

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3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

令和4年（2022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3年度 総括・研究分担報告書

目次

I. 令和3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3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	10
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 実地疫学研究センター	14
3. 食品由来株の収集	
研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所	17
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	27
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 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	46
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57

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700株について解析し型名を付与した。このうち約6割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。2014-2020年の集団事例株のMLVAデータを解析し、各遺伝子座の変動を明らかにした。

最適なSNP解析条件を検討するために、参照配列と解析するデータセットの2条件が型別能に与える影響について、EHEC O76:H7およびO111:H8の全ゲノム配列データをもとに検討した。この結果、近縁株を参照配列に用いて、近縁株のみで解析した場合に型別能が最大になることが明らかとなった。さらに参照配列の選択よりも、近縁株のみで解析することの方が、型別能に与える影響が大きいことが示された。

分担研究者の成果の概略も併せて示す。

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 (国立感染症研究所実地疫学研究センター・センター長)

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危機管理研究センター・主任研究官)

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）のサーベイランスではこれまでパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）が主要な解析手法であったが、2018年6月29日付の厚生労働省事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により、反復配列多型解析（multi locus variable tandem repeat analysis : MLVA）法が血清群 O157、O26、O111 の統一手法として用いられている。本研究では全国の MLVA による解析結果の総括並びに、事務連絡に基づいて送付された地方衛生研究所からの MLVA データについて解析を行った。

また、近年 EHEC 菌株の解析に全ゲノム配列（whole-genome sequence : WGS）が広く用いられるようになってきているが、解析手法によって結果が異なることが知られている。例えば、参照配列として近縁株を用いた方がコアゲノムサイズが大きくなるため、より多数の単一塩基多型（single nucleotide polymorphism : SNP）が検出される可能性があるが、定量的に示した報告は少ない。そこで、参照配列と解析するデータセットの2条件が型別能に与える影響について、EHEC O76:H7 および O111:H8 の WGS データをもとに検討した。

## B. 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。

### EHEC 調査における最適な SNP 解析法の検討

EHEC O76:H7 および O111:H8 の菌株を対象に、より高精度な SNP 解析法の検討を行った。SNP 解析時には、参照配列および解析を行うデータセットが重要と考えられたため、それぞれに複数の条件を設けて解析を行った。O76:H7 では、参照配列として、近縁（O76:H7 JNE132847 株の完全長ゲノム配列）または遠縁（O157:H7 Sakai 株）の2株を用いた。データセットとしては、多様な大腸菌を含む 34 株（O76:H7 8 株を含む）または O76:H7 8 株のみでの解析、の2条件で行った。O111:H8 の解析では、計 878 株分のゲノムデータを用いた。この中には 79 事例のクラスター（疫学関連のある事例）が含まれており、このうち 10 株以上のクラスター15 事例を対象とした。参照配列としては、O111:H8 の代表株（11128 株）、クラスター内の株、または O157:H7 Sakai 株の3種を用いた。データセットとしては、O111:H8 878 株をまとめて解析、またはクラスター内の株のみで解析、の2条件を設けた。

SNP 解析は、BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインを用いて行った。

## C. 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、2430 株について分子型別解析を実施した。このうち 2058 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 85 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 526、O26 が 160、O111 が 71、O103 が 44、O121 が 16、O145 が 10、O165 が 6、O91 が 29 であった。得られたデータは 2022 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 684 株であった。このうち 416 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 92% 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)。

2014-2020 年に発生した集団事例のうち、菌株数 10 以上の事例 97 件、約 2500 株について、各事例内で各遺伝子座の標準偏差を算出した、その分布を図 2 に示す。各遺伝子座の分布について 95 パーセントイル値は  $x$  で示した。

### EHEC 調査における最適な SNP 解析法の

## 検討

O76:H7 を用いた解析における条件ごとの最尤法系統樹を図 3 に示す。最も型別能が高い (系統樹の枝の長さが長い、株間の SNP 数が多い) 条件は、参照配列として O76:H7 を参照配列として用い、同血清型のみで解析を行った場合であった (図 3D)。しかし、O76:H7 を参照配列として用いた場合でも、遠縁な株を含めて解析した場合には最も型別能が低くなった (図 3C)。一方で、参照配列が別血清型 (O157:H7 Sakai) であっても、O76:H7 のみで解析を行った際には、2 番目に高い型別能となった (図 3B)。

O111:H8 の解析では、同血清型代表株を参照配列として全株を解析した条件を基準に、他の条件との比較を行った。その結果、クラスター内の株のみで解析した場合には参照配列が代表株の場合でも、クラスター内の場合でも SNP 数の増加分に大きな違いは見られなかった (図 4)。一方で、参照配列を別血清型 (O157:H7 Sakai) とした場合には、参照配列が O111:H8 代表株である場合と比べて型別能が劣る例も認められた。

## D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年とほぼ同等であった。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 700 株に上った。このうち約 6 割の株が、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 92% 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概ねないと考えられた。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。

集団事例株を用いて MLVA の遺伝子座の変動を解析した。最も変動が大きかったのは EHC-6 であり、次いで O157-37 であった。これらはプラスミド上にあり、そのために変動が大きいことが推測された。しかしながら、同じくプラスミド上にある O157-36 ではほとんど変動は見られなかった。各遺伝子座の変動を精査することで、MLVA に基づくクラスター探知の精度向上につながることを期待される。

サーベイランスに用いる SNP 解析法の検討では、近縁な株を参照配列とし、近縁な株のみで解析することでより型別能の高い解析が行えることが示された。O111:H8 の解析からは、参照配列として用いるのが同一血清型であれば、クラスター内の株を参照配列として用いた場合と比べて同等の型別能が認められることが明らかとなった。完全長ゲノム配列を参照配列に用いることの利点は、組換え領域等をエラーが起りやすい領域をより正確に除けることであるが、本解析では型別能に大きな影響は与えなかった。また、用いるデータセットの影響は、参照配列の影響よりも大きいことが O76:H7 の解析から明らかとなった。これは、遠縁な株を解析に含めることでコアゲノムサイズが小さくなる結果であると考えられる。集団感染等の調査の際には、まず全体的な系統解析を行い、次に近縁株のみで解

析をするといった段階を踏んだ解析が必要になると考えられた。

## E. 結論

MLVA 法は迅速性、精微性に優れた分子型別手法であり、MLVA リストを共有することで広域食中毒等の早期探知に有効である。地衛研から送付される MLVA データは迅速性の向上に重要であり、今後も当該データの信頼性確保のため、モニタリング等の方策が必要である。

SNP 解析の手法としては、解像度を高めた解析のためには、全体的な系統解析後、近縁株のみを抽出し再解析するといった解析パイプラインが必要と考えられた。

## 分担研究の概略

### 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発(林 哲也)

国内・国外分離株の WGS データの収集・解析とデータベース構築が順調に進んだ。収集数は、026 (540 株：国内株は 314)、0145 (246 株：国内株は 88)、0121 (638 株：国内株は 211 株)については、収集数に大きな変化はないが、0121 に関して、このデータセットの解析結果を論文発表した。また、0145 に関しては、既に収集したデータの詳細な解析から、prophage-in-prophage という新たな現象を見出し論文発表がなされた。

