

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
食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時
の早期探知等に資する研究（20KA1004）

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

令和3年（2021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
食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の
早期探知等に資する研究

令和2年度 総括・研究分担報告書

目次

I. 令和2年度総括研究報告書	
食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究	
研究代表者 大西 真 国立感染症研究所	1
II. 令和2年度分担研究報告書	
1. 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発	
研究分担者 林 哲也 九州大学・大学院医学研究院	9
2. 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	12
3. 食中毒調査の迅速化・高速化及び広域食中毒発生時の早期探知に資する研究	
研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所	15
4. 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究	
研究分担者 寺嶋 淳 岩手大学農学部 共同獣医学科	23
5. 反復配列多型解析法の有効性の検証・精度管理手法の確立研究分担者	
研究分担者 平井 晋一郎 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	40

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)
総括研究報告書

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究

研究代表者： 大西 真 (国立感染症研究所)

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) のサーベイランスにおいて、現在、主に反復配列多型解析 (multi locus variable tandem repeat analysis: MLVA) 法が使われている。MLVA データを基盤とするため継続的に全国のEHEC分離株を解析した。また、血清群O157、O26、O111については地方衛生研究所から直接MLVAデータが送付されMLVA型の付与が行われている。今年度も約600株について解析し型名を付与した。このうち約半数の株について感染研でもMLVA法による解析を行い、データの精度確認を行った。

新たにEHEC分離株が得られた際に、国内外の大腸菌ゲノムと迅速に比較解析を行うためのcore genome single nucleotide polymorphism (cgSNP) および core genome multilocus sequence typing (cgMLST) パイプラインを構築した。同パイプラインを利用し、感染研・細菌第一部でゲノムを解読した国内EHEC 2,248株のデータベース化を行った。以上の研究により、15万件以上の国内外の大腸菌ゲノムとの比較が迅速に行える体制を確立した。

本報告書では分担研究を総括した。

研究分担者

林 哲也 (九州大学大学院医学研究院細菌学分野 教授)

砂川 富正 (国立感染症研究所感染症疫学センター 室長)

工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・部長)

寺嶋 淳 (岩手大学農学部共同獣医学科・教授)

平井 晋一郎 (国立感染症研究所感染症・感染症危機管理研究センター・主任研究官)

研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の事例調査のためにこれまで各種の分子型別法が開発され、利用されてきた。反復配列多型解析法（MLVA法）が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主にMLVA法を用いた解析が行われている。本研究ではこれまで蓄積されてきたMLVA型データを基盤に有効性を明確にし（R2年度）、R3年度には、MLVA型が一致した場合あるいは類似型であった場合の検査結果の評価の仕方を整理し、R3-R4年度にかけて、集団事例における評価を行うことで検証する。地方衛生研究所におけるMLVA解析の利用を一層進めるために、検査結果の正確性を担保するための精度管理手法の確立を行う。R2年度には、精度管理手法のためのマニュアルを整備し、R3年度に地方衛生研究所の協力で試行し、R4年度にはMLVA解析を実施している地方衛生研究所に対して精度管理を実施する計画とする。また食中毒事例由来株、家畜由来株の体系的な収集システムの構築を目指す。

研究方法

MLVA法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研に送付された腸管出血性大腸菌2020年分離株に対してMLVA法により解析した。方法はIzumiyaら（2008、2020）の方法に従って実施した。血清群O157、O26、O111については17か所、O103、O121、O145、O165、O91については43か所の遺伝子座を用いた。地方衛生研究所からMLVA型付与のために送付されたMLVAデータ（血清群O157、O26、O111）も併せて解析を行った。

腸管出血性大腸菌等の検査法（全ゲノム解析）の開発

cgSNPは、解析時に供試する全株に共通する領域（コアゲノム）を抽出する必要があるため、計算機への負荷が高く、時間がかかるため、snippy (<http://github.com/tseemann/snippy>) およびBactSNP (<http://platanus.bio.titech.ac.jp/bactsnp>) を組み合わせた解析パイプラインを構築した。事前の検討では、snippyは再解析が容易であるものの一部のデータで多数のSNPを誤って検出することが示されている。一方、BactSNPは精度の高いSNP抽出が可能であるものの、SNPのデータベース化や数百株以上の解析が困難であった。そこで、BactSNPで得られたSNP情報をsnippyで利用できる形に変換するプログラムを作製することで、高精度なSNPのデータベース化と迅速な再解析が可能となるパイプラインを構築した。一方、cgMLSTは大腸菌の大部分の株が保有する2,513遺伝子を対象としたMLSTであり、Enterobase上で手法が公開されている。そこで、各遺伝子のリアルタイム情報をダウンロードし、BLAST解析をベースにした自製cgMLST解析パイプラインの構築を行った。

以上のパイプラインを利用し、これまでに細菌第一部でWGSを解読したEHEC計2,248株のcgSNPおよびcgMLSTデータベース化を行った。さらに、新たにEHECのゲノム情報が得られた際に、迅速に国内外の大腸菌ゲノムとの比較を容易にするパイプライン構築を行った。

諸外国における解析実態の調査

国内でWGS解析を利用した事例調査を効率的に実施するために求められる解析手法とデータベース

の必要要件等を明らかにするため、本年度は、諸外国におけるWGSの導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査を行い、我が国の現状を踏まえた活用法について検討した。具体的には、英国、他のヨーロッパ諸国、米国、カナダ等で用いられているWGS解析手法（データの取得方法、解析法と解釈の基準、データベースの整備状況、データフォーマット等も含む）を、論文情報等を基に調査した。データの取得方法や解析法に関しては、WGSの適用を早くから進めている英国Public Health Englandの状況を中心に調査したが、同一クローンの判定基準などのデータ解釈に関しては、解析法によって異なる場合もあり、国際的にもコンセンサスが得られていないため、各国の状況あるいは主要機関での状況を調査する必要があった。

データベース構築の準備

これまでに蓄積されている国内分離株のWGSデータを収集・整理し、データベースの整備作業を開始した（プロトタイプデータベース構築）。これらのデータは、分担者が中心となって算出したものが多いが、それ以外のデータは公共のWGS情報データベース（主にNCBI/EMBL/DDBJのゲノム情報データベースとENTEROBASE）から収集した。また、分担者が取得している未発表データもデータベースに加えた。さらに、分担者や本研究班の代表者らが既に収集している分離菌株の解析（WGS情報の取得）を開始した。配列情報の取得には、基本的にはイルミナ社のシーケンサ（サンプル数に応じてMiSeq, HiSeq, NovaSeqのいずれかを使用し、ショートリード配列を取得）を利用したが、必要に応じて（新規性が高く参照配列になりうる株等）、ナノポアMInIONを用いたロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。

MLVA法の有効性の検討および精度管理用菌株の選定

1. 供試菌株の選定

全国の各地で感染者から分離されたEHEC菌株は、厚生労働省の通知に基づき地衛研を介して感染研に集積される。本研究のために、過去に感染研に搬入された全国のEHEC菌株の中から、千葉県で分離された菌株を抽出した。次に、抽出した菌株の中からEHEC O157については2016～2019年に、EHEC O26とO111については、2015～2019年に分離された菌株を抜き出した。抜き出された352菌株のEHEC O157、102菌株のEHEC O26、及び22菌株のEHEC O111の各血清型について、感染研で実施済みのMLVA法の結果を基に、MLVA-mateを使ってMinimum Spanning Treeを作成した⁵⁾ (図1)。供試菌株を多様な特徴を持つ集まりとするために、MST上の位置で偏りが出ない様に菌株を選定した。その結果、10菌株のEHEC O157、5菌株のEHEC O26及び5菌株のEHEC O111が選ばれた。

2. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査

詳細は分担報告書を参照。

3. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査

詳細は分担報告書を参照。

牛のSTECの分離収集と性状解析

岩手県食肉衛生検査所において調べたと畜牛の直腸便285検体を収集した。Stx陽性株について、PCRによる毒素のサブタイピング、O抗原の決定及びパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて詳細な性状解析を行った。詳細は分担報告書を参照。

食中毒事例由来の原因食品から分離株の検証

過去の食中毒事例由来の原因食品から分離した保存株について、MLVA解析を行い患者株との一致率と多様性について検討した。加えて、輸入食品の検査の際に分離された菌株について、同様にMLVA型の多様性について検討した。詳細は分担報告書を参照。

MLVAデータとNESIDデータの連携と活用法の検討

本分担グループでこれまでに開発した突合ツールにより、MLVAデータとNESIDデータの紐づけが行われていないデータに対して突合を行い、広域発生MLVAクラスタ (同一MLVA complexの症例群) について、クラスタサイズ別の発生頻度を調べた。ここでは、2保健所以上にまたがる場合を広域発生と定義した。クラスタサイズは、突合したNESIDデータを基に家族内感染が疑われる症例群をクラスタ化し、1家族内感染クラスタ、クラスタ化されない孤発例をそれぞれ1としてカウントした。

NESIDデータに基づく広域事例疑いの早期探知

前年と同じアルゴリズム、アラート閾値を用いて、年間を通して広域食中毒が疑われる事例の発生を監視した。アラート探知時の対応も前年に用いた方法を踏襲した。

A. 研究結果

MLVA法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研細菌第一部において、2497株について分子型別解析を実施した。このうち2232株についてMLVA法による解析を実施した。解析依頼施設数は86施設であった。各血清群において同定された型数は、O157が565、O26が189、O111が55、O103が54、O121が25、O145が12、O165が4、O91が28であった。得られたデータは2021年5月号のIASRのEHEC特集号において公表される。MLVA型別を実施する地方自治体は、現在25施設であった。これらの施設は、感染研に各自治体で解析した菌株のMLVAデータを送付し、感染研において統一型名を付与した。その菌株数は597株であった。このうち300株については、菌株が感染研に送付され、感染研の結果と比較し精度確認が行われた。感染研の結果と一致したものは96%であり、それ以外の株もほとんどすべてが1遺伝子座違いであった (図1)。

また精度管理手法の確立のための分担研究によって、継代培養が各菌株のTR数の変化に与える影響を調査した。EHEC O157は10菌株中3菌株で、EHEC O26は5菌株中3菌株で、EHEC O111は5菌株中1菌株でTR数の変化が確認された。これらコロニーで変化した領域は1つのみであった。コロニー

変化の詳細は以下の通りである。菌株co170503については、10継代以降も継続して領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが取れた。菌株co190202については、採取した全てのコロニーで同一の変異が観察された。これらコロニーでは、領域O157-37における増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であり、数を判定できなかった。菌株co190173については、10継代で領域157-10のTR数が変化したコロニーが確認されたが、15継代以降、この領域が変化したコロニーは取れなかった。菌株co152166については、5継代でのみ、領域EHC-1が変化したコロニーが取れた。菌株co190892及びco150594は、本来、領域O157-3にTRを持たないが、TRと誤判定される非特異的な遺伝子増幅が見られた。

継代培養後のTR数の変化がどの領域で起きているかで整理した。18領域中5領域でTR数の変化が見られた。領域EHC-1及びO157-10では、3菌株においてTR数の変化が観察された。領域O157-37が変化した菌株はco190202のみだった。領域O157-3では、本来、TRを持たない菌株において非特異的な遺伝子増幅が確認された。

冷凍、冷蔵及び常温の各温度で、2 ng/μlの菌株co161058のDNAを1日、2日及び3日間保存した後、Mltiplex PCRを用いて、領域O157-34のTRの増幅したところ、C_T値の範囲は20.51~22.13であり、検出限界は全て2 x 10⁻⁴ ng/μlだった。C_T値についてカイ二乗検定を行ったところ、各温度について保存日数間で有意な増減は無かった。また、異なる保存温度間でもC_T値に有意な違いはなかった。

腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発

BactSNPおよびsnippyを利用した解析パイプラインの構築により、SNPのデータベース化が可能となった。SNPの抽出には1株あたり20分~1時間程度を要する。既にSNP情報が存在する株を対象とした再解析では、100株の解析が19秒、500株の解析が75秒で可能であった。また、cgMLST解析では、98%がデータベース上に同一型が存在しない新規STとなった。cgSNPおよびcgMLSTデータベース化した2,248株の血清型は、表1のような割合であった。

諸外国におけるWGSの導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討

世界各国でのシーケンシングの主流は、イルミナのシーケンサ (MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq) を用いたショートリード配列の取得であるが、最近ではMGI社のシーケンサを利用したショートリード配列の取得も始まっている。ロングリードシーケンサの利用は研究面にとどまっている。解析パイプラインは研究機関によって様々であり、WGSの取得に関しては、i)参照配列に対するリード配列のマッピング、ii)リード配列のアセンブリのいずれかである。後者で使用されるアセンブラーはSPAdesとVelvetの使用が多いが、CLCのアセンブラーやPatanusなども使用されている。WGSを用いた菌株の実際の解析に関しては、i)コアゲノム配列に基づく系統解析、ii)コア遺伝子の配列に基づく系統解析、iii)コアゲノム配列に基づくwgMLST (Multi Locus Sequence Typing) のいずれかが使用されてい

る。また、集団事例に関連するクローンの判定基準としては、現時点では、コアゲノムまたはコア遺伝子のSNP距離（例えば、5 SNPs）を採用している報告が多いが、解析対象によって異なり、国際的なコンセンサスはない。

国内・国外分離株のWGSデータの収集と解析および基本的なWGSデータベースの構築：

主要EHEC血清群に関して、本分担者がこれまでに取得したデータ、新規に取得したデータ、公共データベースから取得したデータ（基本的に海外株のデータ）の収集を進めた。現時点での収集数は、O157は4,515株（国内は2,525株）、O26は540株（国内は314株）、O145は246株（国内は88株）、O103は979株（国内は103株）、O121は638株（国内は211株）、O165は96株（国内は71株）となっている。最も重要なO157に関しては、別プロジェクトで取得した2005年、2010年、2015年の国内分離株の大部分を網羅する2,219株と牛由来の260株が含まれる。また、O157の中で特に病原性が高いと推察されているClade 8株に関して、特に重点的な収集・整備と解析を行い、511株（国内は150株）の情報を整備するとともに、Clade 8内の亜系統を代表する18株を選び、ロングリードシーケンシングを行った。現在、ショートリード配列とのハイブリッドアッセムブリの作業中である。

