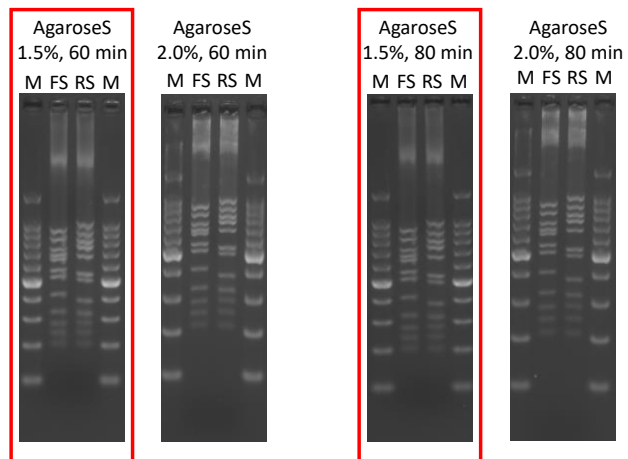
PCR 条件は昨年度と同様であり、全てのバンド (各 12 本) が検出された。また、MyRun による泳動結果から、NuSieve 3:1 および Agarose S のどちらにおいても、1.5%ゲルにおいてバンドの識別が容易であった。

NuSieve 3:1 (in 0.5 x TBE)

Marker (M): 100bp ladder



NipponGene Agarose S (in 0.5 x TBE)



【PCR反応液】 15μl scale

template DNA (positive control DNA)	1
primer F or R mix (各5 μM)	0.75
primer IS629Inside R or F (各50μM)	0.75
2 x PCR buffer	7.5
D.W.	4.7
KOD-Multi&EPI	0.3
total	15

【PCR program】 3 step

1. 94°C 2 min
2. 98°C 10 sec
3. 58°C 30 sec
4. 68°C 1 min [step2-4: 25 cycles]

※PCR機器: T-professional (Biometra)

【電気泳動】 濃度1.5-3.0 % in 0.5xTBE

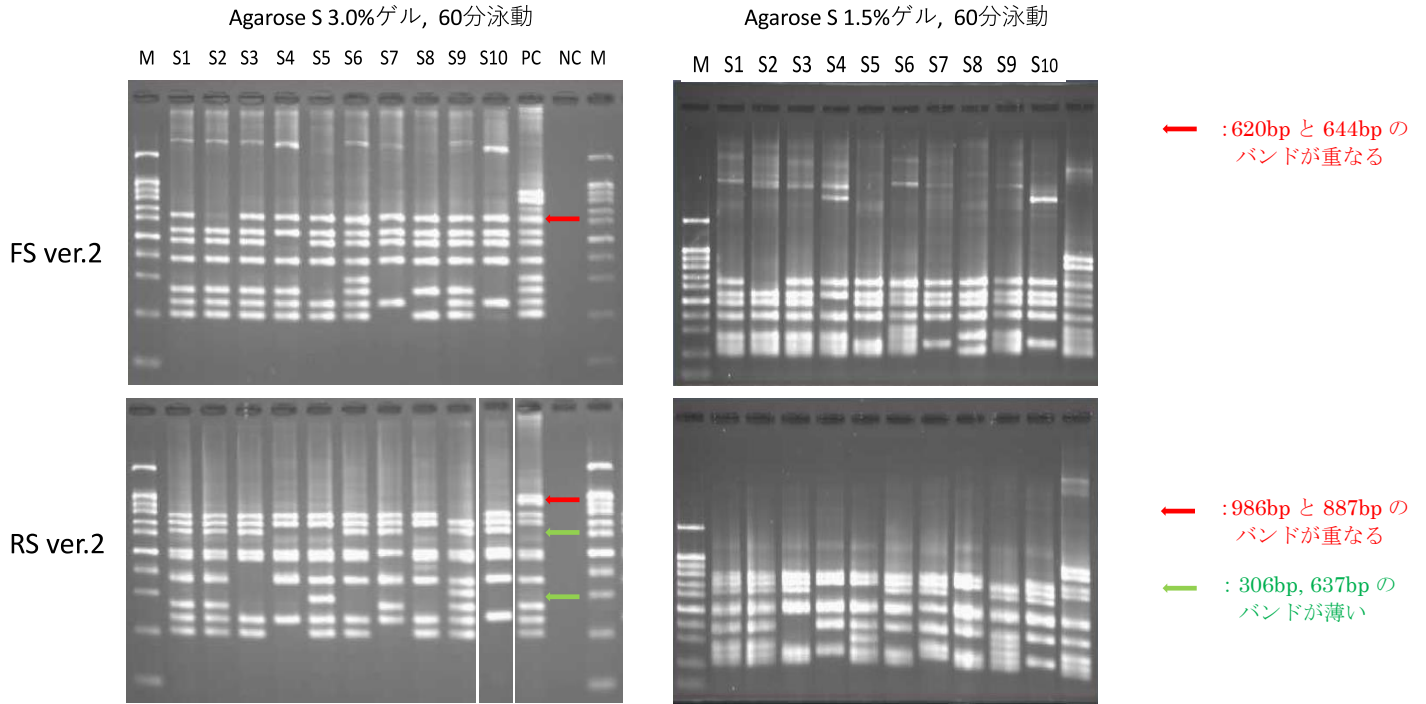
- ゲル: 1. NuSieve 3:1 (Lonza)
 2. Agarose S (Nippon Gene)