O157:H7、O103:H2、O165:H25 に関しては、O157:H7 では 7,146 株 (国内は 3,176 株)、O103:H2 では 2,701 株 (国内は 200 株) O165:H25 では 202 株 (国内は 71 株) と、海外株を中心に大幅に情報を拡張された。

0157:H7 に関しては、海外株の情報だけでなく、2020 年の国内分離株の大部分を網羅する 623 株の WGS 情報を研究代表者との連携によりデータベースに組みこまれた。0157 の中で特に病原性が高いと推察されている Clade 8 株に関しては、別途収集・整備と解析を行なわれており、昨年度までに収集した株(511 株:国内株は 150)の詳細な解析とともに、亜系統を代表する 18 株を選び、ロングリードを用いたハイブリッドアッセムブリにより完全長配列を取得した。0103:H2 に関しても国外株の情報を大幅に充実させるとともに、完全長配列を追加取得された。諸外国における WGS の活用状況等の調査からは、食中毒調査のための WGS データの利用方法・手法について未だコンセンサスが得られていない。分担研究者 林からは、我が国の現状を踏まえた上でコア遺伝子セットの配列に基づく cgMLST を利用するのが妥当ではないかと提案された。最終年度においては、地方衛生研究所における具体的な実施工程を提案し、課題の抽出とそれらの課題の解決策の提案を実施する予定である。

#### 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 (平井 晋一郎)

順調に精度管理手法が進んだ。

EHEC 0157、026 及び 0111 の菌株及び DNA を一部の地衛研に配布して MLVA 法の精度管理プレ試験が行われた。その結果、9 施設は全検体について正解だったが、1 施設が 1 検体でフラグメント解析ソフトの使用法に問題があり不正解の回答が得られた。最終年度、全国規模で精度試験を行う

準備が整ったが、解析ファイルを正しく利用できるかを検証できる検体を配布することで、意義深い精度管理が実施できると考えられる。

#### 食品由来株の収集 (工藤由起子)

食品由来 EHEC 株の解析を進めた。

令和 3 年度に MLVA 解析に供試した菌株は、由来ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であった。しかし、寒天培地上での生育には違いが認められたことから、MLVA 型が同一の菌株でも性質が単一でないことが示唆された。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品検体における STEC の MLVA 型多様性の解析を進める予定である。

#### 動物由来株の収集と分子型別 (寺嶋 淳)

牛、豚の直腸検体より、*stx* 遺伝子の検出および、STEC の分離が精力的に進められた。

牛の直腸便 591 検体及び豚 178 検体が対象となった。

牛では、*stx* 陽性率は 23.7%となり、35 検体から 39 株が分離された。病原因子、薬剤感受性の観点から公衆衛生学的に対応が求められるような菌株の検出は少数にとどまった。一方、農場や都道府県をまたいで拡散している遺伝学的に近縁と考えられる菌株が検出されたことが報告された。

豚では、*stx* 陽性率は 48.9%となり、15 検体から 16 株が分離された。得られた株は全て浮腫病原因 STEC と考えられる株であり、公衆衛生学的に迅速な対応が求められる菌株は検出されなかった。豚由

来 STEC について日本国内における報告は限られているため本調査を継続することの意義は高い。

### 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 (砂川 富正)

NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知は安定して稼働してきた。ただし、新型コロナ禍の中で、EHEC 発生数に変化が見られており、異常値探知のためのベースラインの再考が必要かもしれない。2022 年度において、新しいベースラインを検討する。

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。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として上げられた。また、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。また、地理的課題を解決出来るような機器の導入や利用も重要であると考察された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1) 誌上発表

1. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真：2020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42巻、96-

97、2021年5月

2. 李謙一、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：国内で分離された腸管出血性大腸菌の全ゲノム配列データベース化と食中毒事例の解析。IASR、第42巻、97-98、2021年5月

#### 2) 学会発表

泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真、明田幸宏：腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析 (2018-2020 年)。第 42 回日本食品微生物学会学術総会、2021 年 9 月、オンライン。

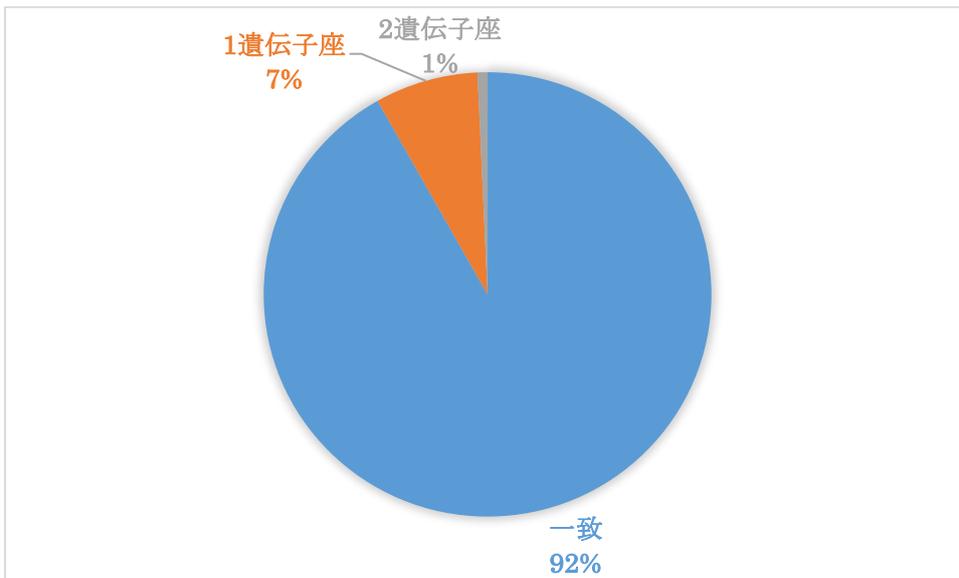
### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