牛のSTECの分離収集と性状解析

牛の直腸便285検体から作製したDNA抽出物を使用し、*stx1*及び*stx2*遺伝子 に対するスクリーニングを実施したところ46 検体（16.1%）が*stx*陽性となった。その内11検体が*stx1*のみ陽性、25検体が*stx2*のみ陽性*stx1*及び*2*陽性が10検体となった。*stx*遺伝子が陽性となった46検体のうち、さらに コロニーPCRで陽性となり菌が分離できた検体は12検体（4.2%）14 株であった。

分離株に関して血清型別を実施し、O157、O136、O103が各一株存在することが示された。O抗原が特定出来なかった9検体11株に対してはO抗原遺伝子の有無を標的としたPCRを行い、その結果をOg抗原として特定した（Og typing PCR）。Og39、Og8、Og171、Og2またはOg50、Og130がそれぞれ1検体ずつとなりOg113は2検体4株（同一農場検体）、Og22が2検体（異なる農場検体）となった。

食中毒事例由来菌株のMLVA解析

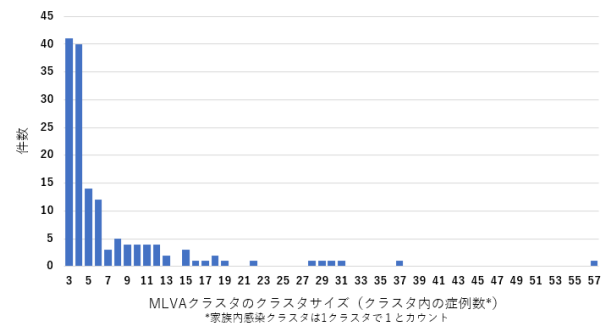
腸管出血性大腸菌食中毒事例A由来のO157菌株26株のうち、22株はMLVA特定17遺伝子座のリピート数が患者分離株と全て同一であり、MLVA型は18m0541であった。患者分離株と1遺伝子座（O157-9）のリピート数のみが異なる株が3株（ESC678、687、688）確認された。このうち1株は1遺伝子座において2本のピークが認められた。リピート数が1遺伝子座において異なるsingle locus variant（SLV）など関連性が推測される型をcomplexとしてまとめると、これらの3株は患者分離株18m0541のcomplexと考えられる。一方で、1株（ESC693）は17遺伝子座中11遺伝子座のリピート数が患者分離株と異なることが確認された。食中毒事例A由来株の生化学性状を解析したところ、同一MLVA型complexの25株は運動性を示さなかったのに対し、ESC6

93は運動性を示すことが明らかになった。また同様に同一MLVA型complexの25株は*eae*遺伝子陽性であるのに対し、ESC693では*eae*遺伝子陰性であった。一方で食品B由来のStx陽性大腸菌O128菌株36株はすべての遺伝子座で同一のリピート数を示した。食品C由来のStx陽性大腸菌O8菌株5株も同様に、すべての遺伝子座で同一のリピート数を示した。

MLVAデータとNESIDデータの連携と活用法の検討

MLVAクラスタのクラスタサイズ別の発生頻度を見ると、クラスタサイズが小さいほど発生頻度が高く、クラスタサイズが大きくなるにつれて発生頻度は減少した（図1）。クラスタサイズが7以上で発生頻度は大きく低下し、7以上のMLVAクラスタの発生回数は41回（全体に占める割合は15%）であった。また、クラスタサイズが10以上の発生回数（割合）は、29回（10%）であった。

図 2. 2019 年のデータにおける MLVA クラスタのクラスタサイズ別発生頻度（暫定結果）



NESIDデータに基づく広域事例疑いの早期探知

2020年は、レベル1以上のアラートは11回発生し、O血清群の内訳は、O157が4件、O26が3件、O103が2件、O121が1件、O血清型不明が1件であった（表1）。最終的にレベル3まで到達した事例は1回（O157VT2・診断週44週）、レベル4に至った事例は1回（O157VT1VT2・診断週38週）であった。前者は、探知時点では急激な増加傾向は認められず、HUS発症例（重症例）の報告もなかったことから、厚生労働省（食品監視安全課及び結核感染症課）への即時の情報提供は行わず、内部での注視を継続することとした。その後、報告数が減少に転じたことから、最終的に情報提供の必要性は低いと判断した。後者においては、探知当初はレベル3であったが、患者の発生が関東に偏っていたこと、年齢性別分布に通常と異なる偏り（30代の女性に多い）が見られたこと等を考慮し、早めの情報提供を行うこととした。

表 2.2020 年に探知したアラート

探知日時	血清群-毒素型	診断週	レベル
2020/1/25	O26-VT1	04-06週	1
2020/6/21	OUT-VT1	25週	1
2020/6/29	O103-VT1	26週	1
2020/7/17	O103-VT1	29-30週	1
2020/8/28	O121-VT2	34-35週	1
2020/9/17	O157-VT1VT2	36週	2+
2020/9/18	O157-VT1VT2	38-40週	4*
2020/9/23	O26-VT1	38週	2
2020/10/2	O157-VT1VT2	40週	2+
2020/11/2	O157-VT2	44-45週	3
2020/11/4	O26-VT1	44週	1

赤字はレベル3以上の事例。*は実際に厚生労働省への情報提供を行った事例。

B. 結論・考察

MLVA法により解析した菌株数は昨年比で2割程度減少したが、大きな傾向の変化は観察されなかった。解析結果は定期的に厚生労働省NESFDにMLVAリストとして掲載された。地方衛生研究所から送付されたMLVAデータは約600株に上った。このうち約半数の株が、後日感染研に送付され、感染研で実施したMLVAデータと比較した。結果としては96%が一致し、一致しなかった株についても1若しくは2遺伝子座の違いのみであった。これらの地衛研については技術的な問題はほぼないと考えられた。MLVAデータ送付にあたっては、地衛研におけるデータの信頼性が重要であり、今後も引き続きモニタリングしていく必要がある。

MLVA法の精度管理手法の確立が重要である。そのためには、MLVA法による結果の安定性を検証していくことが必要である。EHEC菌株の継代培養で変異の影響を受けず、分子疫学的解析法としての有効であった。供試した19菌株のEHECについて、20日連続の継代培養を行ったところ、7菌株についてTR数が変化したり、非特異的な遺伝子増幅が見られたコロニーが確認された。特に、2菌株では同じTR数の変化を持つコロニーが継続的に確認された。例えば、菌株co170503では領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが、10継代以降、継続して確認された。この現象はTR数が変化したクロンが何回も発生したのではなく、変化したクロンが分離平板上で増加し一定の割合以上を占めたためだろう。また、菌株co190202では採取した全てのコロニーにおいて、領域O157-37での増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であった。以前に感染研でMLVA法を実施した際は、co190202の領域O157-37のTR数は7だった。本研究でco190202を使用するまでの保存中に領域O157-37で塩基の欠損が起きたのだろう。他にも、5菌株のコロニーでTR数が変化していたが、全てのコロニーにおいて変化した領域は1つであった。泉谷らは、MLVA法では2領域違いまでの菌株を同一クロン由来と判定できると報告している。従って、継代培養によるTR数の変異は、MLVA法による類似性の判定に大きな影響を与えないと思われる。

継代培養によるTR数の変化頻度の調査の結果から、精度管理試験に適したEHEC菌株を選定できた。精度管理試験において、TR数が変異し易い菌株やTRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が起こる菌株を配布すると、受験機関の回答が誤ってい

た場合、その原因の特定が困難となる。本研究で用いた19菌株のEHECの内、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認されなかった12菌株を精度管理試験で用いると良いと思われる。一方で、本研究では、泉谷らの報告に従い18領域を解析した²⁾。しかし、感染研及び地衛研では、同一の食中毒事例由来のEHEC菌株間で領域O157-10のTR数は頻りに異なっていることから、この領域を解析対象から除いている。本研究でも、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認された5領域の内、変異した菌株数が最も多かった領域はO157-10であり、この領域の変異頻度は高いことを示している。以上より、精度管理試験を行う場合、領域O157-10を除いた17領域で行うべきである。

精度管理試験で配布するDNAの抽出法として、InstaGene Matrixを用いた方法は適していた。菌株のDNAを精度管理試験の検体とする場合、日本郵便株式会社や民間の配送事業を利用し、常温、冷蔵又は冷凍の温度で全国の地衛研に送ることになる。これら事業を利用すると、感染研から最も輸送日数がかかる沖縄県には2日間を要する。InstaGene Matrixを用いたDNA抽出法では、菌体に樹脂入りの液体を混ぜた後、加熱して遠心分離後、上清を抽出液とする。この方法では樹脂でPCR反応を阻害する金属イオン等を取り除いているが、DNAの精製効果は低い。そのため、InstaGene Matrixにより抽出したDNAでは不純物の存在により輸送中に品質が低下し、MLVA法の結果に影響を与えることが考えられる。本研究では、InstaGene Matrixで抽出した菌株のDNAを冷凍、冷蔵及び常温で保管し、1日目、2日目及び3日目に領域O157-34における遺伝子増幅の効率を調査した。その結果、各温度について保存日数の経過でC_T値及び検出限界のDNA濃度に有意な低下は見られず、更に、異なる温度間でも有意な低下も確認されなかった。以上より、InstaGene Matrixで抽出したDNAは輸送中にMLVA法の結果に影響を与える様な品質低下を起こさないとと思われる。

ゲノム解析によって得られる情報を有効に利用することが今後重要と考えられる。本研究においてcgSNPおよびcgMLST解析手法の確立を行い、国内EHEC計2,248株のWGSデータのデータベース化を行った。本手法によって、新たなる集団感染株等が得られた際に迅速に近縁株を抽出することが可能となった。特に、O157以外の血清型ではMLVAが利用可能でないO群や、利用可能なO群であっても十分な型別能を有さない事例が存在する。そのような事例では、WGS解析が特に有効であると考えられる。また、本手法では参照株をEHEC O157 Sakai株に統一したが、O157以外のO群を対象とした解析ではSNP数が過小評価される可能性がある。先行研究から、より近縁な参照株を用いた際に増加するSNPは数カ所程度と考えられるが、今後評価が必要である。

諸外国におけるWGSの導入状況等を踏まえた活用方法についての検討

WGS解析の主流は、イルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であるが、解析パイプラインは各国あるいは研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクロンの判定基準についても国際的なコンセンサスはない。地方衛生研究所などでは、コア遺伝子セットの配列に基づくwg

MLSTが比較的取り入れやすい手法かもしれないが、一般のMLSTのようなSTの整備が行われていないため、国際的なシステムが構築される必要がある。そのため、影響力の大きい米国CDCの方針などに注意して継続的に調査する必要があると思われる。

(2) 国内・国外分離株のWGSデータの収集と解析および基本的なWGSデータベースの構築：

上記のように、主要EHEC血清群のうち、O157、O26、O145、O103、O121、O165のWGSデータの収集・整理を行ったが、公共データベースへの登録が急速に進んでおり、継続的な収集とデータベースのアップデートが必要と思われる。また、公共データベース間でのデータ重複の問題等があるため、収集したデータに関しても、追加の整理作業が必要である。さらに、データベースのスリム化を図るために近縁クローンなどの重複を一定の基準で除外することも検討する必要がある。これらの作業と同時に、参照配列となりうる代表株に関しては、ロングリードシーケンサを用いて完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備することも重要であると思われる。この作業においては、EHECのゲノムには複雑な繰り返し配列が存在するため、ショートリード配列とのハイブリッドアセンブリのプログラム等について検討する必要がある。

2019年のMLVA・NESID突合データにおいて、クラスタサイズが10以上のMLVAクラスタの発生頻度は全体の10%程度であり、比較的稀であることがわかった。MLVAクラスタのクラスタサイズが10を超えた場合にアラートを発するといった活用方法が考えられるが、今回の結果は暫定的なものであり、さらに詳細な検討が必要である。広域事例疑いをより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、2020年においては、広域食中毒疑いとして厚生労働省への情報提供を1回実施し、複数の自治体に対する喫食状況調査等の対策の実施に結びつけることができた。2020年に用いたアラート閾値は2019年に用いたもの²⁾と同じであり、これは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探知アルゴリズムの改良、アラート閾値の最適化を検討することが重要である。また、早期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、関係機関との調整や調査手法の改良を含めた検討を行うことも今後の課題である。NESIDデータ・MLVAデータの統合データの活用法についても、引き続き重要な検討課題である。

ゲノム解析を含めた分子型別手法とサーベイランスを連携して、実務として対策・対応に結びつけていくことが重要であるが、同時に家畜・食中毒事例による食品からの分離菌株の体系的な収集とそのデータベース化も重要である。その活動は緒についたばかりであ流が、継続的に実施していく必要がある。

F. 健康危険情報
該当なし

C. 研究発表

論文発表

1. Kimata K, Lee K, Watahiki M, Isobe J, Ohnishi M, Iyoda S. Global distribution of epidemic-related Shiga toxin 2 encoding phages among enteroaggregative *Escherichia coli*. Sci Rep. 2020 Jul 16;10(1):11738. doi: 10.1038/s41598-020-68462-9.
2. Kato H, Yahata Y, Hori Y, Fujita K, Ooura N, Kido T, Yoshimoto K, Matsui T, Izumiya H, Ohnishi M, Oishi K. A shigellosis outbreak associated with a sports festival at a kindergarten in Kitakyusyu City, Japan. J Infect Chemother. 2020 26; 1146-1151.
3. Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, Ohnishi M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: focus on serogroups O103, O121, O145, O165, and O91. Jpn J Infect Dis. 2020 Nov 24;73(6):481-490. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.095.