Marker: 100 bp ladder

※泳動機器: MyRun

図3 機関AのPCRおよび泳動結果

a) 散发事例株（10株）での ver.2 プライマーセットの検討：10株のデータから同じバンドパターンを示す株は見られなかった。また、ゲル濃度の比較から、Mupid を用いた場合、3%ゲルの解像度が比較的高いことが明らかとなった。



PCR機器: Takara Dice PT650
泳動機器: Mupid

b) 集団感染事例由来株（3事例, 各6株）での ver.2 プライマーセットの検討：3事例全てで集団感染事例株では同じバンドパターンを示した。

Agarose S 1.5%ゲル, 60分泳動

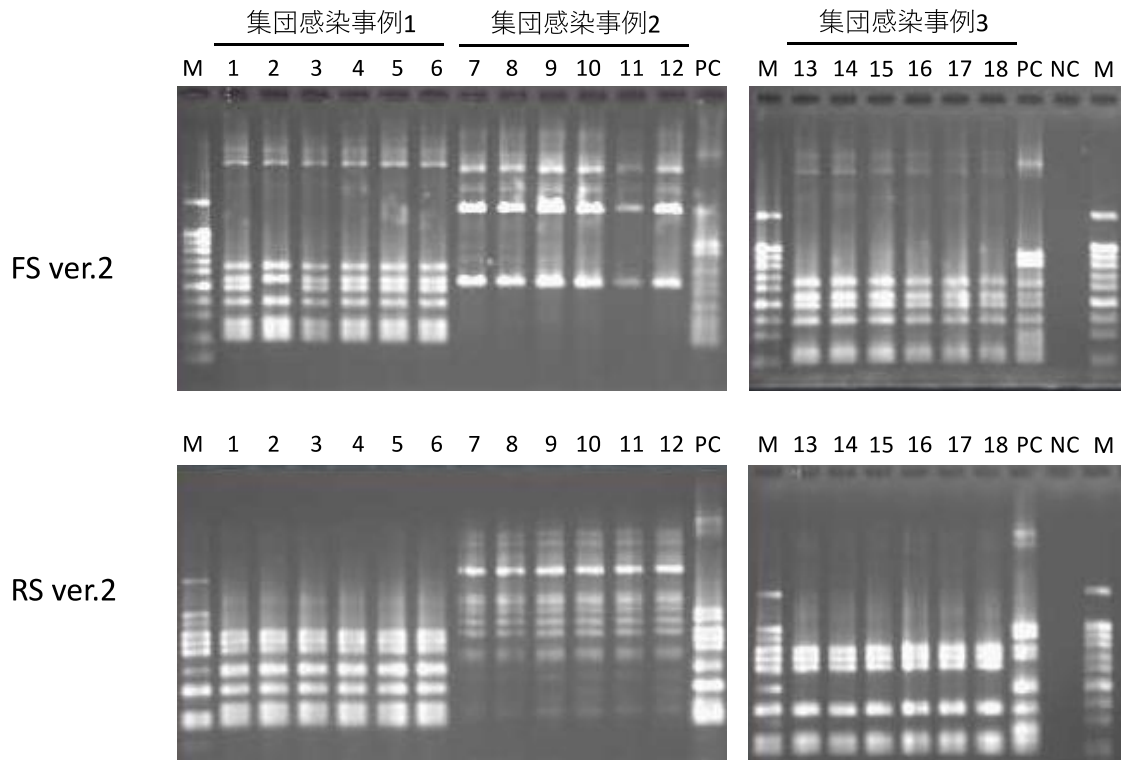
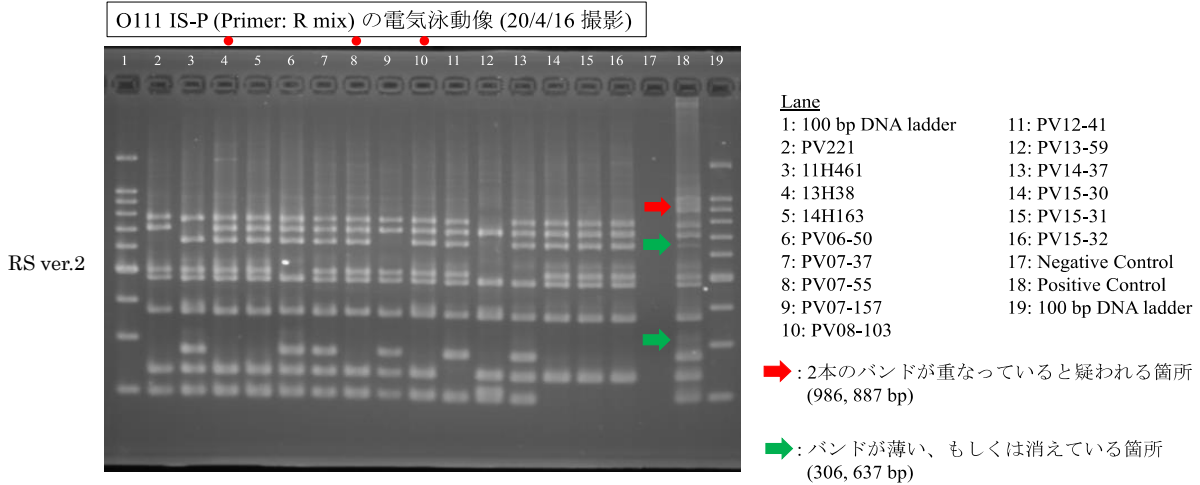
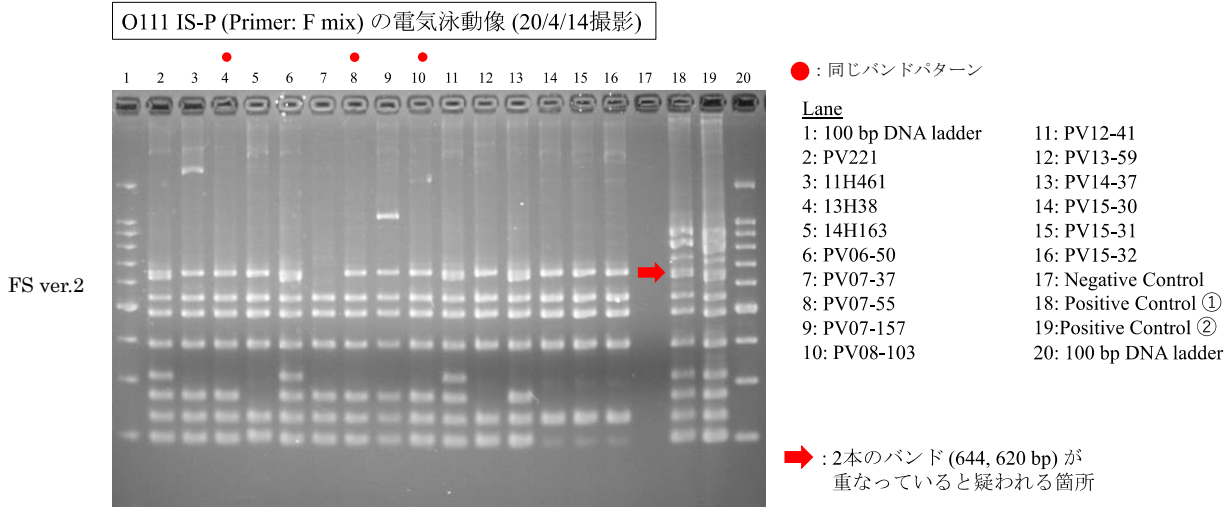