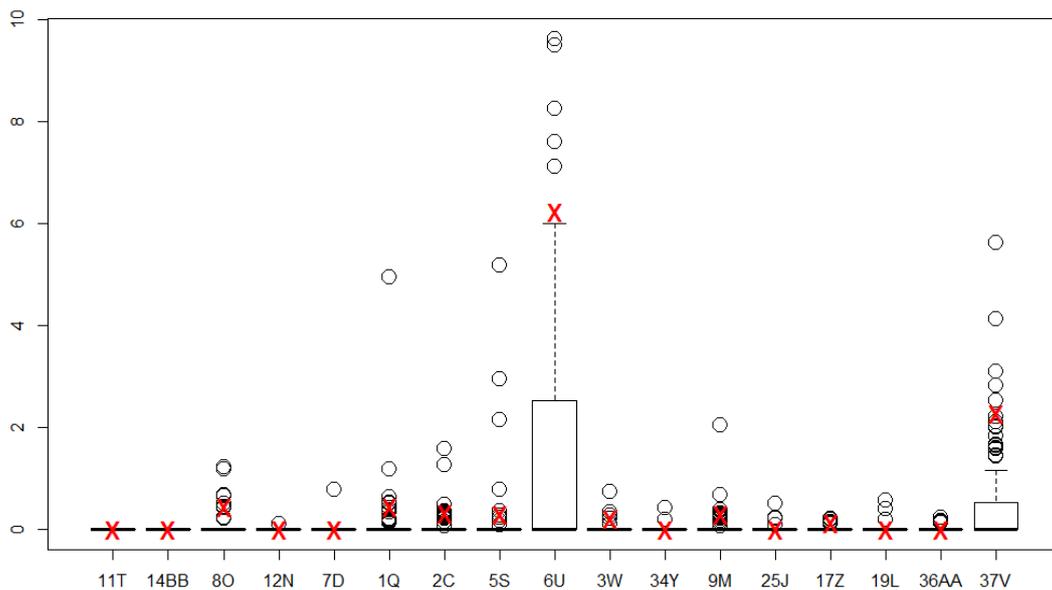
なし

#### 2. 実用新案登録

なし

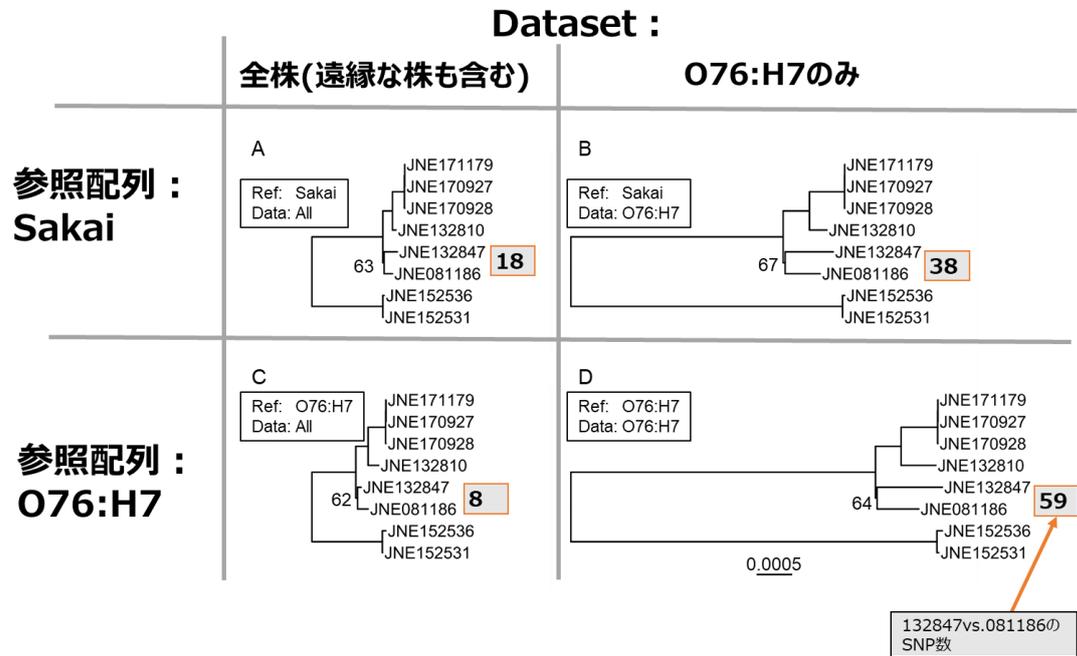


**図 1. 送付 MLVA データと菌株データの結果の比較**  
一致、1 遺伝子座違い、2 遺伝子座違いを表す



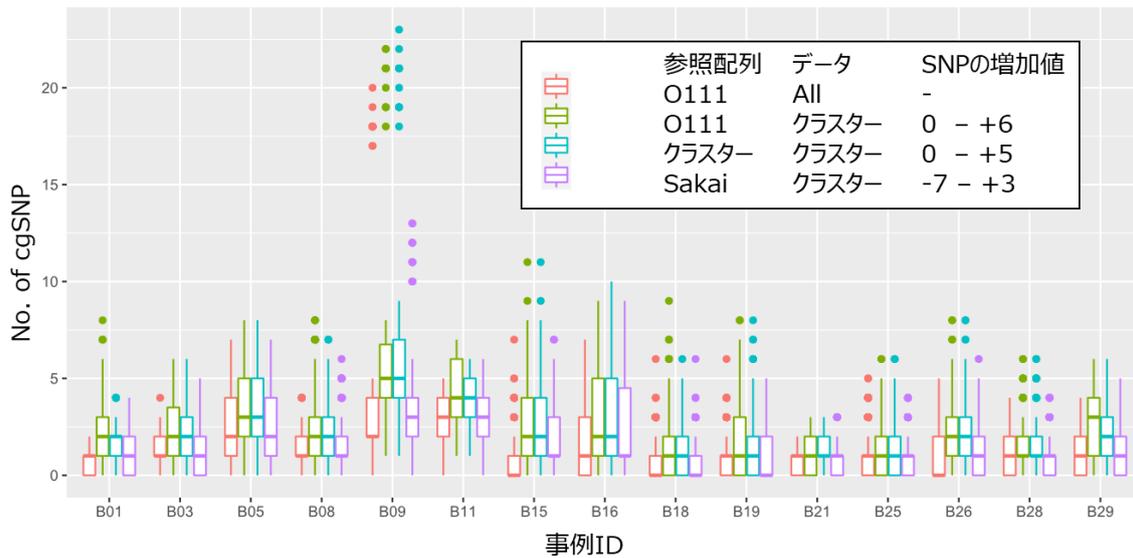
**図 2. 集団事例内のリピート数標準偏差の分布 (x は 95 パーセンタイル値)**

左から E111-11, E111-14, E111-8, EH157-12, EH26-7, EHC-1, EHC -2, EHC-5, EHC-6, O157-3, O157-34, O157-9, O157-25, O157-17, O157-19, O157-36, O157-37 を表す



**図 3. SNP 抽出条件ごとの O76:H7 の最尤法系統樹**

参照配列としては、O76:H7 代表株 (JNE132847 株) および O157:H7 Sakai 株の 2 種を用いた。解析データは、多様な大腸菌を含むデータセットおよび O76:H7 のみの 2 条件を用いた。四角内の数字は、型別能の例として JNE132847 および JNE081186 株間の SNP 数を示した。



**図 4. O111:H8 における集団感染クラスター別の SNP 数を示した箱ひげ図**

参照配列としては、O111:H8 代表株（11128 株）、クラスター内の株、O157:H7 Sakai 株の 3 種を用いた。解析データは、O111:H8 全株（878 株）およびクラスター内の株のみの 2 条件を用いた。注釈中の SNP の増加値とは、参照配列として O111:H8 代表株を用いて全株で解析を行った際のデータと比べた時の、SNP 数の差異を示したものである。

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。本研究班は、MLVA に関する蓄積データの検証や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などを行うとともに、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ことを目的としている。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、昨年度に引き続き、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、欧米における WGS の活用状況、使用解析パイプラインやデータベース等の調査を行うとともに、我が国での活用法について検討した。これと並行して、昨年度までに収集している国内分離株の WGS データの整理を進めるとともに、本研究班代表者らが既に収集している分離株の WGS データを追加取得し、公共データベース（NCBI/EMBL/DBJ と ENTEROBASE）からの WGS データの追加収集も行った。さらに参照配列になりうる株については、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、O111 以外の主な血清型の EHEC の WGS 情報に関するデータベースの構築と更新を行なった。