学会発表

1. 李 謙一, 綿引正則, 磯部順子, 大西 真, 伊豫田淳, 大規模集団感染由来 O104:H4 と同一の Stx2a ファージを有する志賀毒素産生性腸管凝集性大腸菌 (Stx-EAEC) O86 の解析, 第 163 回日本獣医学会学術集会、2020 年 9 月 14-30 日、Web 開催
2. 品川正臣, 和賀萌美, 山崎朗子, 寺嶋淳 岩手県の食肉処理場に搬入された牛の直腸便における腸管出血性大腸菌の保持状況 日本食品衛生学会第 116 回学術講演会(WEB 開催)令和 2 年 11 月 24 日 (火) ~ 令和 2 年 12 月 8 日 (火)
3. 李 謙一, 井口 純, 宇田和宏, 松村 壮史, 宮入烈, 石倉健司, 大西 真, 伊豫田淳, EHEC Working Group in Japan. 小児重症例から分離された腸管出血性大腸菌新規血清群 OX18 および関連株のゲノ

ム解析 第 94 回日本細菌学会総会、2021 年 3 月 23-25 日、岡山（オンライン）

4. 林哲也：腸管出血性大腸菌のゲノム解析：次世代シーケンサを用いた感染症と病原体の解析の例として（教育講演）。

第 90 回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第 63 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 68 回日本化学療法学会西日本支部総会（合同学術集会）、2020 年 11 月 5～7 日、福岡。

5. 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也：プロファージ内プロファージによる大腸菌への 3 型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム。

第 15 回日本ゲノム微生物学会年会, 2021 年 3 月 4～6 日, 福岡。

6. 宮田達弥, 小椋義俊, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊豫田淳, 伊藤武彦, 大西真, 林哲也：EHEC O157 clade 8 のゲノム多様性と Stx2 と Stx2 ファージのバリエーション。

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23～25日, 岡山。

7. 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也：プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム。

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23～25日, 岡山。

8. 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也：腸管出血性大腸菌 O26:H11 における Stx ファージの遺伝的多様性とダイナミクス。

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23～25日, 岡山。

D. 知的財産権の出願・登録状況

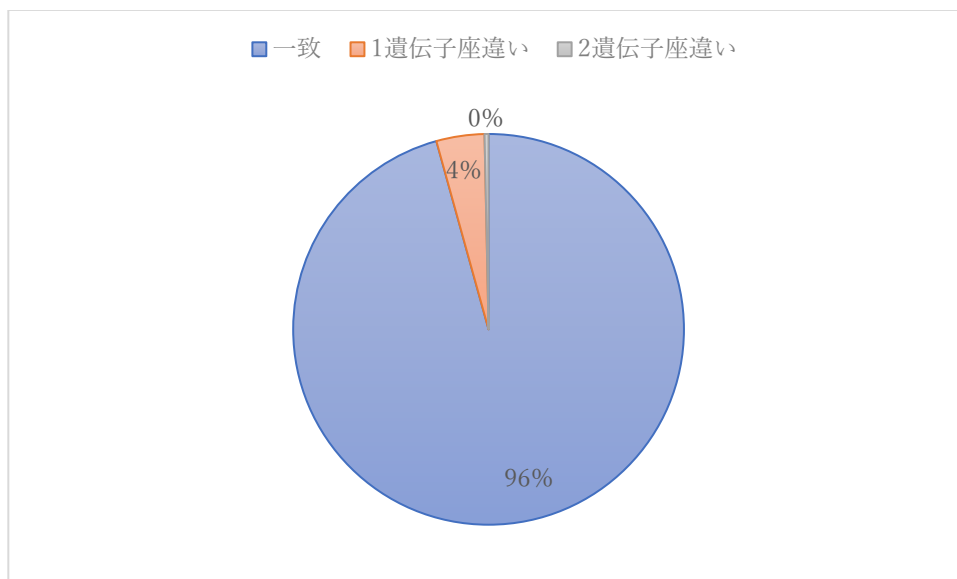
該当なし

表1. データベース化を行った菌株の血清型別菌株数

血清型	菌株数
O111:H8	1,020
O26:H11	274
O103:H2	176
O121:H19	153
O146:H21	62
O103:H25	41
O145:H28	41
O91:H14	39
O165:H25	37
O5:H9	36
O115:H10	29
O111:HUT	27
O103:H11	23
OX18:H19	20
O123:H2	16
O177:H25	14
OUT:H8	13
O69:H11	11
O76:H19	10
その他*	206
計	2,248

*O103:H8 等 82 種の血清型

図1. 送付 MLVA データと菌株データの結果の比較



食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
分担課題 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発
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

腸管出血性大腸菌（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てきたが、国内では、反復配列多型解析法（MLVA 法）がその迅速性・精微性から主に用いられてきた。本研究班では、MLVA に関して蓄積されてきたデータの検証、型が一致した場合等の評価法の整理、集団事例における有効性の評価、地方衛生研究所における利用促進のための精度管理手法の確立を行うとともに、EHEC 等の検査への全ゲノム解析（WGS）の適用に関する検討を行う。本分担者は、他の分担者とともに後者の課題を担当するとともに、並行して行われる食品及び動物分離菌株の WGS データの収集を随時サポートし、WGS データベースに組み込んで解析する役割も担っている。本年度は、国内で WGS 解析を利用した事例調査を効率的に実施するために求められる解析手法とデータベースの必要要件等を明らかにするため、諸外国における WGS の導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査を行い、我が国の現状を踏まえた活用法について検討した。また、これまでに蓄積されている国内分離株の WGS データ（本分担者が取得している未発表データを含む）を収集・整理するとともに、公共の WGS 情報データベース（主に NCBI/EMBL/DDBJ データベースと ENTEROBASE）から WGS データを収集し、プロトタイプとなるデータベースの構築を開始した。さらに、本分担者や本研究班代表者らが既に収集している分離株の WGS データ取得を開始し、新規性が高く参照配列になりうる株等については、ロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（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てきたが、反復配列多型解析法（MLVA 法）が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている。本研究班の目的の 1 つは、MLVA については、蓄積されてきたデータの検証、型が一致した場合等の評価法の整理、集団事例における有効性の評価、地方衛生研究所における利用促進のための精度管理手法の確立である。本研究班のもう一つの目的は「腸管出血性大腸菌等の検査への全ゲノム解析（WGS）の適用に関する検討」であり、本分担者は、この課題を他の分担者とともに担当する。本課題は、国際整合性の観点から実施するものであり、まず海外で展開されている解析手法とデータベース等を

検証し、国内の現状を踏まえた上で、効率的に事例調査を実施するための解析手法とデータベースの必要要件を明らかにすることを旨とする。また、これまでに蓄積された国内分離株のゲノムデータと新たに取得する国内株のデータの整理と解析を行うとともに、海外株のデータも収集する。さらに、これらの検証・解析結果を踏まえて、地方衛生研究所等でも利用可能な解析パイプライン、国際的に整合性のあるデータフォーマットや同一クローンの判定基準等を確立する。本研究班では、これらの 2 課題と関連して、MLVA 及び WGS 解析から得られたデータを利用して感染源や経路経路等に関する後方視的な疫学解析手法を検証することも目的としている。そのため、主感染源である食品からの分離菌株の WGS データ収集を可能とする方策の検討と臨床分離株との比較、同様

に動物由来株のデータ収集を可能とする方策の検討と事例調査への利用を試みる。本分担者は、これらの食品及び動物からの分離菌株の WGS データの収集を随時サポートし、上記の WGS 情報データベースに組み込んで解析する。

B. 研究方法

(1) 国内で WGS 解析を利用した事例調査を効率的に実施するために求められる解析手法とデータベースの必要要件等を明らかにするため、本年度は、諸外国における WGS の導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査を行い、我が国の現状を踏まえた活用法について検討した。具体的には、英国、他のヨーロッパ諸国、米国、カナダ等で用いられている WGS 解析手法(データの取得方法、解析法と解釈の基準、データベースの整備状況、データフォーマット等も含む)を、論文情報等を基に調査した。データの取得方法や解析法に関しては、WGS の適用を早くから進めている英国 Public Health England の状況を中心に調査したが、同一クローンの判定基準などのデータ解釈に関しては、解析法によって異なる場合もあり、国際的にもコンセンサスが得られていないため、各国の状況あるいは主要機関での状況を調査する必要があった。

(2) これまでに蓄積されている国内分離株の WGS データを収集・整理し、データベースの整備作業を開始した(プロトタイプのデータベース構築)。これらのデータは、分担者が中心となって算出したものが多いが、それ以外のデータは公共の WGS 情報データベース(主に NCBI/EMBL/DBJ のゲノム情報データベースと ENTEROBASE)から収集した。また、分担者が取得している未発表データもデータベースに加えた。さらに、分担者や本研究班の代表者らが既に収集している分離菌株の解析(WGS 情報の取得)を開始した。配列情報の取得には、基本的にはイルミナのシーケンサ(サンプル数に応じて MiSeq, HiSeq, NovaSeq のいずれかを使用し、ショートリード配列を取得)を利用したが、必要に応じて(新規性が高く参照配列になりうる株等)、ナノポア MInION を用いたロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。

(倫理面への配慮)
該当しない

C. 研究結果

(1) 諸外国における WGS の導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討:

世界各国でのシーケンシングの主流は、イルミナのシーケンサ (MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq) を用いたショートリード配列の取得であるが、最近では MGI 社のシーケンサを利用したショートリード配列の取得も始まっている。ロングリードシーケンサの利用は研究面にとどまっている。解析パイプラインは研究機関によって様々であり、WGS の取得に関しては、i) 参照配列に対するリード配列のマッピング、ii) リード配列のアセンブリのいずれかである。後者で使用されるアセンブラーは SPAdes と Velvet の使用が多いが、CLC のアセンブラーや Platanus なども使用されている。WGS を用いた菌株の実際の解析に関しては、i) コアゲノム配列に基づく系統解析、ii) コア遺伝子の配列に基づく系統解析、iii) コアゲノム配列に基づく wgMLST (Multi Locus Sequence Typing) のいずれかが使用されている。また、集団事例に関連するクローンの判定基準としては、現時点では、コアゲノムまたはコア遺伝子の SNP 距離 (例えば、5 SNPs) を採用している報告が多いが、解析対象によって異なり、国際的なコンセンサスはない。

(2) 国内・国外分離株の WGS データの収集と解析および基本的な WGS データベースの構築:

主要 EHEC 血清群に関して、本分担者がこれまでに取得したデータ、新規に取得したデータ、公共データベースから取得したデータ(基本的に海外株のデータ)の収集を進めた。現時点での収集数は、0157 は 4,515 株(国内は 2,525 株)、026 は 540 株(国内は 314 株)、0145 は 246 株(国内は 88 株)、0103 は 979 株(国内は 103 株)、0121 は 638 株(国内は 211 株)、0165 は 96 株(国内は 71 株)となっている。最も重要な 0157 に関しては、別プロジェクトで取得した 2005 年、2010 年、2015 年の国内分離株の大部分を網羅する 2,219 株と牛由来の 260 株が含まれる。また、0157 の中で特に病原性が高いと推察されている Clade 8 株に関して、特に重点的な収集・整備と解析を行い、511 株(国内は 150 株)の情報を整備するとともに、Clade 8 内の亜系統を代表する 18 株を選び、ロングリードシーケンシングを行った。現在、ショートリード配列とのハイブリッドアセンブリの作業中である。

D. 考察

(1) 諸外国における WGS の導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討:

WGS 解析の主流は、イルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であるが、解析パイプラインは各国あるいは

研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクローンの判定基準についても国際的なコンセンサスはない。地方衛生研究所などでは、コア遺伝子セットの配列に基づくwgMLSTが比較的取り入れやすい手法かもしれないが、一般のMLSTのようなSTの整備が行われていないため、国際的なシステムが構築される必要がある。そのため、影響力の大きい米国CDCの方針などに注意して継続的に調査する必要があると思われる。

(2) 国内・国外分離株のWGSデータの収集と解析および基本的なWGSデータベースの構築：

上記のように、主要EHEC血清群のうち、O157、O26、O145、O103、O121、O165のWGSデータの収集・整理を行ったが、公共データベースへの登録が急速に進んでおり、継続的な収集とデータベースのアップデートが必要と思われる。また、公共データベース間でのデータ重複の問題等があるため、収集したデータに関しても、追加の整理作業が必要である。さらに、データベースのスリム化を図るために近縁クローンなどの重複を一定の基準で除外することも検討する必要がある。これらの作業と同時に、参照配列となりうる代表株に関しては、ロングリードシーケンサを用いて完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備することも重要であると思われる。この作業においては、EHECのゲノムには複雑な繰り返し配列が存在するため、ショートリード配列とのハイブリッドアセンブリのプログラム等について検討する必要がある。

E. 結論

諸外国の状況に関しては、シーケンシングの主流がイルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得である一方、解析パイプラインは各国あるいは研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクローンの判定基準についても国際的なコンセンサスはないことが明らかになった。また、主要EHEC血清群のうち、O157、O26、O145、O103、O121、O165の国内・国外分離株のWGSデータの収集・整理を行ったが、データ登録が急速に進んでいることから継続的な収集とデータベースのアップデートが必要であり、収集したデータ

に関しても、近縁株の整理によるデータベースのスリム化等、追加の整理作業が必要である。また、参照配列となりうる代表株に関しては、完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備することも重要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 林哲也:腸管出血性大腸菌のゲノム解析:次世代シーケンサを用いた感染症と病原体の解析の例として(教育講演).

第90回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第63回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第68回日本化学療法学会西日本支部総会(合同学術集会), 2020年11月5~7日, 福岡.

(2) 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也:プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム.

第15回日本ゲノム微生物学会年会, 2021年3月4~6日, 福岡.

(3) 宮田達弥, 小椋義俊, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊豫田淳, 伊藤武彦, 大西真, 林哲也:EHEC O157 clade 8のゲノム多様性とStx2とStx2ファージのバリエーション. 第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23~25日, 岡山.

(4) 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也:プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム.

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23~25日, 岡山.

(5) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也:腸管出血性大腸菌O26:H11におけるStxファージの遺伝的多様性とダイナミクス.

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23~25日, 岡山.