図4 機関BのPCRおよび泳動結果

- a) 散发事例株12株のうち、3株が同じバンドパターンを示した。また、集団感染由来株(3株)は同じバンドパターンを示した。



アガロース
 3%(NuSieveGTG:SeaKemGTG=2:1)
 泳動条件
 50V 45min + 100V 45min
 露光時間
 15s(FluorChem Q system使用)

泳動量
 Test sample 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)
 PC plasmid mix 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)
 100bp Ladder 3 μL

- b) 1.5%アガロースを用いた泳動結果: 3%と同条件の泳動では500bp以下のバンドが流れきってしまった。

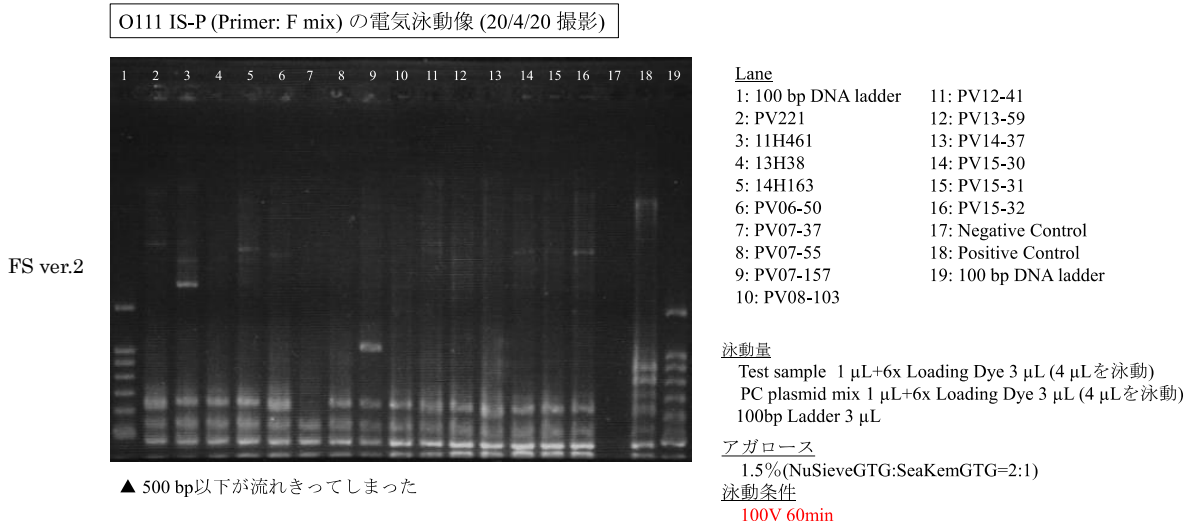
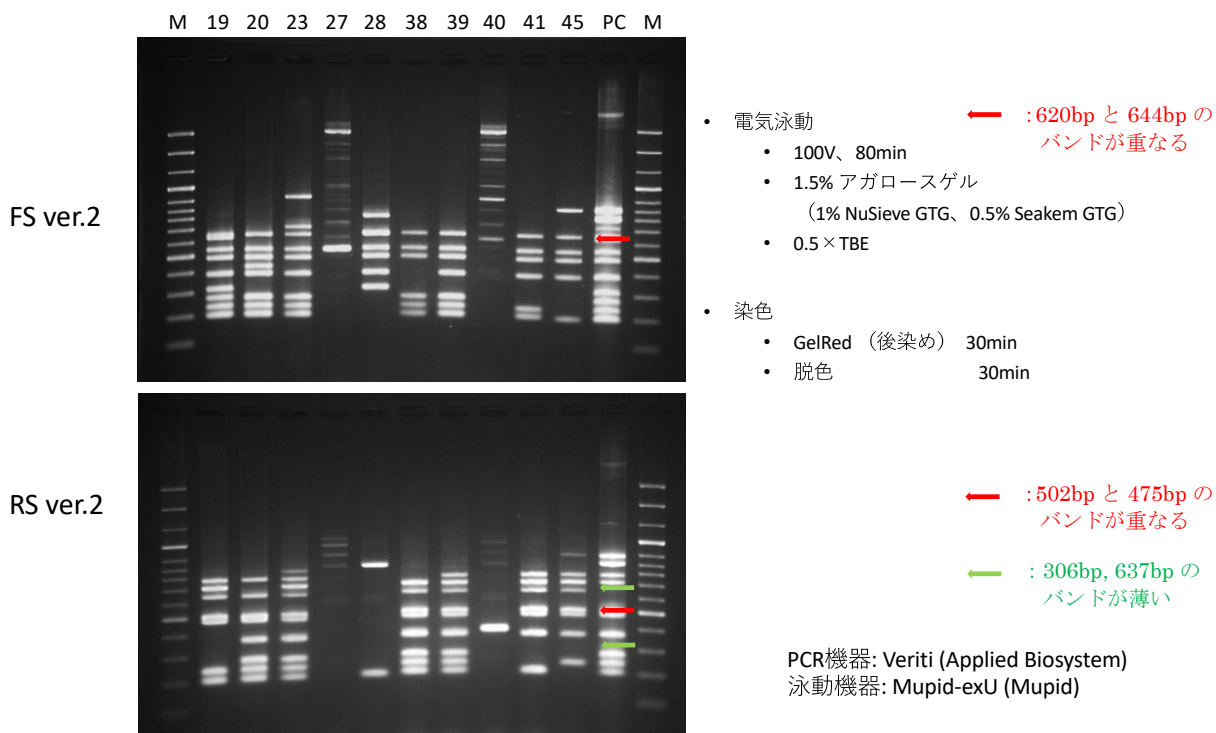