#### 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 MLVA 法を用いた解析が主に行われている。本研究班の目的の 1 つは、MLVA についての蓄積データの検証や地方衛生研究所での利用促進のための精度管理手法の確立等であるが、もう一つの目的は「EHEC 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、この課題を担当している。本分担課題は、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目指している。これと並行して、これまで（DB）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して EHEC の WGS 情報 DB を構築し、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ことを目標としている。また、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こととなっているため、本分担者は、これらの食品・動物分離株の WGS データ収集を随時サポートし、必要に応じて、上記の WGS 情報 DB に組み込んで解析する役割も担っている。

## 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 DB の必要要件等を明らかにするため、昨年度に引き続き、諸外国（英国、他のヨーロッパ諸国、米国、カナダ）における WGS の活用状況、解析パイプラインや DB 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、WGS データの取得方法、解析法と解釈の基準、利用している DB、データフォーマット等を、論文情報を基に調査した。

(2) 昨年度に引き続き、既に蓄積されている国内分離株の WGS データの収集と整理を行なった。また、一部の血清型については、分担者あるいは本研究班の代表者らによって新たに WGS 情報を算出した。また公共 DB（NCBI/EMBL/DBJ と ENTEROBASE）からデータを追加収集した。WGS 情報の取得は、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。参照配列になりうる株等については、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。また、この解析を通じて、完全長配列取得のためのパイプラインについて比較検討を行った。

（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 の活用状況、解析パイプラインや DB 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：

シーケンシングの主流は、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ことには変化はない。中国製（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一部には見られるが、論文レベルでは使用が拡大している様子はない。ロングリードシーケンサの利用も研究面にとどまっており、一般のサーベイランスでの利用はまだ行われていない。

解析パイプラインは、昨年度に報告したように、研究機関によって様々であり、WGS の取得には、i) 参照配列に対するリードマッピング、ii) リード配列のアッセン

ブリのいずれかであり、後者で使用されるアセンブラには SPAdes と Velvet が多く使われているという現状も変化がない。ただし、小規模な解析では CLC のアセンブラが、また国内（分担者も含む）では Platanus も使用されている。WGS を用いた実際の解析では、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) コアゲノムあるいはコア遺伝子の配列に基づく cgMLST (core gene Multi Locus Sequence Typing) または wg (whole genome) MLST のいずれかが使用されている。集団事例に関連するクローンの判定基準については、コアゲノムまたはコア遺伝子の SNP 距離 (5 SNPs など) 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まだ得られていないのが現状である。この点は、各血清型で使用されるコアゲノムあるいはコア遺伝子についても同様で、こういった配列あるいは遺伝子を使うかについては、国際的なコンセンサスは得られていない。

国内で使用すべき解析パイプラインに関してはまだ検討段階である。

(2) 国内・国外分離株の WGS データの収集・解析とデータベース構築：

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、026 (540 株：国内株は 314)、0145 (246 株：国内株は 88)、0121 (638 株：国内株は 211 株) については、収集週に大きな変化はないが、0121 に関しては、このデータセットの解析結果を論文発表した。また、0145 に関しては、既に収集したデータの詳細な解析から、prophage-in-prophage という新たな現象を見出し論文発表した。

0157:H7、0103:H2、0165:H25 に関しては、0157:H7 では 7,146 株（国内は 3,176 株）、0103:H2 では 2,701 株（国内は 200 株）0165:H25 では 202 株（国内は 71 株）と、海外株を中心に大幅に情報を拡張した。0157:H7 に関しては、海外株の情報だけでなく、2020 年の国内分離株の大部分を網羅する 623 株の WGS 情報を研究代表者から分与してもらいデータベースに組み込んだ。0157 の中で特に病原性が高いと推察されている Clade 8 株に関しては、別途収集・整備と解析を行っており、昨年度までに収集した株 (511 株：国内株は 150)

の詳細な解析とともに、亜系統を代表する 18 株を選び、ロングリードを用いたハイブリッドアッセムブリにより完全長配列を取得した O103:H2 に関しても国外株の情報を大幅に充実させるとともに、完全長配列を追加取得した。また、これらの完全長配列決定の中で、ハイブリッドアッセムブリのための解析パイプラインの有効性と精度に関する比較検証を行い、MicroPIPE と PolyPolish(いずれも昨年度に発表) の組み合わせが現時点では最も優れていると判断した。

O103:H2 に関しては、近縁株を含めた系統解析の過程で、ST17 complex として、O 抗原型が異なる近縁株も含めた解析が必要であることが判明したため、上記の O103:H2 に加えて、40 の血清型/69 の ST に属する 3,387 株の WGS 情報を追加収集し、これらの株を含めた大規模解析を開始した。類似の解析は、他の血清型においても検討する必要があると思われる。

この他、収集した菌株の特性解析に必要な Stx2 定量法の開発も行い、論文発表した。

#### D. 考察

(1) 諸外国における WGS の活用状況、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り、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ることには変わりがないが、集団事例に関連するクローンの判定基準についても、各血清型で使用するコアゲノムあるいはコア遺伝子で、どういった配列や遺伝子を使うかについては、国際的なコンセンサスは得られていない。国内で使用すべき解析パイプラインに関してもまだ検討段階であるが、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ためには、国際的な動向を注視していく必要がある。分担者個人の現在の見解としては、コア遺伝子セットの配列に基づく cgMLST が地方衛生研究所などでは最も取り入れやすい手法と考える。

(2) 国内・国外分離株の WGS データの収集・解析とデータベース構築：

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・整理を進めているが、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タが必要である。また、データ重複やクオリティの問題等があるため、収集したデータについても、整理作業を行っていく必要がある。昨年度の報告書にも記載したように、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が、まだその作業には至っていない。参照配列となりうる代表株に関しては、ロングリード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が、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、既存のハイブリッドアッセムブリのプログラムの有効性と精度が問題となる。この点に関しては MicroPIPE と PolyPolish の組み合わせが現時点では最も優れていると判断できる。

#### 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、集団事例に関連するクローンの判定基準や、各血清型で使用するコアゲノムあるいはコア遺伝子については国際的なコンセンサスは得られていないため、今後の海外での動向を注視していく必要がある。

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・整理を進め、O157:H7、O103:H2、O165:H25 については海外株を中心に大幅に情報を拡張した。O103:H2 に関しては、ST17 complex として、O 抗原型が異なる近縁株も含めた解析が必要であることが判明し、O103:H2 に加えて、40 の血清型/69 の ST に属する 3,387 株の WGS 情報を追加収集したが、他の血清型においても類似の解析を行う必要性の有無を検討する必要がある。

参照配列となりうる代表株に関しては、ロングリードを用いた完全長あるいはそれに近い高精度配列の取得を進め、その過程で、ハイブリッドアッセムブリプログラムの有効性と精度に関しては、MicroPIPE と PolyPolish の組み合わせが現時点では最も優れていると判断した。

#### F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Nakamura K, Ogura Y, Gotoh Y, Hayashi T.: Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in *Escherichia coli*, PLoS Pathogens, 17(4):e1009073, 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1009073.

(2) Nakamura K, Tokuda C, Arimitsu H, Etoh Y, Hamasaki M, Deguchi Y, Taniguchi I, Gotoh Y, Ogura Y, Hayashi T.: Development of a homogeneous time-resolved FRET (HTRF) assay for the quantification of Shiga toxin 2 produced by *E. coli*. PeerJ, 9:e11871, 2021, doi: 10.7717/peerj.11871.