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 2 年度 分担研究報告書

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
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 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	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	小林 祐介	(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改良を継続的に行い、広域事例の早期探知と関係部局への情報共有、迅速な調査へとつなげる方法等について検討する。さらに、長期的な視点からは、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。

本研究の成果や開発戦略により、これまで人力で行っていた EHEC 感染症（食中毒を含む）クラスタ分類や広域事例の探知が機械的に行われるため、これらの迅速化および効率化が期待される。また、EHEC 全体や他の腸管病原菌の対策や効率的調査法の開発にも応用できる可能性が高いため、食品安全性確保全体の推進という観点からも大きな波及効果が期待される。

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。本分担グループでは、感染症発生動向調査（NESID）の患者及び病原体データと、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）を連携させるシステムの開発をこれまでにやってきた。データ連携自体は比較的スムーズに行われるようになった一方で、統合したデータの効果的な活用方法については十分な検討がなされておらず、依然として検討課題である。

また、本分担グループでは、詳細な菌株情報が得られていない発生初期の段階において、広域食中毒が疑われる事例をより早期に探知すること

を目的として、NESID の届出データをベースとした広域事例早期探知システムの開発・改良にも継続的に取り組んできた。より早期に探知できれば、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。

本年度は主に、(A) MLVA データと NESID データの連携と活用法の検討、(B) システムを用いた広域事例疑いの早期探知、について取り組んだ。

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

本分担グループでこれまでに開発した突合ツールにより、MLVA データと NESID データの紐づけが行われていないデータに対して突合を行い、広域発生の MLVA クラスタ（同一 MLVA complex の症

例群) について、クラスタサイズ別の発生頻度を調べた。ここでは、2 保健所以上にまたがる場合を広域発生と定義した。クラスタサイズは、突合した NESID データを基に家族内感染が疑われる症例群をクラスタ化し¹⁾、1 家族内感染クラスタ、クラスタ化されない孤発例をそれぞれ 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

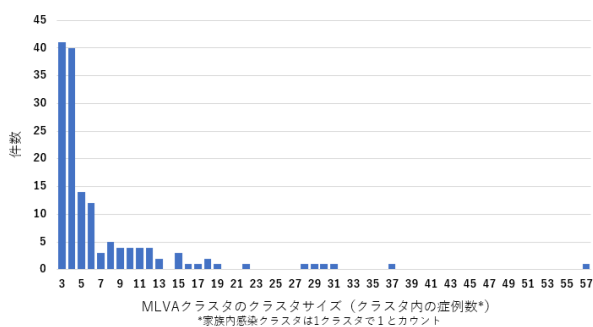
前年と同じアルゴリズム、アラート閾値²⁾を用いて、年間を通して広域食中毒が疑われる事例の発生を監視した。アラート探知時の対応も前年に用いた方法²⁾を踏襲した。

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 クラスタのクラスタサイズ別の発生頻度を見ると、クラスタサイズが小さいほど発生頻度が高く、クラスタサイズが大きくなるにつれて発生頻度は減少した(図 1)。クラスタサイズが 7 以上で発生頻度は大きく低下し、7 以上の MLVA クラスタの発生回数は 41 回(全体に占める割合は 15%)であった。また、クラスタサイズが 10 以上の発生回数(割合)は、29 回(10%)であった。

図 1. 2019 年のデータにおける MLVA クラスタのクラスタサイズ別発生頻度(暫定結果)



(B) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知

2020 年は、レベル 1 以上のアラートは 11 回発生し、O 血清群の内訳は、O157 が 4 件、O26 が 3 件、O103 が 2 件、O121 が 1 件、O 血清型不明が 1 件であった(表 1)。最終的にレベル 3 まで到達した事例は 1 回(O157VT2・診断週 44 週)、レベル 4 に至った事例は 1 回(O157VT1VT2・診断週 38 週)であった。前者は、探知時点では急激な増加傾向は認められず、HUS 発症例(重症例)の報告もなかったことから、厚生労働省(食品監視安全課及び結核感染症課)への即時の情報提供は行わず、内部での注視を継続することとした。その後、報告数が減少に転じたことから、最

最終的に情報提供の必要性は低いと判断した。後者においては、探知当初はレベル 3 であったが、患者の発生が関東に偏っていたこと、年齢性別分布に通常と異なる偏り(30 代の女性に多い)が見られたこと等を考慮し、早めの情報提供を行うこととした。

表 1. 2020 年に探知したアラート

探知日時	血清群・毒素型	診断週	レベル
2020/1/25	O26-VT1	04-06週	1
2020/6/21	OUT-VT1	25週	1
2020/6/29	O103-VT1	26週	1
2020/7/17	O103-VT1	29-30週	1
2020/8/28	O121-VT2	34-35週	1
2020/9/17	O157-VT1VT2	36週	2+
2020/9/18	O157-VT1VT2	38-40週	4*
2020/9/23	O26-VT1	38週	2
2020/10/2	O157-VT1VT2	40週	2+
2020/11/2	O157-VT2	44-45週	3
2020/11/4	O26-VT1	44週	1

赤字はレベル 3 以上の事例。*は実際に厚生労働省への情報提供を行った事例。

D. 考察

2019 年の MLVA・NESID 突合データにおいて、クラスタサイズが 10 以上の MLVA クラスタの発生頻度は全体の 10%程度であり、比較的稀であることがわかった。MLVA クラスタのクラスタサイズが 10 を超えた場合にアラートを発するといった活用方法が考えられるが、今回の結果は暫定的なものであり、さらに詳細な検討が必要である。

広域事例疑いをより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、2020 年においては、広域食中毒疑いとして厚生労働省への情報提供を 1 回実施し、複数の自治体に対する喫食状況調査等の対策の実施に結びつけることができた。2020 年に用いたアラート閾値は 2019 年に用いたもの²⁾と同じであり、これは 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探知アルゴリズムの改良、アラート閾値の最適化を検討することが重要である。また、早期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、関係機関との調整や調査手法の改良を含めた検討を行うことも今後の課題である。NESID データ・MLVA データの統合データの活用法についても、引き続き重要な検討課題である。

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の方法を検討することを目的とし、本年度は、これまでに構築した早期探知システムを用いて広域食中毒の発生を年間を通じて監視し、実際に一つのアラート事例において情報提供を行い、複数自治体にまたがる調査の早期開始に結びつけることができた。早期探知アルゴリズムの改良とアラート閾値の最適化は引き続き重要な課題である。また、長期的な視点からは、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>
- 2) IASR Vol. 41 p75-76 「国立感染症研究所における感染症発生動向調査（NESID）をベースとした広域食中毒探知の取り組み」
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2519-related-articles/related-articles-483/9635-483r07.html>

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

令和2年度 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

食中毒調査の迅速化・高速化及び広域食中毒発生時の早期探知に資する研究

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

MLVA法は広域食中毒を迅速に探知する調査手法として有用であり、PFGEと並行して全国自治体で解析が行われている。しかし、同一食品に由来する菌株において、MLVA型がどの程度一致するかについては、十分な解析がなされていない。本研究では同一食中毒事例由来株および食品由来株におけるMLVA型の多様性を明らかにするため、各検体由来菌株のMLVA解析を行った。その結果、腸管出血性大腸菌食中毒事例A由来の0157菌株26株のうち25株は同一MLVA型 complexであり、1株が異なるMLVA型であった。同一MLVA型 complexの25株は全て非運動性であり *eae* 遺伝子陽性であった。MLVA型の異なる1株は運動性を有しており、*eae* 遺伝子陰性であった。食品Bから分離されたStx陽性大腸菌0128菌株36株のMLVA解析の結果は全て同一であった。食品Cから分離されたStx陽性大腸菌08菌株5株のMLVA解析の結果も全て同一であった。次年度は、自治体および関係機関との協力関係をさらに強化し、食中毒事例株および食品由来株の収集を進め、MLVA型の異なる株の収集および同一食品内におけるMLVA型の一致率の解析を進める予定である。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）の集団感染事例の発生時には、感染源や感染経路の把握のため、また散発的集団発生事例の早期探知のために患者や食品から分離された菌株の解析が求められる。近年では、反復配列多型解析法（MLVA法）が迅速性、

精微性に優れていることから、国内では主にMLVA法を用いた解析が行われている（Microbiol. Immunol., 2010, 54(10), 569-77）。MLVA型による広域食中毒の早期探知には、食中毒事例の原因食品から分離された株のMLVA型の迅速な報告が必須である。しかし、仮に原因食品中に

多様な MLVA 型の株が存在する場合、MLVA 解析に供試する株数が少ないと、複数地域で食中毒事例に関連する同一 MLVA 型の株を見逃し、広域食中毒の早期探知に支障をきたす可能性がある。そのため、本研究では食中毒事例から分離された複数の菌株について MLVA 法による比較解析を行い、多様性を解析した。また、食中毒事例発生時に感染源や感染経路を調査・特定する際に必要な情報を蓄積するため、食品由来株を収集し MLVA 解析を行った。

B. 研究方法

過去の食中毒事例由来の原因食品から分離した保存株について、MLVA 解析を行い患者株との一致率と多様性について検討した。加えて、輸入食品の検査の際に分離された菌株について、同様に MLVA 型の多様性について検討した。

1) 菌株

食中毒事例 A 由来の腸管出血性大腸菌 0157 を 26 株、食品 B 由来の Stx 陽性大腸菌 0128 を 36 株、食品 C 由来の Stx 陽性大腸菌 08 を 5 株、合計 67 株を供試した(表 1)。食中毒事例 A は 2019 年 2 月に発生した腸管出血性大腸菌 0157 による広域食中毒である。同一系列の飲食店を利用し、下痢や嘔吐等の症状を

呈する患者が 8 自治体で 17 名認められ、そのうち 15 名の患者便から分離された菌株の MLVA 型と、保管されていた食品材料から分離された菌株の MLVA 型が一致したことから食中毒と断定された。食品 B 由来株は外国産ナチュラルチーズ培養液から国衛研にて分離した。食品 C 由来株は輸入牛肉の培養液から国衛研にて分離した。全ての菌株は志賀毒素産生性大腸菌(STEC)であり、食中毒事例 A 由来株は *stx1* 遺伝子および *stx2* 遺伝子陽性、食品 B 由来株は *stx1* 遺伝子陽性、食品 C 由来株は *stx2d* 遺伝子陽性株である。

2) DNA 抽出

凍結保存した菌株(67 株)を Tryptone soya agar (OX01D) に画線し、37℃にて 18 時間培養した。チューブに滅菌蒸留水を 100 μ l 採り、コロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、わずかに濁る程度の量を懸濁した。ヒートブロックで 100℃10 分間加熱した後、加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000 $\times g$ 10 分間遠心した上清を新たなチューブに移し、DNA 溶液として保存した。

3) マルチプレックス PCR および増幅産物の MLVA 解析

表 2 に示す通り、2 種類のプライマーミックスを調製した。上記にて抽出した DNA を鋳型として供試

し、PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ research) を用いてマルチプレックス PCR 反応を行った。PCR 反応には 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) を使用した。95°C の 15 分の熱変性ののち、95°C 20 秒—60°C 90 秒—72°C 60 秒を 30 サイクルの増幅反応後、72°C で 10 分間反応させた。増幅産物は Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた高精度電気泳動によってフラグメント解析を行い、GeneMapper Software 6.0 を用いて各遺伝子座のリポート数を決定した。食中毒事例由来株では決定したリポート数を患者株のものと比較・解析した。食品由来株では各遺伝子座ごとのリポート数を菌株間で比較した。

4) 菌株の生化学性状および遺伝子保有状況解析

食中毒事例 A 由来株について半流動性培地を用いて運動性を解析した。加えて、コンベンショナル PCR により *eae* 遺伝子の保有状況を解析した。上記にて抽出した DNA を鋳型として供試し、機器は PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ research) を使用した。PCR 反応には EX Taq (TaKaRa) を使用し、Forward プライマー配列は

GACCCGGCACAAGCATAAGC、Reverse プライマー配列は CCACCTGCAGCAACAAGAGG を用いた (EFSA Journal, 2009 7(11)1366)。95°C 60 秒—58°C 60 秒—72°C 60 秒で 40 サイクル増幅反応させた後、PCR 産物の有無をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

C. 研究結果

腸管出血性大腸菌食中毒事例 A 由来の 0157 菌株 26 株のうち、22 株は MLVA 特定 17 遺伝子座のリポート数が患者分離株と全て同一であり、MLVA 型は 18m0541 であった。患者分離株と 1 遺伝子座 (0157-9) のリポート数のみが異なる株が 3 株 (ESC678、687、688) 確認された。このうち 1 株は 1 遺伝子座において 2 本のピークが認められた。リポート数が 1 遺伝子座において異なる single locus variant (SLV) など関連性が推測される型を complex としてまとめると、これらの 3 株は患者分離株 18m0541 の complex と考えられる。一方で、1 株 (ESC693) は 17 遺伝子座中 11 遺伝子座のリポート数が患者分離株と異なることが確認された (表 3)。食中毒事例 A 由来株の生化学性状を解析したところ、同一 MLVA 型 complex の 25 株は運動性を示さな

かったのに対し、ESC693 は運動性を示すことが明らかになった。また同様に同一 MLVA 型 complex の 25 株は *eae* 遺伝子陽性であるのに対し、ESC693 では *eae* 遺伝子陰性であった。

一方で食品 B 由来の Stx 陽性大腸菌 0128 菌株 36 株はすべての遺伝子座で同一のリポート数を示した (表 4)。食品 C 由来の Stx 陽性大腸菌 08 菌株 5 株も同様に、すべての遺伝子座で同一のリポート数を示した (表 5)。

D. 考察

腸管出血性大腸菌食中毒事例 A 由来の 0157 菌株 26 株のうち、運動性および *eae* 遺伝子の有無が異なり、MLVA 型が異なる株が 1 株検出されたことから、同一食中毒事例由来株であっても複数の MLVA 型の株が存在する一方で、生化学性状が同一であればその MLVA 型の差異は SLV に収まることが示唆された。また、生化学性状の違いと MLVA 型の相違が相関しており、食中毒事例において正確な MLVA 型の把握のためには、複数のコロニーの生化学性状解析と MLVA 型決定が必要であると推測される。MLVA 型の異なった ESC693 については、今後 DNA シーケンス解析等も進めていく必要