図5 機関CによるPCRおよび泳動結果

a) PCR結果の一部：1.5%ゲルで良好な泳動結果が得られた。



b) 集団感染由来株（事例②, 事例⑤）の結果

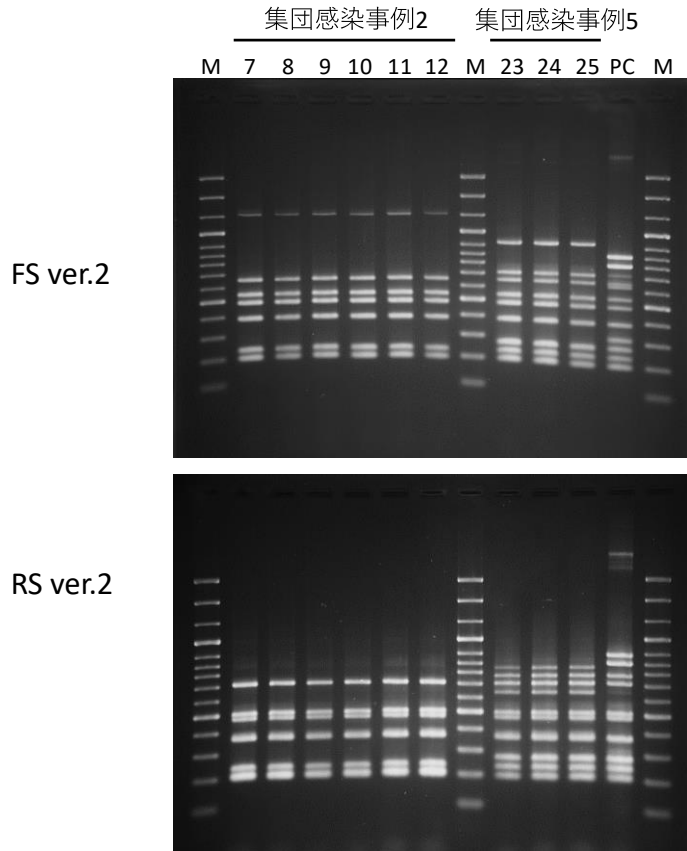
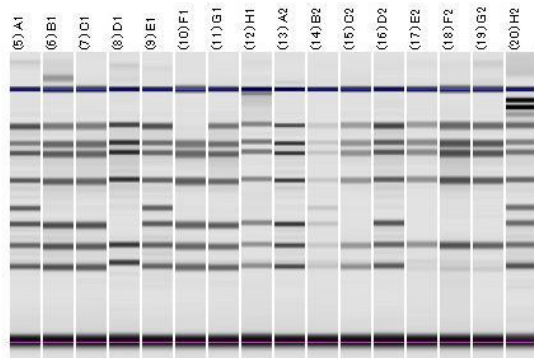


図6 機関BによるMultiNAを用いた解析結果1

O111 IS-printing system FS ver.2

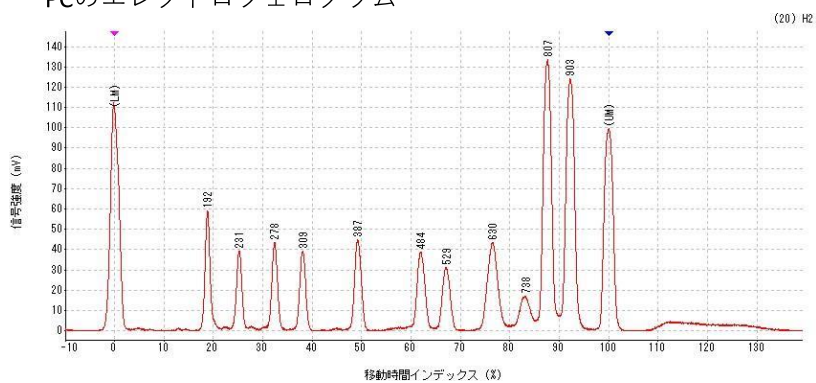
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- | | |
|--------------|--------------|
| A1: PV221 | A2: PV08-103 |
| B1: 11H461 | B2: PV12-41 |
| C1: 13H38 | C2: PV13-59 |
| D1: 14H163 | D2: PV14-37 |
| E1: PV06-50 | E2: PV15-30 |
| F1: PV07-37 | F2: PV15-31 |
| G1: PV07-55 | G2: PV15-32 |
| H1: PV07-157 | H2: PC |

PCのエレクトロフェログラム

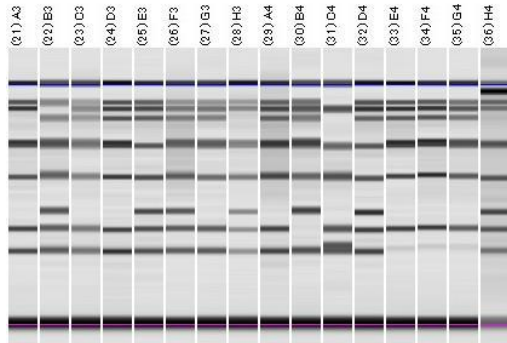


・ 644 bp と 620 bp のピークが重なっている

O111 IS-printing system RS ver.2

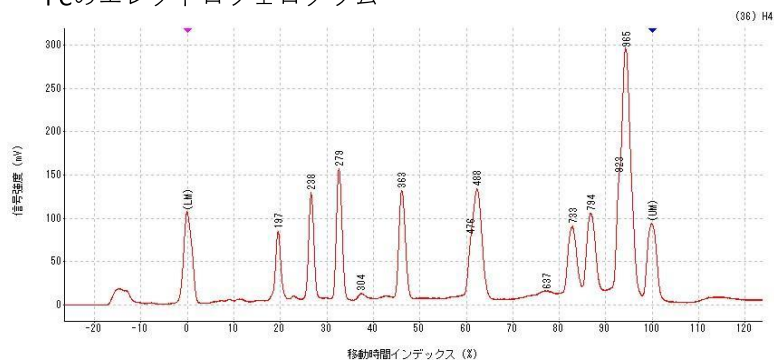
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- | | |
|--------------|--------------|
| A3: PV221 | A4: PV08-103 |
| B3: 11H461 | B4: PV12-41 |
| C3: 13H38 | C4: PV13-59 |
| D3: 14H163 | D4: PV14-37 |
| E3: PV06-50 | E4: PV15-30 |
| F3: PV07-37 | F4: PV15-31 |
| G3: PV07-55 | G4: PV15-32 |
| H3: PV07-157 | H4: PC |