(3) Nishida R, Nakamura K, Taniguchi I, Murase K, Ooka T, Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Toyoda A, Mainil JG, Piérard D, Seto K, Harada T, Isobe J, Kimata K, Etoh Y, Hamasaki M, Narimatsu H, Yatsuyanagi J, Kameyama M, Matsumoto Y, Nagai Y, Kawase J, Yokoyama E, Ishikawa K, Shiimoto T, Lee K, Kang D, Akashi K, Ohnishi M, Iyoda S, Hayashi T.: The global population structure and evolutionary history of the acquisition of major virulence factor-encoding genetic elements in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121:H19, Microbial Genomics, 7(12):000716, 2021.

doi: 10.1099/mgen.0.000716.

### 2. 学会発表

(1) 林哲也(招待講演):ゲノム解析を基盤とした細菌学遺伝的多様性に関する研究, 第95回日本細菌学会総会, 2022 (R3) 年

3月30日, 東京, オンライン.

(2) 林哲也(特別講演):細菌感染症とゲノム解析について, 2021 (R3) 年 11 月 25 日, 令和 3 年度地方衛生研究所地域専門家会議(地域保健総合推進事業), 太宰府市(福岡県保健環境研究所).

(3) 林哲也(招待講演):次世代シーケンサ(NGS)の活用によって進展する細菌ゲノムの進化・多様性解析, 2021 (R3) 年 8 月 21 日, 2021 年第 41 回阿蘇シンポジウム, 阿蘇市.

(4) 林哲也(特別講演):大規模ゲノム解析から紐解く細菌の多様性, 2021 (R3) 年 6 月 12 日, 2021 年度日本生化学会九州支部例会, 久留米, オンライン.

(5) 矢野文悟, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 中村佳司:腸管出血性大腸菌 O26:H11 ST21 系統における Stx1 ファージのゲノム多様性, 第 95 回日本細菌学会総会, 2022 (R3) 年 3 月 29-31 日, 東京, オンライン.

(6) 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 李謙一, 大岡唯祐, 小椋義俊, 大西真, 伊豫田淳, 林哲也:大腸菌 O103:H2 国内分離株とデータベース株を用いた高精度系統解析及び完全長配列決定株のゲノム構造比較, 第 95 回日本細菌学会総会, 2022 (R3) 年 3 月 29-31 日, 東京, オンライン.

(7) 中村佳司, 瀬戸和子, 磯部順子, 林哲也:挿入配列の切り出しによる大腸菌 O121:H19 の乳糖分解性の再活性化, 第 95 回日本細菌学会総会, 2022 (R3) 年 3 月 29-31 日, 東京, オンライン.

(8) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 小椋義俊, 大西真, 伊豫田淳, 林哲也:完全長配列を用いた EHEC O157 c1 ade 8 のゲノムと Stx2 ファージの多様性解析, 第 95 回日本細菌学会総会, 2022 (R3) 年 3 月 29-31 日, 東京, オンライン.

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3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	(国立感染症研究所実地疫学研究センター・センター長)
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	(国立感染症研究所実地疫学研究センター・主任研究官)
研究協力者	加納 和彦	(国立感染症研究所品質保証・管理部・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	(国立感染症研究所実地疫学研究センター・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。2019年、2020年、2021年について、それぞれ広域事例早期探知システムによる厚生労働省への情報提供はそれぞれ4回、1回、0回と減少傾向であり、ベースラインの検討が必要な可能性が示唆された。

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行ってきた。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。なお、広域事例早期探知システムによるアラートの発出を全国規模での分析をベースとして行ううえで、遠隔地からの情報収集が運用面での課題となってきたことから、その改善に取り組むことも

一つの目標となった。

## 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

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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>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<sup>2)</sup>を踏襲した。

## C. 研究結果

### (A) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知

2019 年から 2021 年にかけてのアラート発出に関する状況について述べる。最終的にレベル 3 以上まで到達した事例は 2019 年（6 月以降）で 5 回、2020 年で 2 回、2021 年で 1 回であった。厚生労働省（食品監視安全課及び結核感染症課）への情報提供はそれぞれ 4 回、1 回、0 回であり、その理由と共に表に示す。

表. 各年のレベル 3 以上の情報探知と厚生労働省への情報提供の回数

2019年（6月以降） レベル3以上 5回（本省への情報提供4回）				
探知した週	O血清型VT毒素型	探知時レベル	本省への情報提供	備考
第19週	O157VT1VT2	3	なし	分析の遅れや報告の増加傾向が認められたことから、様子見とした
第20週	O26VT2	3	あり	分析より前に監視チームが探知、広域発生疑いの可能性を考慮し早めの情報提供を行った
第36週	O145VT2	3	あり	報告発生後に疑いがもたられたことから早めの情報提供を行った
第44週	O157VT1VT2	4	あり	探知時レベル4のため早期情報提供を行った
第46週	O157VT2	3	あり	性別・年齢分布の偏りや集団の増加傾向を考慮して早めの情報提供を行った
2020年 レベル3以上 2回（本省への情報提供1回）				
探知した週	O血清型VT毒素型	探知時レベル	本省への情報提供	備考
第38週	O157VT1VT2	3	あり	報告地の関東地方に偏っていたこと、年齢性別分布に偏りが見られたこと等を考慮し、早急の情報提供を行った
第44週	O157VT2	3	なし	発生地等が不明に認められず、集団発生が認められなかったため、様子見とした
2021年（2021年10月18日現在） レベル3以上 1回（本省への情報提供0回）				
探知した週	O血清型VT毒素型	探知時レベル	本省への情報提供	備考
第13週	O157VT1VT2	3	なし	当該な報告傾向は認められず、集団発生が認められなかったため、様子見とした

全国のデータ分析を元にした広域食中毒事例疑い早期アラートの検出を行っていくうえで、特に遠隔地において、腸管出血性大腸菌等の送付等

に時間を要するなどの課題を認めたことにより、細菌ゲノム解析機器を導入し、遠隔地であっても安定した結果を得ることについて目途がたった。農林水産省と連携した生産段階を含めた広域食中毒防止に関する活動に取り組むことは出来なかった。

## 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で数年間の状況を観察してきたが、2020 年、さらに 2021 年もアラート検出数は減少し、広域事例への実地対応の実績は無かった。ベースラインの見直しが必要か、検討が必要である。これまでのアラート閾値は 2019 年に用いたもの<sup>2)</sup>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。新型コロナウイルス感染症による発生頻度そのものへの影響を含めて、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必要な可能性がある。

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。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方法についても、引き続き重要な検討課題である。また、地理的課題を解決出来るような機器の導入や利用も重要である。今後どのように広域食中毒探知・対応を強化していくかについての模式図を図に示す。