がある。また、食品由来株については、B 食品由来の Stx 陽性大腸菌 0128 菌株および C 食品由来の Stx 陽性大腸菌 08 菌株のそれぞれで全ての株の全遺伝子座リポート数が一致した。食品中で増殖した菌株は現在の MLVA 解析で用いる 17 遺伝子座のリポート数レベルでは均一であることが示された。しかし、食品 C については分離された菌株数が 5 株と少数であることから、異なる MLVA 型の菌株を選択しきれていない可能性も考えられる。次年度以降には、自治体および関係機関との協力関係を強化し、食中毒事例由来株および食品由来株の収集を進め、MLVA 型の異なる株の収集および同一食品内における MLVA 型の一致率の解析を進める予定である。

E. 結論

同一食中毒事例株の中に一部異なる MLVA 型を示す菌株が存在することを示した。ただし、生化学性状が一致する株間では、一部 SLV を含むものの全て同一の MLVA 型 complex であった。次年度以降、食中毒事例由来株および食品由来株の収集を進め、同一検体内の MLVA 型一致率の解析を更に進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 論文発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 菌株リスト

由来	O抗原	志賀毒素遺伝子	菌株数
食中毒事例A	O157	<i>stx1,2</i>	26株
食品B	O128	<i>stx1</i>	36株
食品C	O8	<i>stx2d</i>	5株
合計			67株

表 2. プライマーミックス

プライマー	遺伝子座	Dye	Forward	Reverse
	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTGGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAAATATTTTGG
	O157-9			GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
Mix1	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
	EH111-8	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG
		PET	CCGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCTCGCCATCG
	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
	EH26-7	PET	CCCCTATCAAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTT	CGGGCAGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
Mix2	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	CCTTGTGCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCCTCTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-36	NED	GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	GGGTTTCCATTTTCTTACCTTCAGG

表 3. 腸管出血性大腸菌食中毒事例 A 由来 O157 (26 株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数															MLVA型	運動性	eae遺伝子		
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19				O157 -36	O157 -37
ESC676	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC677	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC678	1	4	4	5	-2	3	-2	9	8	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541のSLV	-	+
ESC679	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC680	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC681	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC682	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC683	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC684	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC685	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC686	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC687	1	4	4	5	-2	3	-2	9	8,11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541のSLV	-	+
ESC688	1	4	4	5	-2	3	-2	9	8	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541のSLV	-	+
ESC689	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC690	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC691	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC692	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC693	-2	2	5	-2	-2	2	-2	3	-2	2	-2	-2	-2	2	1	-2	-2	非18m0541	+	-
ESC694	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC695	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC696	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC697	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC698	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC699	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC700	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC701	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+

*患者分離株と一致

表 4. 食品 B 由来 Stx 陽性大腸菌 0128 (36 株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数																
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
ESC24	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC25	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC26	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC27	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC28	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC29	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC30	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC31	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC32	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC33	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC34	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC35	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC36	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC37	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC38	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC39	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC40	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC41	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC42	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC43	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC44	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC45	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC46	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC47	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC48	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC49	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC50	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC51	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC52	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC53	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC54	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC55	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC56	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC57	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC58	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC59	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4

全菌株とも各遺伝子座リピート数が一致していた。

表 5. 食品 C 由来 Stx 陽性大腸菌 08 (5 株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数																
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
ESC69	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC70	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC71	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC72	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC73	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2

全菌株とも各遺伝子座リピート数が一致していた。

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）
分担研究報告書

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究

研究分担者	寺嶋 淳	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	品川正臣	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	和賀萌美	岩手大学農学部	共同獣医学科

研究要旨

腸管出血性大腸菌（Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : STEC）は牛が腸管内にしばしば保菌していることが知られており、食肉や二次的に汚染した多様な食材や食品が STEC 食中毒の感染源となっている。したがって、汚染源となり得る牛の STEC 保菌状況を知ることは STEC 感染症の制御にも極めて有効な情報と考えられる。

本研究では 2020 年の 5 月から 9 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛 285 頭の直腸便における STEC について *stx* 遺伝子の PCR スクリーニングを行い対象牛の STEC 保持状況を調査した。分離できた STEC について O 抗原を血清凝集試験と *E. coli* O genotyping PCR で調べ、さらに *stx* のサブタイピングを行いパルスフィールドゲル電気泳動法によって遺伝的類似性を比較した。

A. 研究目的

STEC 感染症は、感染症法において三類感染症として規定され全数把握疾患となっている。本疾患は食品由来感染症として特徴づけられるものの、原因となる食品は非常に多様であり、主たる保菌動物である牛の腸管内容物による二次的な汚染を含め汚染源は広範な食品・食材に及んでいる。汚染経路も複雑であるがゆえに、STEC 食中毒の原因究明は困難な場合が多く、原因が明らかになることは稀である。一方で牛が主たる保菌動物であることから、汚染源となり得る牛の STEC 保菌状況を知ることは STEC 感染

症の制御にも極めて有効な情報と考えられる。本研究では、さまざまな農場に由来する牛が搬入される食肉処理場において牛の大腸内容物を調べることで STEC 保菌状況を明らかにし、STEC 感染症由来の菌株との比較を行うことで、原因となる STEC の動向を把握することで STEC 感染症の制御に資する情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

（1）STEC の分離収集

岩手県食肉衛生検査所において調べたと畜牛の直腸便 285 検体を収集し、以下

の手順にて STEC を分離収集した。1 g の糞便サンプルを 9 mL の m EC 培地(ニッスイ)に接種し、ボルテックスで混和した後 42°C、16 時間振盪培養した。培養後、培養液 7 mL を 15 mL チューブに移して 3000 rpm 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨てた沈査に 6 mL の PBS を加えて懸濁し 3000 rpm 1 分間遠心分離して夾雑物を除いた。その後上清から 5 mL 採取し、3000 rpm 10 分間遠心分離した。上清を捨て得られた沈査の一部をコロニーPCR 用ストックとしてマッコンキー寒天培地ニッスイに画線し、37°C、1 晩培養した。残りの沈査から以下の方法で DNA を抽出し stx 遺伝子の PCR スクリーニング用のテンプレート DNA とした。沈査を 900 µL の PBS で再懸濁しマイクロチューブに移して 15000 rpm、10 分間遠心分離した。上清を捨てた沈査に 100 µL の 25 mM NaOH を加え再懸濁し、95°C、5 分でヒートブロックによる熱処理をした。熱処理後 8 mL の Tris-HCl を加えて 15000 rpm 10 分間遠心分離し得られた上清を回収してテンプレート DNA とした。テンプレート DNA を用いて、stx1 及び stx2 遺伝子を検出する PCR 反応によりスクリーニングを行った。さらに、stx 遺伝子が陽性となった検体ストックから単コロニーになるように LB 寒天培地に接種・培養した菌株について、各々の単コロニーの PCR による stx スクリーニングを行い stx 陽性株の選抜を行った。stx 陽性の単離株について、API20E による大腸菌の確認および病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いた凝集反応により O 群を同定した(次項 1-2

参照)。

(2) 分離株の性状解析

Stx 陽性株について、PCR による毒素のサブタイピング、O 抗原の決定及びパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて詳細な性状解析を行った。

1-1 毒素のサブタイピング

Scheutz¹⁾らの方法に準じて stx サブタイプを決定した。各検体の DNA は以下のように調製した。Stx 陽性検体については保存したストックを LB 寒天培地にコロニーなるように播種し 37°C、1 晩培養した。得られたコロニーを 1 mL の LB broth BD) に接種し 37°C、1 晩培養した。培養後 100 µL の培養液を 900 µL の滅菌蒸留水に加え 100°C、15 分間加熱した後 18000×g で 5 分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し DNA テンプレートとした。PCR 反応で stx1 陽性となった検体に対してさらに stx1a、stx1c、stx1d を特定するプライマーで PCR 反応を行った。stx2 陽性となった検体に対しては stx2a、stx2b、stx2c、stx2d、stx2e、stx2f、stx2g を特定するプライマーで PCR 反応を行った。PCR 反応液組成及び PCR 条件は以下のとおりである。

・ stx1a, stx1c, stx1d, stx2b, stx2c, stx2e, stx2f, stx2g の PCR 反応液 (20 µL)

HotStarTaq (Q IAGEN)	10 µL
Water	4.5 µL
Forward primer	0.25 µL
Reverse primer	0.25 µL
Template DNA	5.0 µL
・ stx2a の PCR 反応液 (20 µL)	
HotStarTaq	10 µL
Water	4.25 µL

Forward primer1	0.25 μL	
Forward primer2	0.25 μL	
Reverse primer	0.25 μL	
Template DNA	5.0 μL	
・ stx2d の PCR 反応液 (20 μL)		
HotStarTaq	10 μL	
Water	4.0 μL	
Forward primer	0.25 μL	
Reverse primer1	0.25 μL	
Reverse primer2	0.25 μL	
Reverse primer3	0.25 μL	
Template DNA	5.0 μL	
・ stx1a, stx1c, stx1d, stx2b, stx2e, stx2f, stx2g の PCR 反応条件		
95°C	15 分間	} 35 サイクル
94°C	50 秒間	
64°C	40 秒間	
72°C	1 分間	
72°C	3 分間	
・ stx2a, stx2c, stx2d の PCR 反応条件		
95°C	15 分間	} 35 サイクル
94°C	50 秒間	
66°C	40 秒間	
72°C	1 分間	
72°C	3 分間	

PCR 反応後、増幅産物を TAE buffer を用いて 2%アガロースにより電気泳動を行った。

1-2 O 抗原の決定

単離した stx 遺伝子陽性株については、以下の手順で O 抗原を決定した。まず、stx 遺伝子陽性コロニーのストックを 100 μL の PBS に懸濁し、LB 寒天培地上でコンラージ棒を用いて塗り広げ 37°C、1 晩培養した。培養後マッチ棒の頭 3~5 倍程度の菌体を回収し 3 mL の生理食塩液

を入れた小試験管で懸濁した。懸濁液を 121°C、15 分間高圧蒸気滅菌をした後、900×g で 20 分間遠心分離して沈査を回収した。沈査を 0.5 mL の生理食塩液で懸濁し凝集反応用の抗原液として用いた。スライドグラスを数区画に分け、区画毎に大腸菌セット病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研) の混合血清 1 滴を滴加した。試料が自己凝集をおこしていないことを確認するため 1 区画に对照として混合血清の代わりに生理食塩液を 30 μL 滴下した。調製した抗原液の各検体 10 μL を混合血清及び生理食塩液に滴加した。ピペットチップを用いて検体と混合血清及び生理食塩液をよく混和させた。スライドグラスを前後に傾斜させながら 1 分間反応させて凝集の有無を目視で蛍光灯の透過光下で観察した。各血清との反応で 1 分間以内に透明な背景に凝集塊が生じる強い凝集が観察されたものだけを陽性とし 1 分以降に遅れて出現する凝集塊や乳白色の背景に凝集塊が観察された微弱な凝集は陰性とした。混合血清で陽性と判断された場合、その混合血清を構成する単味血清を用いて凝集試験を行った。いずれの混合血清及び単味血清も陰性となった検体は大腸菌セット病原大腸菌免疫血清に含まれる O 群には該当しないと判定し、単独の単味血清が陽性となった検体のみをその単味血清名を O 群と判定した。

凝集試験で凝集塊が認められなかった検体に対しては Og typing PCR²⁾によって O 抗原の遺伝子を同定し Og 抗原とした。stx 遺伝子陽性検体のコロニーを 1 mL の LB broth に接種し 37°C、1 晩培養

した。100 μ L の培養液を 10,000 \times g で 10 分間遠心分離し上清を捨て得られた沈査に 1000 μ L の TE buffer を加えて懸濁した。懸濁液を 100 $^{\circ}$ C、10 分間加熱した後 10,000 \times g で 10 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し DNA テンプレートとした。20 種類のマルチプレックス PCR により Og 抗原を特定した。PCR 反応液組成及び PCR 条件は以下のとおりである。

・ PCR 反応液 30 μ L)	
5 \times KAPA Taq Extra buffer no Mg	
(KAPA)	6.0 μ L
Water	14.42 μ L
Primer Mix	3.52 μ L
MgCl ₂ (KAPA)	3.0 μ L
dNTP mix (KAPA)	0.9 μ L
KAPA Taq DNA polymerase (KAPA)	0.16 μ L
Template DNA	2.0 μ L

・ PCR 反応条件	
94 $^{\circ}$ C、	1 分間
94 $^{\circ}$ C、	30 秒間
58 $^{\circ}$ C、	30 秒間
72 $^{\circ}$ C、	1 分間
72 $^{\circ}$ C、	2 分間

— 25 サイクル

1-3 パルスフィールドゲル電気泳動 stx 陽性株のうち O 抗原及び Og 抗原が同一となった検体に対して PFGE を行った。

LB 寒天培地に保存した菌体を少量かき取り 200 μ L の滅菌蒸留水にマクファーランド比濁法で 4 番の濁度となるように懸濁した。菌の懸濁液に対して 200 μ L の TBE に溶かした 1% seaKem Gold Agarose (Lonza)液を加えて混ぜプラグ

モールド BIO-RAD へ流し込み固化させ以降のプラグとして用いた。固まったプラグを 1 mL の 1 mg/mL の proteinaseK を含む菌体処理溶液が入った Sterile Tube (SARSTEDT)に移し、50 $^{\circ}$ C、一晩振盪しながらインキュベートした。菌体処理溶液の組成は以下のとおりである。

菌体処理液 (16 mL)	
proteinaseK (Roche)	
	0.016g (最終濃度 1 mg/mL)
N-Lauroysarcosine SIGMA	
	0.16g (最終濃度 1%)
0.5M EDTA pH8.0 (ナカライテスク)	
	16mL

菌体処理後、アガロースプラグを取り出しシャーレにいれ、カバーガラスを用いて 1/3 から 1/2 になるように切り 500 μ L の 4 mM Pefabloc SC (AEBSF) in TE に移し 50 $^{\circ}$ C で 15~20 分間振盪 (40 min⁻¹) しながら洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。さらに 1 mL の TE にバッファーを変え 15 分以上氷上にて平衡化した。TE buffer を捨て酵素処理の前段階として 200 μ L の SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes (Roche)を加え、氷上で 35 分以上インキュベートした。SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes を捨て 100 μ L の 20 units の制限酵素 XbaI を含む反応液を加え 37 $^{\circ}$ C、一晩振盪しながらインキュベートした。TE、4 mM Pefabloc SC (AEBSF) in TE 及び XbaI 反応液の組成は以下のとおりである。