PCのエレクトロフェログラム



・ 986 bp と 887 bp、502 bp と 475 bp のピークが重なっている

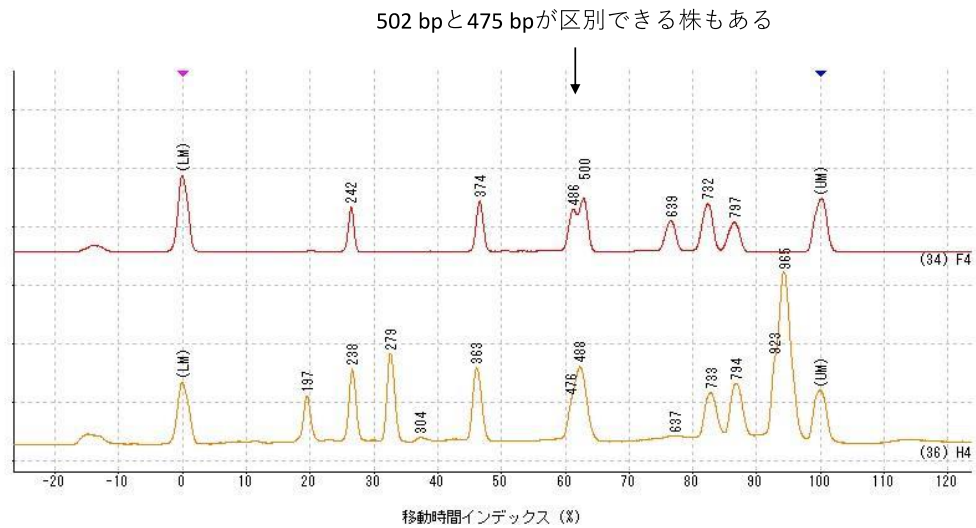
・ 637 bp と 306 bp のピーク弱い

図7 機関BによるMultiNAを用いた解析結果2

O111 IS-printing system RS ver.2

MultiNA DNA 1000 kit

PV15-31 (R mix)のエレクトロフェログラム



上段 F4: PV15-31

下段 H4: PC

令和元年度厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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）

迅速化に向けた簡易法の開発-2（EHEC-POT 法）

研究分担者 鈴木 匡弘 藤田医科大学医学部准教授
研究協力者

愛知県衛生研究所 生物学部 山田和弘
秋田県健康環境センター 保健衛生部 檜尾 拓子
東京都健康安全研究センター 微生物部 食品微生物科 小西 典子
千葉県環境保健研究所 健康科学課 吉原 純子
川崎市健康安全研究所 小嶋 由香
富山県衛生研究所 細菌部 木全 恵子
石川県保健環境センター 細菌・飲料水グループ 木村 恵梨子
福井県衛生環境研究センター 保健衛生部 東方 美保
岐阜県保健環境研究所 保健科学部 野田 万希子
岐阜市衛生試験所 微生物検査係 信田 充弘
三重県保健環境研究所 衛生研究室 微生物研究課 永井 佑樹
大阪健康安全基盤研究所 微生物部細菌課 梅川 奈央
神戸市環境保健研究所 感染症部 野本 竜平
島根県保健環境科学研究所 保健科学部 川瀬 遵
福岡県保健環境研究所 保健科学部 江藤 良樹

研究要旨

近年 O157 等主要な腸管出血性大腸菌（EHEC）に加え、O103 等かつては希であった血清型の EHEC による感染事例が増加し、分子疫学解析法を対応させる必要が生じた。従来の EHEC 分子疫学解析法は O157 等主要な血清型に特化しているため、他の血清型では菌株識別能が不足する傾向にあった。そこで O103 等 6 血清型のゲノムデータから、PCR-based ORF typing 法（POT 法）で検出する ORF を選択し、12-plex PCR 2 反応系からなる EHEC-POT 法を開発した。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 14 カ所の地方衛生研究所に POT 法のプライ