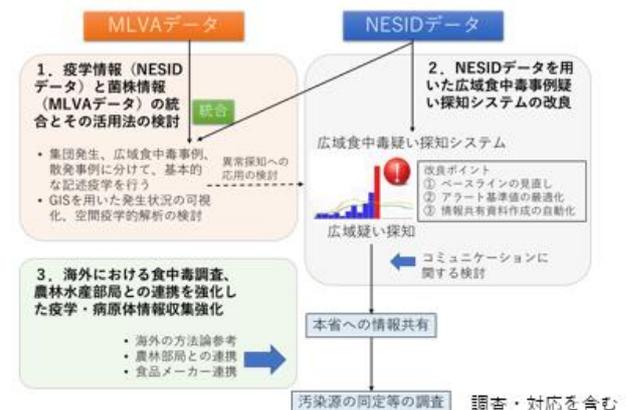


図. 今後の広域食中毒探知・対応強化の全体像

## 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3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）

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

研究代表者 大西真 国立感染症研究所

### 分担研究報告書

### 食品由来株の収集

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。本研究では食品から分離された志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の同一検体由来株間におけるMLVA型の多様性を明らかにするため、検体ごとに分離株の多様性を解析した。腸管出血性大腸菌食中毒事例D由来株30株のMLVA解析の結果、17遺伝子座の各リピート数が全株で同一であった。また、食品E（国産牛肉）から分離したSTEC 0157:H7 30株のMLVA解析の結果、17遺伝子座の各リピート数が全株で同一であった。加えて、食品F（国産牛肉）から分離したSTEC 0157:H7 30株のMLVA解析の結果、17遺伝子座の各リピート数が全株で同一であった。しかし、同一MLVA型の菌株であっても、腸管出血性大腸菌用選択分離培地上でのコロニーの生育性に違いが認められ、同一の性質ではないことが示唆された。患者と同一MLVA型の株を食品で調査する際には、株の多様性を想定して複数の選択分離培地の使用が有用であると考えられる。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品検体におけるSTECのMLVA型多様性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、昨年度に引き続き、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。加えて国産牛肉から STEC の分離を試み、同一検体からの分離株について同

様に MLVA 型の多様性を検討した。

### 1) 菌株

食中毒事例 D 由来の腸管出血性大腸菌 0157:H7 を 30 株、食品 E 由来の STEC 0157:H7 (*eae* 陽性) を 30 株、食品 F 由来の STEC 0157:H7 (*eae* 陽性) を 30 株、合計 90 株を供試した (表 1)。食中毒事例 D は 2009 年 8 月から 9 月にかけて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は 16 自治体で 37 名認められた。食品 E 由来株および食品 F 由来株は国産牛肉の培養液から国衛研にて分離した。

### 2) DNA 抽出

カジトン培地に保存していた株を Tryptone soya agar (OXOID) に画線し、37°C にて 18 時間培養した。滅菌爪楊枝でコロニーを釣菌し、わずかに濁る程度の量を滅菌蒸留水 100  $\mu$ l に懸濁した。ヒートブロックで 100°C 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 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

2 種類のプライマーミックスを調製した (表 2)。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。各遺伝子座ごとのリポート数を菌株間で比較した。

#### 4) Stx サブタイプ型別試験

Scheutz らの PCR 法 (J Clin Micro, 2012 50(9)2951) に従い、分離された菌株が保有する Stx サブタイプ (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*) の型別を実施した。3)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) および (Applied Biosystems) を使用した。PCR 反応には HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) を使用した。Stx サブタイプ型別用のプライマーを用いた

(表 3)。95°C 15 分、94°C 50 秒—64°C 40 秒—72°C 60 秒 35 サイクル および 74°C 3 分で増幅反応させた後、PCR 産物の有無をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

#### 5) 腸管出血性大腸菌用分離培地での生育性

食中毒 D 由来株 30 株、食品 E 由来株 30 株および食品 F 由来株 30 株をカジトン培地からクロモアガー-STECC 培地、セフェキシムおよび亜テルル酸添加クロモアガー-STECC 培地 (CT-クロモアガー-STECC)、ソルビトール添加マッコンキー培地 (SMAC) およびセフェキシムおよび亜テルル酸添加 SMAC (CT-SMAC) にニードルで少量接種し画線した。画線した培地を 37°C で 22±2 時間培養した後にコロニー数をカウントしコロニー生育状況を観察して比較した。生育コロニーがない場合を「非生育」、生育コロニーが 20 個以下の場合を「生育少数」、生育コロニーが 21 個以上の場合を「生育多数」と判定した。

#### C. 研究結果

食中毒事例 D 由来の腸管出血性大腸菌 0157 菌株 30 株の MLVA 解析では、17 遺伝子座の各リポート数が全株で同一であった (表 4)。保有する Stx サブタイプは *stx1a* お

よび *stx2a* であった (表 1)。また、食品 E 由来の STEC 0157 菌株 30 株でも、17 遺伝子座の各リポート数が全株で同一であった (表 5)。保有する Stx サブタイプは *stx2a* のみであった (表 1)。さらに、食品 F 由来の STEC 0157 菌株 30 株でも、17 遺伝子座の各リポート数が全株で同一であった (表 6)。保有する Stx サブタイプは *stx2a* のみであった (表 1)。

菌株のクロモアガーSTEC、CT-クロモアガーSTEC、SMAC および CT-SMAC 上での生育状況を比較した。食中毒事例 D 由来の 30 株は、クロモアガーSTEC、SMAC、CT-SMAC 上ではほとんどの株で多数のコロニーの生育が認められたが、CT-クロモアガーSTEC 上では 30 株中 16 株で多数のコロニーの生育が認められ、残りの 14 株で少数のコロニーの生育が認められた (図 1)。また、食品 E 由来の 30 株は、クロモアガーSTEC、SMAC、CT-SMAC 上ではほとんどの株で多数のコロニーの生育が認められたが、CT-クロモアガーSTEC 上では 30 株中 11 株で多数のコロニーの生育が認められ、他の 11 株で少数のコロニーの生育が認められ、残りの 9 株は非生育であった (図 1)。さらに、食品 F 由来の 30 株は、クロモアガーSTEC、SMAC 上ではほと

んどの株で多数のコロニーの生育が認められ、CT-SMAC 上では多くの株で多数のコロニーの生育が認められたが、CT-クロモアガーSTEC 上では 30 株中 7 株で多数のコロニーの生育が認められ、他の 10 株で少数のコロニーの生育が認められ、残りの 13 株は非生育であった (図 1)。

#### D. 考察

本研究に供試した STEC は、現在の MLVA 解析で用いられている 17 遺伝子座の各リポート数が由来ごとに同一であることが示された。しかし、複数種類の寒天培地での生育性を比較すると、その生育状況には違いがあることが示され、同一 MLVA 型であっても性質が単一ではないことが示唆された。このため、患者と同一 MLVA 型の株を食品で調査する際には、株の多様性を想定すると複数の選択分離培地の使用が有用であると考えられる。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品内における MLVA 型の多様性の解析を進める予定である。また、今年度の MLVA 解析において、通常検出されるはずの EH111-8 のリポート数が検出されなかったため、次年度に改善する予定である。

#### E. 結論

令和 3 年度に MLVA 解析に供試し

た菌株は、由来ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であった。しかし、寒天培地上での生育には違いが認められたことから、MLVA 型が同一の菌株でも性質が単一でないことが示唆された。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品検体における STEC の MLVA 型多様性の解析を進める予定である。