・ 10 mM EDTA (4 mL)	
	0.5M EDTA pH8.0 80 μ L
	milliQ 水 3.92 mL

- ・ TE (pH8.0) (202.4 mL)
 - 100 mM Tris-Cl (pH8.0) 2.4 mL
 - 10 mM EDTA 4 mL
 - milliQ 水 196 mL
- ・ 4 mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE (15 mL)
 - 100mM Pefabloc SC (Roche) 0.0144 g
 - TE (pH8.0) 14.9856 mL
- ・ XbaI 反応液 (15 mL)
 - XbaI (Roche) 30 μ L
 - H buffer (Roche) 147 μ L
 - 滅菌蒸留水 1323 μ L

DNA サイズマーカーである CHEF DNA Size Standard Lambda ladder (BIO RAD)をシャーレに取り出し、カバーガラスで約 2 mm の短冊状に切り使用した。コームにマーカーと制限酵素処理をしたプラグを静置した。プラグに付着した余分な Buffer をキムワイプ等で取り除き、数分間乾かした。プラグを貼り付けたコームをゲル作成台にセットし、100 mL の 1 %になるよう TBE に溶かした SeaKem Gold Agarose を流し込んだ。ゲルが固まるまで 20~30 分静置した。水準器を用いて泳動槽が水平になるように調整し 2.2 L の 0.5×TBE (BIO-RAD)を泳動 buffer として使用した。固まった泳動用ゲルを泳動槽に設置し、再び水平になるように調整した。泳動条件は 6.0 V/cm、スイッチ時間 2.2 (initial sw time)-54.2 (final sw time)s、buffer 温度 14°C、泳動時間 22 時間、pump の循環速度 100 とした。電流は最初 90~100 mA、最終的には 150 mA、となるような調整とした。泳動後、染色、脱色をした。

C. 研究結果

1. 牛直腸便サンプル における STEC スクリーニング及び分離

牛の直腸便 285 検体から作製した DNA 抽出物を使用し、stx1 及び stx2 遺伝子に対するスクリーニングを実施したところ 46 検体 (16.1%)が stx 陽性となった。その内 11 検体が stx1 のみ陽性 25 検体が stx2 のみ陽性 stx1 及び 2 陽性が 10 検体となった (表 1)。stx 遺伝子が陽性となった 46 検体のうち、さらに コロニー PCR で陽性となり菌が分離できた検体は 12 検体 (4.2%) 14 株であった (表 2)。

2. stx サブタイプの特定

コロニーPCR により分離できた 12 検体 14 株に対して stx subtyping PCR を実施したところ、サブタイプは stx1 陽性であった 7 検体すべてで stx1a となった。Stx2 が陽性であった 9 株 (stx1 陽性の 3 株を含む) は stx2 a が 3 検体、 stx2c が 2 検体、stx2d が 1 検体、stx2a/2d が 2 検体と stx サブタイプ不明が 1 検体となった (表 3)。

3. 抗病原性大腸菌血清を用いた凝集試験による O 抗原の特定

コロニーPCR により分離できた 12 検体 14 株に対して抗病原性大腸菌血清を用いた血清凝集試験を行った。混合血清を滴下したところ 3 検体それぞれ混合血清 3、7、9 で凝集塊を示した。残りの 9 検体 11 株では凝集塊は観察されなかった。混合血清で凝集塊を示した 3 検体に対して単味血清による O 抗原の特定を実施したところ 3 検体はそれぞれ O157、 O136、 103 のみで凝集塊を示した (表 3)。

4. O 抗原遺伝子の有無を標的とした PCR

による O 抗原 (Og 抗原) の特定

血清凝集試験によって O 抗原が特定出来なかった 9 検体 11 株に対しては O 抗原遺伝子の有無を標的とした PCR を行い、その結果を Og 抗原として特定した (Og typing PCR)。

Og39、Og8、Og171、Og2 または Og50、Og130 がそれぞれ 1 検体ずつとなり Og113 は 2 検体 4 株 (同一農場検体)、Og22 が 2 検体 (異なる農場検体) となった (表 3)。

5. パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)

異なる農場で同一 Og 抗原が観察された 2 検体の Og22 及び同一農場で同一 Og 抗原が観察された 2 検体 4 株の Og113 とその他 1 検体ずつ O 抗原 Og 抗原が同定された検体について PFGE による遺伝的類似性を調べた。その結果 2 検体の Og22 は異なるバンドパターンを示し、Og113 となった 2 検体のうち 3 株は同じバンドパターンを示し、1 株は確認できなかった。また、1 検体ずつ観察された異なる O 抗原 Og 抗原はすべて異なるバンドパターンを示した (図 1)。

D. 考察

本研究では 2020 年の 5 月から 9 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛 285 頭の直腸便における STEC について、stx 遺伝子の PCR スクリーニングを行い対象牛の STEC 保持状況を調査した。既報では、日本の健康な乳牛の PCR による stx 陽性率は 932 頭のうち 283 頭 (30.4%)、分離率は 111 頭 (12%) であるとされて

いる³⁾。季節ごとに牛糞便からの分離率を調べた報告において STEC O157H7 では夏に最も多く分離され、冬が最も低く分離されている⁴⁾。また STEC による食中毒事例も夏に発生が多い。本研究の対象牛は 5~9 月の期間にかけて調査しており、時季としては stx 遺伝子の陽性率が高くなると考えられる。しかし、本研究では stx 陽性率は 285 頭のうち 46 頭 (16.1%) で分離率は 12 頭 (4.2%) と低い値であった。STEC 分離頻度の高い時期が含まれるにもかかわらず低い陽性率であったことは今回直腸便を採取した牛が由来する農場の多くは比較的衛生管理が整っていた可能性が考えられる。また、分離法や牛の年齢なども陽性率に影響を及ぼす可能性があると考えられる。加えて STEC は VBNC (Viable but Non culturable State) と呼ばれる損傷菌として生存可能だが培養ができない状態になる可能性がある。したがって stx 遺伝子が糞便には存在するためスクリーニング PCR で陽性となるが mEC 培地内で増殖ができず LB 培地に接種したストックに stx 保持の大腸菌が生えずにコロニー PCR の検出率が下がり stx 陽性株を分離できなかったことが考えられる。今後スクリーニング検体数を増やすことで陽性率を向上させることが可能かもしれない。また 検体数の増加に伴い、各時季からスクリーニングをすることや牛の年齢も考慮に入れることでより正確なデータが得られると考えられる。本実験では直腸便からの大腸菌のスクリーニングでまず mEC 培地を使用し、分離をする際にマッコンキー寒天培地を使用しているが、選

択性が異なる他の培地を使用することも STEC 分離率の向上に貢献できるものと考えられる。さらに、免疫磁気ビーズ法は、標的とする O 抗原の大腸菌を少数の菌でも効率よく集菌できるため主要 O 抗原を検出する際には有効な手段であり免疫磁気ビーズ法を使用することも分離率の向上分離率の向上につながるものと期待できる。

本研究で分離した STEC 14 株に対して stx 遺伝子のサブタイピングを行った結果では、stx1 については、7 検体でサブタイプが stx1a となった。Stx2 については、stx2a, stx2c, stx2d の 3 種類のみが検出された。stx 遺伝子のサブタイプの中でも stx2a、stx2c 及びその変異体の存在は疾患の重症度と密接に関係しており、stx1a、stx2a、stx2c、stx2d は HC 及び HUS に密接に関係しているという報告がある⁵⁾。本研究で検出されたサブタイプ 4 種類は重度の疾患 HC 及び HUS の発症に関係しており stx のサブタイプという点に関してのみ着目するとこれらの株が原因となる食中毒が起こった場合、患者が重篤な症状になる可能性が考えられる。今後は stx1 及び stx2 遺伝子のみならず、eaeA、hlyA 及び saa などの病因因子も検査することによりスクリーニング検体のヒトへのリスクを評価することも可能であると考えられる。

STEC による食中毒の原因として挙げられる主要な O 群の抗原に O157 があるが、非 O157 による食中毒も近年増加しており、O26、O103、O111、O121、O45 及び O145 は非 O157 の STEC の中では多く検出されており、これら O 群に属す

る STEC は O157 を含め主要 7O 群とされている。我が国では、2007 年 11 月から 2008 年 3 月までに牛直腸便から検出された STEC O157 及び O26 は、2436 頭の肉牛のうち、それぞれ 8.9%と 0.4%という報告がある⁶⁾。また、別の調査では 932 頭の乳牛のうち STEC O157 陽性検体がなく、O26 が 0.9%、O103 が 0.5%という報告がある³⁾。本研究では主要 7O 群と言われる食中毒に関する主要 O 群に属する STEC は 12 検体中 O157 及び O103 が各 1 検体の計 2 検体で、ともに 0.4% となり他の主要 O 抗原は検出されなかった。わが国では 2014 年から 2018 年の 5 年間において食中毒事例での主要 O 抗原は全体の 94%を占めている⁷⁾が、先行研究並びに本研究結果から主要 7O 群は牛糞便内では優位に多い訳ではなくその他の O 抗原が占めていることが示唆された。

本研究では異なる農場で同一 Og 抗原となった 2 検体の Og22 と同一農場で同一 Og 抗原となった 2 検体 4 株の Og113 を中心に STEC が分離できた 12 検体、14 株に対して PFGE 法による解析を行った。その結果、Og22 株ではバンドパターンが異なることからこれら 2 株はゲノム構成が異なっておりその由来が異なる菌株であることが示唆された。したがって、異なる 2 農場間で分離された同一 O 抗原 (Og22) の STEC は相互の関連性が低い分離株であることが考えられた。また Og113 では、バンドパターンが確認されなかった 1 株を除き残りの 3 株については泳動像がシャープではないため確実性はないが類似したバンドパターンが確

認められた。同一農場において異なる牛の直腸便から遺伝的に極めて類似した同一 O 抗原の STEC 株が分離されたことから当該農場における Og113 株による汚染率の高さが推測された。一方、これら Og113 の 3 株はそれぞれ stx1a 陽性が 2 株 stx1a 及び stx2d 陽性が 1 検体であり、バンドパターンが確認できなかった 1 株は stx1a stx2c 及び stx2d 陽性と異なる stx 遺伝子のサブタイプを示していた。ゲノム構成が近縁と考えられるこれらの株における stx のサブタイプの違いは、プロフェージ上から stx2c 及び stx 2d 遺伝子が欠落したために起きたと考察された。今後、さらに検体数を増加させることで、異なる農場における同一の O 抗原となる STEC 検体が増えれば、PFGE による遺伝的類似性の比較をすることで疫学調査に有用な菌株解析情報を得ることができるものと期待される。また、STEC の PFGE 解析に加えて、反復配列多型解析 (MLVA) による菌体解析を実施し、疫学調査を強化することで、岩手県を中心とした本地域で発生する食中毒集団発生事例の対応に貢献することが期待される。

(参考文献)

(1) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Toz z oli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton Celsa AR, Sanchez M, Persson S and O'Brienb AD(2012). Multicenter Evaluation of a Sequence Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. J Clin Microbiol. 50,2951-2963

(2) Iguchi A, Iyoda S, seto K, Morita Ishihara T, Scheutz F and Ohnishi M, Pathogenic E.coli Working Group in Japan (2015). *Escherichia coli* O Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. J Clin Microbiol . 53(8) 2427-2432

(3) Kobayashi H, Kanazaki M, Ogawa T, L yoda S, Hara Kudo Y. (2009). Changing Prevalence of O serogroups and Antimicrobial Susceptibility Among STEC Strains Isolated from Healthy Dairy Cows Over a Decade in Japan Between 1998 and 2007. J. Vet. sci. 71(3):363-366.

(4) Genevieve AB, Terrance MA, Mildred R, Xiangwu N, Steven DS, Tommy LW and Mohammad Koohmaraie (2003). Seasonal Prevalence of Shiga t oxin Producing *Escherichia coli*, Including O157 :H7 and Non O157 Serotypes, and Salmonella in Commercial Beef Processing Plants. Journal of Food Protection . 66(11):1978-1986

(5) Group FWSE (2019). Hazard identification and characterization: criteria for categorizing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on a risk basis. J Food Prot. 82(1):7-21

(6) Sasaki Y Tsujiyama Y, Kusukawa M, Murakami M, Katayama S and Yamada Y (2011). Prevalence and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. Vet Microbiol. 150(1 2):140-5

(7) NIID 国立感染症研究所 (2020) 病原微生物検出情報 .IASR, 41(5):66-88

E. 結論

2020年の5月から9月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛285頭の直腸便におけるSTECについてstx遺伝子のPCRスクリーニングを行い対象牛のSTEC保持状況では、46検体(16.1%)がstx陽性となった。その内11検体がstx1のみ陽性、25検体がstx2のみ陽性、stx1及び2陽性が10検体となった。市販抗血清に反応したO抗原はO157、O103、O136がそれぞれ1検体あり、凝集試験で凝集しなかった検体はOg-typing PCRにより、Og39、Og8、Og171、Og2またはOg50、Og130が1検体ずつとなり、Og113は2検体(同一農場)、Og22(異なる農場)となった。Stxのサブタイプについては、stx1が8検体すべてでstx1aとなった。Stx2はstx2aが3検体、stx2cが2検体、stx2dが1検体とstx2a/2dが2検体となった。PFGEの結果、別の農場から分離されたOg22は異なるバンドパターンを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

・品川正臣、和賀萌美、山崎朗子、寺嶋淳
岩手県の食肉処理場に搬入された牛の直腸便における腸管出血性大腸菌の保持状況 日本食品衛生学会第116回学術講演会(WEB開催)令和2年11月24日(火)～令和2年12月8日(火)

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 牛直腸便サンプルのstx遺伝子スクリーニング結果

スクリーニング結果				
検体数	stx1のみ陽性	stx2のみ陽性	stx1及び2陽性	総陽性数(%)
285	11	25	10	46(16.1)