マーを配布し、性能評価を行った。全ての地方衛生研究所において、良好な PCR 反応と菌株識別能力が確認された。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、希な血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、食品を介して伝播することが多く、患者の発生が多地域にまたがることもある。このような diffuse outbreak においては分子疫学解析を行うことで発生を早期に捕捉し、対策を取ることが重要である。原因となる EHEC の血清型としては O157、O26、O111 が代表的なものであり、IS-printing や multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) が普及し、迅速な分子疫学解析が可能となっている。ところが近年、検出される EHEC の血清型として上記以外にも O91、O103、O121、O145、O165 等が増加し、従来の IS-printing や MLVA では菌株識別能力の不足傾向が見られた。そのため、分子疫学解析法を多様な血清型に対応させる必要が生じてきた。

本研究では菌株毎の ORF 保有パターンを multiplex-PCR で検出し、遺伝子型を決定する PCR-based ORF typing 法 (POT 法) を EHEC に対応させることを目的とした。POT 法はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌や緑膿菌等で実用化され、院内感染対策に利用されている分子疫学解析法である。マルチプレックス PCR による ORF の有無を検出する分子疫学解析法であることから、短時間で実施可能かつ遺伝子型の比較やデータベース化が容易である特徴を持つ。大腸菌用の POT 法も開発されているが、薬剤耐性大腸菌が対象であり、EHEC に対する

菌株識別能はきわめて低い。そこで EHEC O26、O111、O91、O103、O121、O145、O165 等を汎用的に識別可能な EHEC-POT 法開発を目指した。

B. 研究方法

EHEC-POT 法

EHEC-POT 法の Taq としては Qiagen Multiplex PCR kit を Q solution 10% 添加条件で用いた。プライマーはあらかじめ反応系毎に混合し、終濃度各 $0.2 \mu\text{M}$ の条件で用いた。PCR 反応産物は 4% アガロースゲルで電気泳動し、検出 ORF の有無を泳動パターンから読み取った。遺伝子型の数値化には PCR 反応系毎に検出バンドの有無を 1、0 に置き換え 2^n からなる係数をかけ、足し算することで検出パターンを数値化し、POT 型とした。

地方衛生研究所における EHEC-POT 法の評価

全国 14 カ所の地方衛生研究所 (秋田県健康環境センター、東京都健康安全研究センター、千葉市環境保健研究所、川崎市健康安全研究所、富山県衛生研究所、石川県保健環境センター、福井県衛生環境研究センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市役所健康部、三重県保健環境研究所、大阪健康安全基盤研究所、神戸市環境保健研究所、島根県保健環境科学研究所、福岡県保健環境研究所) 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。

(倫理面への配慮)

本研究においては患者情報から切り離された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

検出 ORF 選別の結果、検出候補 ORF のうち 21 個の ORF を検出することで、O121 及び O157 を除く各血清型で汎用的に利用可能かつ、十分な菌株識別能が得られることが判明した。EHEC-POT 法は上記 21 個の ORF に加え、*eae* 遺伝子及び大腸菌のマーカーを加えた 12-plex PCR、2 反応系からなる、検出系となった。

愛知県衛生研究所保有株および感染症研究所提供株 DNA 並びに各地方衛生研究所から 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)。集団感染事例を除いた菌株を用いた各血清型の POT 型の数、及び *D index* は表 1 のとおりである。O26、O111、O103、O165 では *D index* 0.997~0.978 と高い菌株識別能となった。また、その他の希な血清型では O152 の 1 株のみ ORF が全く検出されずタイピング不能であったが、その他の 39 株における *D index* は 0.993 と、十分な菌株識別能力を示し、EHEC-POT 法の開発に関与しなかった分離株においても菌株識別能力

は確保されていた。また、O157 及び O121 を除き、ほとんどの血清型において、特定の POT 型への極度な偏りは見られなかった。その一方、O157 では特定の 3 遺伝子型が全体の 31.7% (202 株中 64 株) を占めており、菌株識別能力の低下に繋がった。また、O121 においては特定の 2 遺伝子型に全体の約 8 割 (58 株中 45 株) が集中した。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。

表 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	<i>D index</i>
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

D. 考察

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。

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。今回は Taq ポリメラーゼについても同一ブランドの製品を配布したことから、良好な PCR 結果が得られたと考えられる。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。その一方菌株由来の DNA 配布による結果再現性評価は行わなかったため、今後検討する必要があると考えられる。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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会
「腸管出血性大腸菌 PCR-based ORF Typing (POT) 法の改良とその評価」 2019 年 11 月 14 日、15 日 (発表日 15 日) 愛媛県松山市

第 93 回日本細菌学会総会 「EHEC-POT 法と MLVA 法の菌株識別能力の比較」 2020 年 2 月 19~21 日 (発表日 20 日) 愛知県名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
令和元年度 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	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 西紀	（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	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	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	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・病原体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、統合されたデータの活用方法について検討する。また、NESID データに基づく広域事例疑い探知システムの構築および改良を行い、広域事例の早期探知と情報共有、迅速な調査へとつなげる方法について検討する。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等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。

本年度は、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。アラート閾値については、2019 年データを含む過去のデータを用いて、より迅速で効果的な閾値の設定を検討する予定である。