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

図 1. 腸管出血性大腸菌用分離培地上での供試菌株の生育性

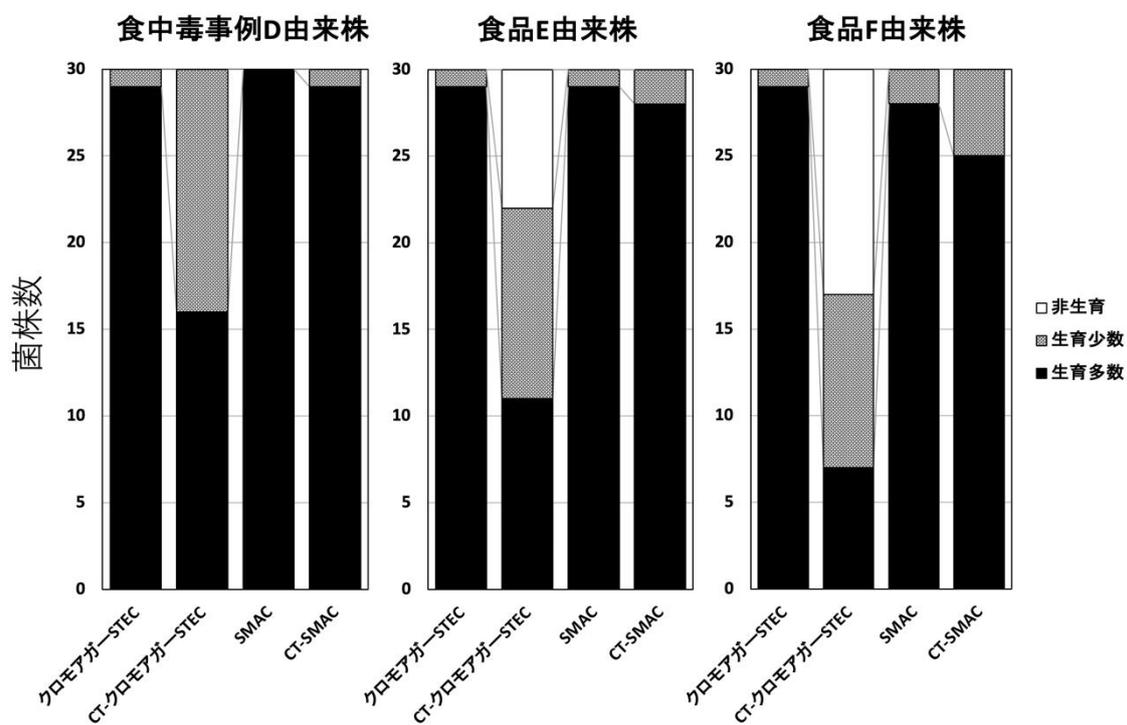


表 1. 供試菌株

菌株	血清型	菌株数	Stxサブタイプ
食中毒事例D由来株	O157:H7	30株	<i>stx1a, 2a</i>
食品E由来株	O157:H7	30株	<i>stx2a</i>
食品F由来株	O157:H7	30株	<i>stx2a</i>
合計		90株	

表 2. MLVA 解析用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	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATT AGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTGGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTT TG
	O157-9			GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
Mix1	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
	EH111-8	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG
		PET	CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCTCGCCATCG
	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTTC
	EH26-7	PET	CCCCTATCAAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGA TGTTTC	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTAAAGC
Mix2	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	CCTTGTCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCCTGTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATG A	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-36	NED	GGCGTCCTTCATCGGCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	GGGTTTCCATTTCTTTACCTTCAGG

表 3. Stx サブタイプ型別用プライマー配列

遺伝子	Forward	Reverse
<i>stx1a</i>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG
<i>stx1c</i>	CCTTTCCCTGGTACAACAGCGGTT	CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA
<i>stx1d</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	CTCTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA
<i>stx2a</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG
		GCCACCTTCACTGTGAATGTG
<i>stx2b</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	CAGCAAATCCTGAACCTGACG
<i>stx2c</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA
<i>stx2d</i>	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG
		TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG
		GCCTGATGCACAGGTAAGTGC
<i>stx2e</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	CTTCCTGACACCTTACAGTAAAGGT
<i>stx2f</i>	TGGGCGTCATTCAGTGGTTG	TAATGGCCGCCCTGTCTCC
<i>stx2g</i>	CACCGGGTAGTTATTTCTGTGGATATC	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT

表 4. 食中毒事例 D 由来の腸管出血性大腸菌 O157:H7 (30 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
1	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
2	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
3	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
4	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
5	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
6	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
7	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
8	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
9	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
10	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
11	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
12	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
13	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
14	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
15	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
16	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
17	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
18	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
19	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
20	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
21	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
22	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
23	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
24	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
25	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
26	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
27	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
28	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
29	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
30	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7

表5. 食品 E 由来の STEC 0157:H7 (30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
1	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
2	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
3	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
4	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
5	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
6	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
7	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
8	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
9	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
10	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
11	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
12	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
13	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
14	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
15	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
16	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
17	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
18	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
19	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
20	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
21	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
22	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
23	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
24	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
25	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
26	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
27	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
28	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
29	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
30	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7

表6. 食品 F 由来の STEC 0157:H7(30 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
1	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
2	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
3	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
4	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
5	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
6	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
7	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
8	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
9	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
10	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
11	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
12	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
13	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
14	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
15	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
16	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
17	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
18	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
19	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
20	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
21	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
22	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
23	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
24	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
25	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
26	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
27	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
28	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
29	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
30	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6

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 3 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

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	和賀萌美	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	山田翔子	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 2021 年 7 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛 591 頭および豚 178 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・豚の STEC 保持状況を調査した。分離できた STEC について凝集試験または Og-typing PCR 法にて O 抗原型、Og 型を調べた。また PCR によって *stx* サブタイプ、病原性因子遺伝子を調べた。さらに、薬剤感受性試験を実施し株の薬剤耐性について調査し、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。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。一方で豚の STEC 保菌状況については報告が少なく、その実態については不明な部分が残る。本研究では、さまざまな農場に由来する牛及び豚が搬入される食肉処理場において両者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

2020年5月から2021年7月までに岩手県の食肉処理場に搬入された、北日本6道県で飼育されていた牛591頭及び豚178頭の直腸便を材料とした。糞便サンプル1gをノボビオシンナトリウム(ナカライテスク, 日本) 20 mg/Lを添加したmEC培地(日水製薬, 日本) 9 mL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3,000 rpm, 10分間遠心分離した。遠心分離後, 上清を捨てた沈渣に6 mLのPBSを加えて懸濁し3,000 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, 3,000 rpm, 10分間遠心分離した。上清を捨て, 沈渣を450 µLのPBSで再懸濁し, 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(日水製薬, 日本)に画線し, 37°C, 一晩培養した。残りの沈渣から以下の方法でDNAを抽出した。懸濁液をマイクロチューブに移して15,000 rpm, 10分間遠心分離した。上清を捨てた沈渣に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 µLの1M Tris-HCl (pH 8.0)を加えて, 15,000 rpm, 10分間遠心分離し, 得られた上清を回収し抽出DNAとした。

抽出DNAをテンプレートDNAとし, stx1, stx2を検出するPCRをサーマルサイクラー(GeneAtlas G02, astec, 日本)を用いて行った。本PCRには酵素としてKAPA Taq ReadyMix(KAPA Biosystems, マサチューセッツ州)もしくは

はKAPA Taq Extra HS ReadyMix(KAPA Biosystems, マサチューセッツ州), プライマーとしてCebulaらの設計したstx1およびstx2に特異的なLP30 / LP31 (stx1), LP43 / LP44 (stx2)を使用した(表2) [Cebula et al., 1995]。反応液組成及び反応条件は以下のとおりである。