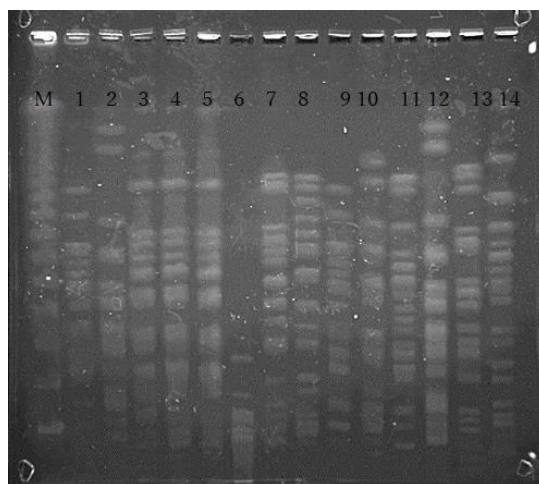
表2 コロニーPCR結果

コロニーPCR		
検体数	分離できた検体数(%)	分離できた株
285	12 (4.2)	14

表3 分離株におけるO抗原群、stx1及びstx2サブタイピング結果

samples	O抗原	Og-typing	subtyping
A農場 検体	-	Og22	stx2d
C農場 検体2	-	Og22	stx2c
G農場 検体1	-	Og113	stx1a
G農場 検体2-colony1	-	Og113	stx1a
G農場 検体2-colony2	-	Og113	stx1a/2d
G農場 検体2-colony3	-	Og113	stx1a/2a/2d
C農場 検体1	O103	Og103	stx1a
D農場 検体1	O136	-	stx1a
B農場 検体	-	Og39	不明
D農場 検体2	-	Og8	stx2a/2d
F農場 検体1	-	Og171	stx2c
F農場 検体2	-	Og2,Og50	stx2a
H農場 検体	-	Og130	stx2a
E農場 検体	O157	Og157	stx1a/2a

図 1 パルスフィールドゲル電気泳動による STEC 分離株の比較



Lane

1. A 農場検体 O g22
 2. C 農場検体 O g22
 3. G 農場検体 1Og113
 4. G 農場検体 2 colony1 Og113
 5. G 農場検体 2 colony2 Og113
 6. G 農場検体 2 colony3 Og113
 7. C 農場検体 1 O103
 8. D 農場検体 1 O136
 9. B 農場検体 Og39
 10. D 農場検体 2 Og8
 11. F 農場検体 1 Og171
 12. F 農場検体 2 Og2, Og50
 13. H 農場検体 Og130
 14. E 農場検体 O1 157
- M: DNA サイズマーカー (λラダー)

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」

分担研究報告書

反復配列多型解析法の有効性の検証・精度管理手法の確立

研究代表者 大西 真 国立感染症研究所 副所長
研究分担者 平井 晋一郎 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学的解析法である反復配列多型解析（MLVA）法は、菌株の類似性を判定する能力に優れていることから、全国の地方衛生研究所（地衛研）で広く用いられている。しかし、菌株の保存や継代培養で発生した変異がMLVA法の結果に与える影響はあまり調査されていない。一方で、MLVA法の結果は複数の遺伝子座位における反復配列の繰り返し（TR）数の組み合わせ、つまり、結果が数値のみのために解析の失敗を見抜く手掛かりはほぼ無い。MLVA法を地衛研において正しく運用するには、検査精度を高く保つ必要がある。本研究では、菌株の継代培養がMLVA法に与える影響を検証するために、過去に感染研に搬入されたEHEC菌株の中から、MLVA法で様々なTR数を持つ19菌株のEHECを選んだ。これら菌株を20日間連続で継代培養した後、コロニーを得た。コロニーについてMLVA法を実施したところ、19菌株中7菌株においてTR数の変化があった。しかし、TRが変化しただけのコロニーで、変化した領域は1つであった。この結果は、継代培養はMLVA法の結果に大きな影響を与えず、本法は分子疫学的解析法として有効性が高いことを示している。一方で、地衛研に対しMLVA法を実施する場合、試験に適した検体を選ばなくてはならない。精度管理試験でEHEC菌株を配布する際は、継代培養でTR数が変化しなかった7菌株を選ぶべきだろう。また、InstaGene Matrixを用いて抽出したDNAを冷凍、冷蔵及び常温で3日間保管し、TRの遺伝子増幅効率や検出限界を調べたところ、どの温度でも保存日数の経過で低下はなかった。そのため、この方法で抽出したDNAは精度管理試験で配布する検体として適していることが分かった。

A. 研究目的

2002年、反復配列多型解析（MLVA）法は、腸管出血性大腸菌（EHEC）の新しい分子疫学的解析法として開発された¹⁾。MLVA法ではEHECの特定遺伝子座位における反復配列の繰り返し（TR）数の解析により、菌株間の類似性を判定する。MLVA法の菌株間の類似性を判定する能力（分離能）は、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法と同程度以上であると報告されている²⁾。また、MLVA法ではPCR法を用いるため、PFGE法と比較し短時間で解析結果を出すことが可能である。現在、地方衛生研究所（地衛研）や国立感染症研究所（感染研）等の公衆衛生分野の研究では、PFGE法に代わる分子疫学的解析法としてMLVA法は使用されている。

MLVA法は分子疫学的解析法として分離能・迅速性に優れているが、菌株の保存や継代培養がMLVA法の結果に与える影響は殆ど検討されていない。近年のある論文により、EHEC O157の菌株は検査の過程、特に培養により変異が蓄積し、ゲノム解

析に影響を与えると報告された³⁾。例えば、EHECの食中毒が発生した場合、多くの自治体では保健所や医療機関等で患者便は検査され、EHEC菌株が分離される。その後、菌株は地衛研に搬入されて詳細な検査が行われると共に、食中毒事例の行政処分のためにMLVA法が実施される。最終的に、EHEC菌株は地衛研を経由して感染研に搬入され、全国的に蔓延したEHEC菌株の検出のためにMLVA法で解析される。菌株は各機関で検査や継代されており、感染研や地衛研に搬入されるまでに変異が蓄積しているだろう。MLVA法が分子疫学的解析法として真に有効であると言うためには、継代培養後の菌株でもTR数が変化しないことを確認する必要がある。

一方で、MLVA法の能力を公衆衛生分野の検査でより活かすには、地衛研での検査精度を高く保つ必要がある。近年、食品流通網の拡大に伴い、大規模なEHEC集団食中毒が発生している。PFGE法では、電気泳動後のバンドパターンを視覚的に比較することで菌株間の類似性を判定する。そのため、感染者が複数自治体に存

在する食中毒事例をPFGE法で検査する場合、1つの地衛研に菌株を集めて検査しなければ、正確な結果を得られない。しかし、MLVA法の結果は数値であるため、地衛研間での結果の共有が容易である。一方で、PFGE法の場合、電気泳動後の画像を観察すれば、バンドパターンの歪みや制限酵素処理で切れ残ったバンドの存在等から結果が正しくないことを認識できる。しかし、MLVA法では結果が数値のみであり、解析の失敗を見抜く手がかりが殆どなく、誤った結果を自治体間で共有してしまう恐れもある。MLVA法の結果共有性を活かすには、地衛研における精度管理を行う必要がある。

地衛研に対して適切に精度管理を行うには、試験に適した検体を選定しなくてはならない。ある研究では、検査過程での培養により、特定のEHEC菌株は他の菌株と比べて変異の蓄積量が優位に多いことを報告している³⁾。この様な菌株をMLVA法で解析する場合、配布後にTR数が変わってしまうかもしれない。また、TRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が頻繁に起こる菌株も存在する。非特異的な増幅が起きる菌株を精度管理試験で配布すると、MLVA法の検査精度を正しく評価できない恐れがある。一方で、精度管理において菌株DNAを配布して試験を行う場合、輸送期間中にDNAの品質が低下するかもしれない。MLVA法で用いるMultiplex PCRにおいて、幾つかの領域は増幅効率が低いことが知られている⁴⁾。増幅効率が低い領域では、DNAの品質低下によりTRが検出されなくなる可能性がある。配布用のDNAは品質低下が起きにくい方法で抽出される必要がある。

本研究では、①MLVA法の分子疫学的解析法としての有効性を確かめるために、EHEC菌株の継代培養がTR数の変化に与える影響を調査した。次に、②精度管理試験に適したEHEC菌株を選ぶために、①の結果を基に、継代培養してもTR数が変化せず、非特異的な遺伝子増幅が起きない菌株を探した。また、③DNAの品質低下がTRの検出に与える影響を調査し、精度管理試験に適切なDNA抽出法を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株の選定

全国の各地で感染者から分離されたEHEC菌株は、厚生労働省の通知に基づき地衛研を介して感染研に集積される。本研究のために、過去に感染研に搬入された全国のEHEC菌株の中から、千葉県で分離された菌株を抽出した。次に、抽出した菌株の中からEHEC 0157については2016～2019年に、EHEC 026と0111については、2015～2019年に分離された菌株を抜き出した。抜き出された352菌株のEHEC 0157、102菌株のEHEC 026、及び22菌株のEHEC 0111の各血清型について、感染研で実施済みのMLVA法の結果を基に、MLVA-mateを使

ってMinimum Spanning Treeを作成した⁵⁾ (図1)。供試菌株を多様な特徴を持つ集まりとするために、MST上の位置で偏りが出ない様に菌株を選定した。その結果、10菌株のEHEC 0157、5菌株のEHEC 026及び5菌株のEHEC 0111が選ばれた (表1)。

2. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査

供試菌株について継代培養後のコロニーを以下の通りに得た。各菌株を1枚のLB寒天平板培地に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。培養後、平板に発育した菌株を偏りなく新しいLB寒天平板培地 (Becton, Dickinson and Company) に継代するため、コロニーに分離していない部分を全て生理食塩水に懸濁後、白金耳を使って新しい1枚の培地に画線塗抹し、同様の条件で培養した。この継代培養を20日間連続で行い、5日目、10日目、15日目及び20日目に1枚の平板培地から5コロニーを白金耳で掻き取った。

掻き取ったコロニーについて以下の通りにMLVA法を実施した。InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories) を使って取扱説明書に従い各コロニーからDNAを抽出した。Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を使用し、DNA濃度を2 ng/ μ lに調整した。調製したDNAを用いて、泉谷らの方法に準じてMLVA法を実施した²⁾。Multiplex PCR法で増幅した遺伝子についてはキャピラリーゲル電気泳動装置で電気泳動し、GeneMapper Ver 4.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用しTR数を算出した。

3. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査

菌株co161058をLB寒天平板培地に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。1つのコロニーを掻き取り、InstaGene Matrix を使ってDNA抽出した。DNA濃度を2 ng/ μ lに調整した後、-20°C (冷凍)、4°C (冷蔵) 及び15°C (常温) で保存した。

次に、各温度で0日、1日、2日及び3日間保存したDNAについて、領域0157-34のTRをMultiplex PCR法で増幅した。領域0157-34を解析対象に選んだ理由は「2. 継代培養によるTR数の変化頻度の実験」で増幅遺伝子をシークエンサーで検出した際、多くの菌株において、この領域のピークの検出強度が低かったからである。1検体当たりの反応液として、DNAを1 μ l、TaqMan Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を10 μ l、MLVA法のプライマーセットMix 1を2.0 μ l²⁾、プローブプライマー (10 μ M, FAM-CAGTTGATTTACGATACGGA) を0.4 μ l、及び脱イオン蒸留水を6.6 μ l混合し、合計で25 μ lとした。反応条件として、95°C、20秒間でDNAポリメラーゼを活性化し、その後の40サイクルは95°C、20秒間の熱変性と60°C、1分間のアニーリング/伸長反応を繰り返した。M

uitiplex PCR法実施後、領域0157-34のTRの増幅効率の評価のために、DNA 2 ng/μlのC_T値及び検出限界のDNA濃度を調査した。

C. 研究結果

1. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査

継代培養が各菌株のTR数の変化に与える影響を調査した(表2)。EHEC 0157は10菌株中3菌株で、EHEC 026は5菌株中3菌株で、EHEC 0111は5菌株中1菌株でTR数の変化が確認された。これらコロニーで変化した領域は1つのみであった。コロニーの変化の詳細は以下の通りである。菌株co170503については、10継代以降も継続して領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが取れた。菌株co190202については、採取した全てのコロニーで同一の変異が観察された。これらコロニーでは、領域0157-37における増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であり、数を判定できなかった。菌株co190173については、10継代で領域157-10のTR数が変化したコロニーが確認されたが、15継代以降、この領域が変化したコロニーは取れなかった。菌株co152166については、5継代でのみ、領域EHC-1が変化したコロニーが取れた。菌株co190892及びco150594は、本来、領域0157-3にTRを持たないが、TRと誤判定される非特異的な遺伝子増幅が見られた。

継代培養後のTR数の変化がどの領域で起きているかで整理した(表3)。18領域中5領域でTR数の変化が見られた。領域EHC-1及び0157-10では、3菌株においてTR数の変化が観察された。領域0157-37が変化した菌株はco190202のみだった。領域0157-3では、本来、TRを持たない菌株において非特異的な遺伝子増幅が確認された。

2. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査

冷凍、冷蔵及び常温の各温度で、2 ng/μlの菌株co161058のDNAを1日、2日及び3日間保存した後、Mtiplex PCRを用いて、領域0157-34のTRの増幅したところ、C_T値の範囲は20.51~22.13であり、検出限界は全て2 x 10⁻⁴ ng/μlだった(表4)。C_T値についてカイ二乗検定を行ったところ、各温度について保存日数間で有意な増減は無かった。また、異なる保存温度間でもC_T値に有意な違いはなかった。

D. 考察

MLVA法はEHEC菌株の継代培養で変異の影響を受けず、分子疫学的解析法としての有効であった。供試した19菌株のEHECについて、20日連続の継代培養を行ったところ、7菌株についてTR数が変化したり、非特異的な遺伝子増幅が見られたコロニーが確認された。特に、2菌株では同じTR数の変化を持つコロニーが継続的に確認された。例えば、菌株co170503では領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニー