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）を連携させるシステムの開発を行い、統合されたデータの活用方法について検討する。

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、早期に広域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特異的な増加を探知するシステム（広域事例疑い探知システム）の開発を行う。これにより、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、より迅速かつ効果的に厚生労働省の関係部局に情報共有することを目標にシステムの改良を行い、2019 年 6 月より稼働させた。また、探知後の情報提供を迅速にするため、解析や作図を自動化するツールの開発を試みた。

B. 研究方法

(A) MLVA データと NESID データの連携と活用法の検討

前年度までに開発した突合ツールにより、MLVA データと NESID データの突合を行った。統合データの活用法の検討の一環として、まずは広域の MLVA クラスタ（同一 MLVA complex の症例群）の規模別の発生頻度を調べた。簡単のために、ここでは 2 保健所以上にまたがる事例を広域発生と定義した。MLVA クラスタの規模は、NESID データに

より家族内感染をクラスタ化し、1家族クラスタを1としてカウントした。

(B) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知

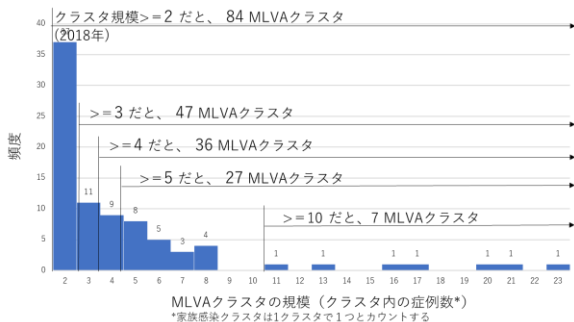
前年度までの研究で得られた知見に基づき、アラート閾値の再検討を行った。前年度は、感度と迅速性を重要視し閾値を低く設定したため、年間を通して多くのアラートを検知したが、多くはその後の患者数の増加は見られないものであった。この低めの閾値は、内部への早めの注意喚起としては有用であるものの、厚生労働省等への情報共有のためには、頻度と特異度の観点から適切ではないと思われた。また、アラート検知後に具体的に何例まで増加したら情報共有を行うかの基準がなかったため、判断に時間を要し、結果的に情報共有までの時間が長くなったことも課題であった。そこで、内部注意喚起用の閾値（感度・迅速性を重視）に加え、厚生労働省への情報共有を行うための閾値を新たに設定する必要があると考えられた。報告数そのものと、過去ベースラインからの逸脱度の2つの指標を組み合わせた段階的なアラートレベル設定を行い、2018年データを用いた試行により得られた発生頻度を考慮して、各レベルに至った場合の対応について併せて検討した。このアラートレベルを用いたシステムを2019年6月より稼働させた。

C. 研究結果

(A) MLVA データと NESID データの連携と活用等の検討

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(図1)。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。

図1. 2018年データにおける MLVA クラスタの規模別発生頻度



(B) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知

知

アラートのレベルごとの閾値を図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2. 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
閾値 レベル	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（026VT2・第20週、0145VT2・第36週、0157VT1VT2・第44週、0157VT2・第46週）。なお第20週の026VT2は、システムがレベル3として探知する数日前に感染症疫学センター内のEHEC監視チームが探知し、早めの情報共有に至った。レベル3として探知された第36週の0145VT2は、報告地分布に偏りがみられたことを考慮し、情報提供に至った。第46週の0157VT2もレベル3で探知したが、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った（最終的にはレベル4に到達）。

D. 考察

(A) MLVA データと NESID データの連携と活用法の検討

MLVA クラスタの規模別の発生頻度を調べたところ、規模が9以上の事例の発生回数は7回（全体の約8%）であり、発生頻度の低い稀な事象であると考えられた。これらの事例の迅速な探知と効果的な注意喚起のための方法論を引き続き考えていく必要がある。

(B) NESID データを用いた広域散发事例の早期探知

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。なお、2019 年に用いたアラート閾値 (図 2) 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。

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、広域事例の早期探知と継続的なモニタリング、及び早期の情報共有を行うためのシステムを構築することを目的とし、本年度は、NESID データに基づく広域事例疑い探知システムの改良を主に行った。改良版システムを稼働させることにより、いくつかの事例において迅速な情報提供を行うことができた。

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					

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 隆守



次の職員の令和元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) 副所長
 (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) ・該当する口にチェックを入れること。
 ・分組研究者の所属する機関の長も作成すること。

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 印



次の職員の令和元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 有 無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
			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。

令和2年4月17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 佐野 輝 印



次の職員の令和元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
- 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□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 学校法人藤田学園 藤田医科大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 才 藤 栄 一 印



次の職員の令和元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）藤田医科大学医学部微生物学講座・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□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。

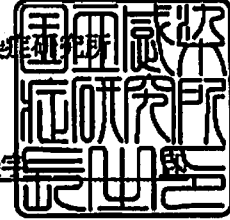
令和2年4月17日

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 隆生



次の職員の令和元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。

75