が、10継代以降、継続して確認された。この現象はTR数が変化したクローンが何回も発生したのではなく、変化したクローンが分離平板上で増加し一定の割合以上を占めたためだろう。また、菌株co190202では採取した全てのコロニーにおいて、領域0157-37での増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であった。以前に感染研でMLVA法を実施した際は、co190202の領域0157-37のTR数は7だった。本研究でco190202を使用するまでの保存中に領域0157-37で数塩基の欠損が起きたのだろう。他にも、5菌株のコロニーでTR数が変化していたが、全てのコロニーにおいて変化した領域は1つであった。泉谷らは、MLVA法では2領域違いまでの菌株を同一クローン由来と判定できると報告している²⁾。従って、継代培養によるTR数の変異は、MLVA法による類似性の判定に大きな影響を与えないと思われる。

継代培養によるTR数の変化頻度の調査の結果から、精度管理試験に適したEHEC菌株を選定できた。精度管理試験において、TR数が変異し易い菌株やTRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が起こる菌株を配布すると、受験機関の回答が誤っていた場合、その原因の特定が困難となる。本研究で用いた19菌株のEHECの内、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認されなかった12菌株を精度管理試験で用いると良いと思われる。一方で、本研究では、泉谷らの報告に従い18領域を解析した²⁾。しかし、感染研及び地衛研では、同一の食中毒事例由来のEHEC菌株間で領域0157-10のTR数は頻繁に異なっていることから、この領域を解析対象から除いている。本研究でも、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認された5領域の内、変異した菌株数が最も多かった領域は0157-10であり、この領域の変異頻度は高いことを示している。以上より、精度管理試験を行う場合、領域0157-10を除いた17領域で行うべきである。

精度管理試験で配布するDNAの抽出法として、InstaGene Matrixを用いた方法は適していた。菌株のDNAを精度管理試験の検体とする場合、日本郵便株式会社や民間の配送事業を利用し、常温、冷蔵又は冷凍の温度で全国の地衛研に送ることになる。これら事業を利用すると、感染研から最も輸送日数がかかる沖縄県には2日間を要する。InstaGene Matrixを用いたDNA抽出法では、菌体に樹脂入りの液体を混ぜた後、加熱して遠心分離後、上清を抽出液とする。この方法では樹脂でPCR反応を阻害する金属イオン等を取り除いているが、DNAの精製効果は低い。そのため、InstaGene Matrixにより抽出したDNAでは不純物の存在により輸送中に品質が低下し、MLVA法の結果に影響を与えることが考えられる。本研究では、InstaGene Matrixで抽出した菌株のDNAを冷凍、冷蔵及び常温で保管し、1日目、2日目及び3

日目に領域O157-34における遺伝子増幅の効率を調査した。その結果、各温度について保存日数の経過で C_T 値及び検出限界のDNA濃度に有意な低下は見られず、更に、異なる温度間でも有意な低下も確認されなかった。以上より、InstaGene Matrixで抽出したDNAは輸送中にMLVA法の結果に影響を与える様な品質低下を起こさないとと思われる。

E. 結論

継代培養によるTR数の変異は、MLVA法による類似性の判定に大きな影響を与えず、本法は分子疫学的解析法として有効であった。次に、地衛研に対する精度管理試験に適したEHEC菌株として、継代培養してもTR数が変化せず、非特異的な遺伝子増幅が起きない菌株を選定した。精度管理試験で菌株のDNAを配布する場合、InstaGene Matrixを用いてDNAを抽出すると良い。

F. 謝辞

本研究の遂行において、終始、貴重なご指導とご助言を賜りました感染研 細

菌第一部の泉谷秀昌先生に深く感謝申し上げます。

G. 参考文献

- 1) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 2) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 3) Yokoyama, et al., Int J Food Microbiol, 264: 39-45, 2018
- 4) Seto, et al., J Microbiol Methods, 139: 12-14, 2017
- 5) 南須原ら, 東京都健康安全研究センター年報, 69: 279-284, 2018

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

なし

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

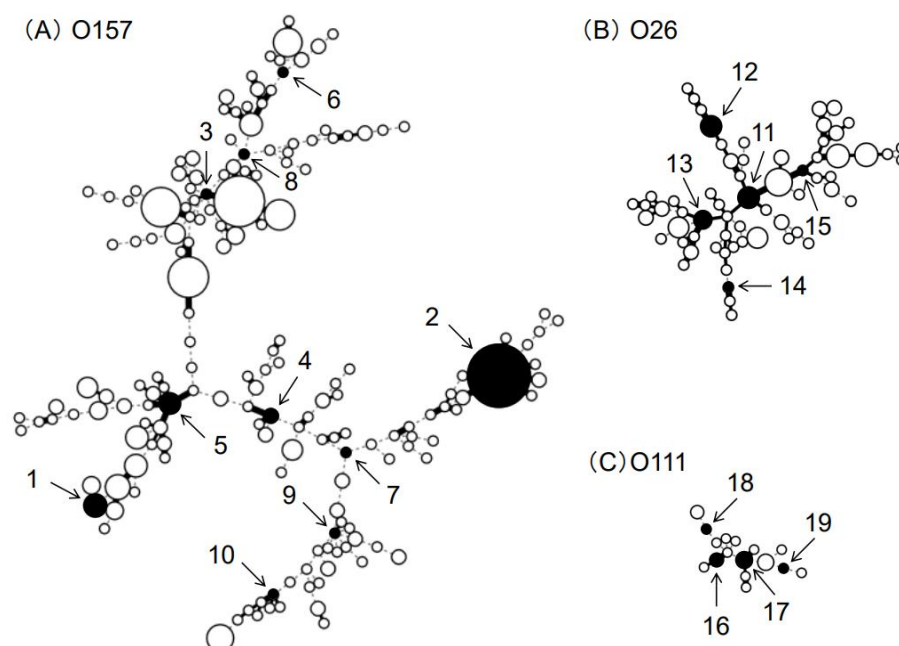


図1 継代培養によるタンデムリピート(TR)の変化頻度の調査に用いた19菌株の腸管出血性大腸菌(EHEC)

表1 継代培養によるTRの変化頻度の調査に用いたEHEC菌株

菌株	血清型	反復配列多型解析 (MLVA 法) においてプライマー-Mix1 で検出する領域									MLVA 法においてプライマー-Mix2 で検出する領域							
		EHC -2	O157 -25	O157 -9	EH157 -12	EH111 -8	EHC -1	EHC -5	O157 -3	O157 -34	EH26 -7	O157 -19	EH111 -11	EHC -6	O157 -37	O157 -17	O157 -36	EH111 -14
co161058	O157:H7	4	6	19	4	1	5	0	12	12	0	6	2	0	7	8	3	0
co161706	O157:H7	4	5	14	4	1	6	10	7	11	0	6	2	0	8	15	7	0
co161729	O157:H7	5	5	12	6	1	11	0	11	9	0	7	2	0	6	4	9	0
co171440	O157:H7	4	5	6	4	1	6	0	10	12	0	5	2	0	7	7	6	0
co180453	O157:H7	4	8	12	4	1	5	0	9	12	0	6	2	0	6	7	3	0
co181163	O157:H7	5	2	0	3	1	10	0	4	9	0	8	2	0	8	5	8	0
co190173	O157:H7	4	7	7	4	1	7	10	11	12	0	6	2	0	7	6	6	0
co190176	O157:H-	5	5	11	4	1	11	0	12	9	0	7	2	0	6	5	4	0
co190191	O157:H7	5	3	11	1	1	7	0	7	9	0	5	2	0	6	3	7	0
co190892	O157:H7	7	5	10	1	1	6	0	0	5	0	7	2	0	9	3	6	0
co150594	O26:H11	16	2	9	2	1	11	11	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co170503	O26:H11	16	2	9	2	1	9	2	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co182152	O26:H11	25	2	9	2	1	10	0	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co190202	O26:H11	14	2	8	2	1	12	0	0	1	3	1	2	5	6	0	0	1
co190205	O26:H-	13	2	8	2	1	8	0	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co152166	O111:H-	10	2	10	2	5	14	0	0	3	0	1	4	3	9	0	0	1
co152173	O111:H-	6	2	9	2	5	14	0	0	3	0	1	4	3	6	0	0	1
co173040	O111:H-	13	2	11	2	8	6	0	0	3	0	1	3	3	9	0	0	1
co182158	O111:H-	6	2	14	2	5	8	10	0	3	0	1	4	3	7	0	0	1

表2 継代培養によるEHEC菌株のTRの変化

菌株	O 血清型	各継代数において TR 数が変化、または、 非特異的な遺伝子増幅があったコロニー数			
		5 継代	10 継代	15 継代	20 継代
co161058	O157	0	0	0	0
co161706		0	0	0	1 ^a
co161729		0	0	0	0
co171440		0	0	0	0
co180453		0	0	0	0
co181163		0	0	0	0
co190173		0	1 ^a	0	2 ^b
co190176		0	0	0	0
co190191		0	0	0	0
co190892		0	0	1 ^c	1 ^a
co150594	O26	0	0	1 ^c	0
co170503		0	2 ^d	1 ^d	1 ^d
co182152		0	0	0	0
co190202		5 ^e	5 ^e	5 ^e	5 ^e
co190205		0	0	0	0
co152166	O111	1 ^f	0	0	0
co152173		0	0	0	0
co173040		0	0	0	0
co182158		0	0	0	0
計	-	6	8	8	10

^a 領域157-10においてタンデムリピート数が変化。

^b 領域EHC-2においてタンデムリピート数が6から7に増加。

^c 領域O157-3においてタンデムリピートと誤って判定される非特異的なピークが出現。

^d 領域EHC-1においてタンデムリピート数が9から2に減少。

^e 領域O157-37においてリピート数を判定できないピークが検出される。

^f 領域EHC-1においてタンデムリピート数が15から14に減少。

表3 継代培養による各領域でのTRの変化

領域	プライマーセット	TR 数の変化、または、非特異的な遺伝子増幅が 検出された菌株(継代数)
EHC-2	Mix1	co190173(20)
O157-25		-
O157-9		-
EH157-12		-
EH111-8		-
EHC-1		co152166(5)、co170503(10、15、20) ^a
EHC-5		-
O157-3		co190892(15) ^b 、co150594(15) ^b
O157-34		-
EH26-7	Mix2	-
O157-19		-
EH111-11		-
EHC-6		-
O157-37		co190202(5、10、15、20) ^c
O157-17		-
O157-36		-
EH111-14		-
O157-10		co190173(5)、co161706(20)、co190892(20)

^a TR数が9から2に減少。

^b TRと誤って判定される非特異的なピークが出現。

^c リピート数を判定できないピークが検出される。

表4 DNAの保存温度・期間と領域O157-34におけるTRの増幅効率の関係

温度	DNA 2 ng/μl の C _T 値(検出限界濃度)		
	1 日間	2 日間	3 日間
冷凍	21.84 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)	22.13 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)	20.74 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)
冷蔵	21.86 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)	21.03 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)	20.51 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)
常温	21.75 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)	21.80 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)	21.61 (2 x 10 ⁻⁴ ng/μl)

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
Kimata K, Lee K, Watahiki M, Isobe J, <u>Ohnishi M</u> , Iyoda S.	Global distribution of epidemic-related Shiga toxin 2 encoding phages among enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> .	Sci Rep.	10	11738	2020
Kato H, Yahata Y, Hori Y, Fujita K, Ooura N, Kido T, Yoshimoto K, Matsui T, Izumiya H, <u>Ohnishi M</u> , Oishi K.	A shigellosis outbreak associated with a sports festival at a kindergarten in Kitakyusyu City, Japan	J Infect Chemother.	26	1146-1151	2020
Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, <u>Ohnishi M</u> .	Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for non-O157 Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> : focus on serogroups O103, O121, O145, O165, and O91.	Jpn J Infect Dis.	73	481-490	2020

令和3年4月13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



次の職員の令和2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 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
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□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3年3月10日

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 石橋 達朗 印



次の職員の令和2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 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
- 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		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3年4月13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 隆宇



次の職員の令和2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 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
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 正富 (スナガワ マサトミ)

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。

令和 3 年 3 月 19 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広



次の職員の令和2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 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部・部長
(氏名・フリガナ) 工藤 由起子 (クドウ ユキコ)

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。

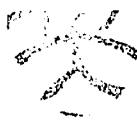
5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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3月26日

令和2年度厚生労働科学研究費
研究者 工藤 由起子 殿

国立医薬品食品衛生研究所長 奥田 晴宏



利益相反委員会における審査の結果について

貴殿よりご報告いただいた利益相反管理のための自己申告書の内容について、令和2年3月16日に開催された利益相反委員会において審査を行った結果を、下記のとおりお知らせいたします。

(事業名) 食品の安全確保推進研究事業
(課題名) 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究

記

自己申告書に記載された内容又は令和2年度厚生労働科学研究費の研究課題に関して、利益相反委員会から改善に向けた特段の措置等の意見は示されませんでした。

ただし、利益相反管理における一般的事項として、以下の点について、留意願います。

- 1) 厚生労働科学研究が企業や団体の意向によってその公正性・信頼性を損なうことなく進められていることが適切に説明できること。
- 2) 厚生労働科学研究の研究成果がどのように取りまとめられるのか、そのプロセスについて適切に説明できること。
- 3) 産学官連携活動による研究成果がどのような形で資金提供側に提供されるのか契約上明確になっているとともに、産学官連携活動として実施される官民共同研究以外の厚生労働科学研究とは明確に区別して研究が進められていることが適切に説明できること。

なお、研究者は、例えば圧力により研究成果の客観性をゆがめることがあってはならないことなどを定めた国立医薬品食品衛生研究所研究者倫理規準を遵守すべきであることを念のため申し添えます。

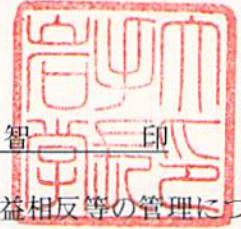
事務局：総務部業務課

厚生労働大臣 殿

機関名 岩手大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 小川 智 印



次の職員の令和2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 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 農学部共同獣医学科 教授
(氏名・フリガナ) 寺嶋 淳 (テラジマ ジュン)

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input checked="" 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)

未審査である理由は、令和2年度においてはまだ人由来の分離株を用いた研究を実施していないため。

(※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3年4月13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



次の職員の令和2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 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
- 2. 研究課題名 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
- 3. 研究者名 (所属部・職名) 感染症危機管理研究センター・主任研究官
(氏名・フリガナ) 平井 晋一郎・ヒライ シンイチロウ

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。