#### PCR 反応液(25 µL)

2×KAPA Taq (Extra HS) Ready Mix	12.5 µL
Water	11.0 µL
Forward Primer	0.25 µL
Reverse Primer	0.25 µL
Template DNA	1.0 µL

#### 反応条件

95°C	3分間	} 25 サイクル
94°C	20秒間	
58°C	20秒間	
72°C	30秒間	
72°C	30秒間	

PCR後, 増幅産物をサブマリン型電気泳動装置(Mupid-2 plus, タカラバイオ, 日本)を用いて100V, 30~40分間の条件で, 2%アガロースにより電気泳動を行った。泳動バッファーとして1×TAE緩衝液, 分子量マーカーとして100 bp DNA パーソナルマーカー(eurofins, ルクセンブルク)を用いた。stx1及びstx2が陽性となった検体についてコロニーPCRを以下の手順で実施しSTEC株を分離した。前項でマッコンキー寒天培地に画線したストックから新たなマッコンキー寒天培地にコロニーができるように播種し37°C,

一晩培養した。培地上に得られたコロニーを PCR 反応液に釣菌し、懸濁した。釣菌した懸濁液から一部を LB 寒天培地 (Becton Dickinson, ニュージャージー州) に接種後 37°C, 一晩培養して STEC 分離株のストックとした。残りの懸濁液はそのまま PCR 反応させた。PCR 条件は前項と同様である。得られた各 STEC 分離株の DNA を以下の方法で抽出した。LB 寒天培地のストックから新たな LB 寒天培地全面に播種し、37°Cで一晩培養した。培養後、菌体を 1.5 mL チューブに分注した TE buffer 1 mL に懸濁し、100°C, 15 分間加熱した後、18,000×g, 5 分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し、抽出 DNA とした。超微量分光光度計 (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州) で抽出 DNA の濃度を測定し、約 10 ng/μL になるよう TE buffer で希釈し、これをテンプレート DNA として用いた。

## (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、病原性因子遺伝子の検出、薬剤感受性試験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。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

94°C 50 秒間

64°C 40 秒間 35 サイクル

72°C 1 分間

72°C 3 分間

・ stx2a, stx2c, stx2d の PCR 反応条件

95°C 15 分間

94°C 50 秒間

66°C 40 秒間 35 サイクル

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  $\mu\text{L}$  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。培養後マッシュ棒の頭 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  $\times g$  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作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 区画に対照として混合血清の代わりに生理食塩液を 30  $\mu\text{L}$  滴下した。調製した抗原液の各検体 10  $\mu\text{L}$  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 PCR<sup>2)</sup>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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  の TE buffer を加えて懸濁した。懸濁液を 100°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  $\mu\text{L}$ )

5 $\times$ K APA Taq Extra buffer no Mg (KAPA)	6.0 $\mu\text{L}$
Water	14.42 $\mu\text{L}$
Primer Mix	3.52 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (KAPA)	3.0 $\mu\text{L}$
dNTP mix (KAPA)	0.9 $\mu\text{L}$
KAPA Taq DNA polymerase (KAPA)	0.16 $\mu\text{L}$
Template DNA	2.0 $\mu\text{L}$

・ PCR 反応条件

94°C, 1 分間  
94°C, 30 秒間

58°C, 30 秒間      25 サイクル  
 72°C, 1 分間  
 72°C, 2 分間

### 1-3 病原性因子遺伝子の検出

病原性因子遺伝子として *stx1*, *stx2*, *eae*, *fliC*, *hlyA*, *rfbE* の 6 種類を Bai らの方法に準じたマルチプレックス PCR により検出した [Bai et al., 2010]。前項で調整した DNA をテンプレート DNA とした。50 μM の各プライマー (12 種類) を等量ずつ混和したものをプライマーミックスとした。各プライマーの配列は表 6 に示した。PCR 反応液組成および PCR 条件は以下の通りである。

#### PCR 反応液(20μL)

10×PCR buffer, -Mg (Invitrogen, カリフォルニア州)	2.0 μL
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen, カリフォルニア州)	3.0 μL
Primer Mix	1.92 μL
dNTP mix (Invitrogen, カリフォルニア州)	0.48 μL
Taq DNA polymerase (Invitrogen, カリフォルニア州)	0.5 μL
Water	11.1 μL
Template DNA	1.0 μL

#### PCR 反応条件

94°C	5 分間	} 25 サイクル
94°C	30 秒間	
58°C	30 秒間	
72°C	75 秒間	
68°C	7 分間	

### 1-4 薬剤感受性試験

ディスク拡散法により各株の薬剤感受性を調べた。分離した *stx* 陽性コロニーを LB 寒天培地上に塗り広げ 37°C, 一晚培養した。培養後, 菌体を小試験管に分注した滅菌生理食塩水 1 mL に懸濁し McFarland Standard 0.5 (bioMérieux, フランス) と同等の濁度になるよう目視で調整した。これを菌液とした。菌液に滅菌綿棒を浸し, 余液を管壁で取り除いた後, 感性ディスク用培地 N (日水製薬, 日本) に綿棒で菌液を平板を約 60°ずつ回転させながら 3 回塗抹した。菌液を接種した平板を 3~5 分静置した後, ディスクデイスペンサー (Becton Dickinson, ニュージャージー州) でディスクを 1 枚の平板あたり 2~3 枚ずつ置いた。15 分以内に培地に蓋をして逆さにし, 37°C で 16~18 時間培養した。培養後, 形成された阻止円の直径を mm 単位で測定し, S (感受性), I (中間耐性), R (耐性) を判定した。

ディスクはセンシディスク (Becton Dickinson, ニュージャージー州) のアンピシリン 10 (ABPC), セファゾリン 30 (CEZ), セフォタキシム 30 (CTX), ゲンタマイシン 10 (GM), カナマイシン 30 (KM), テトラサイクリン 30 (TC), ナリジクス酸 30 (NA), シプロフロキサシン 5 (CPF), クロラムフェニコール 30 (CP), SXT (ST) を用いた。S, I, R の判定基準は CLSI のディスク法の判定基準に従った [CLSI, 2021]。

### 1-4 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

遺伝的異同を判定するため単離された全ての株について PFGE を行なった。

LB 寒天培地に保存した菌体を少量かき取り，滅菌蒸留水 200  $\mu$ L に McFarland Standard 3.0 と同等の濁度となるよう目視で調整しながら懸濁した。懸濁液に，TBE に溶かした 1% SeaKem Gold Agarose (Lonza, スイス) 液 200  $\mu$ L を加えて混ぜ，プラグモールド (BioRad, カリフォルニア州)へ流し込み固化させ，プラグとした。固まったプラグを，proteinaseK を含む菌体処理溶液 1 mL が入った Sterile Tube (SARSTEDT, ドイツ)に移し，50°Cで一晩振盪した。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 (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 0.016g (最終濃度 1 mg/mL)  
 N-Lauroysarcosine (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 0.16g (最終濃度 1%)  
 0.5M EDTA pH8.0 16mL

菌体処理後，プラグをシャーレへ取り出し，カバーガラスを用いて 1.5 mm 程度になるようプラグを切断し，プラグ断片とした。プラグ断片を 4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE 500  $\mu$ Lに移し，50°Cで 15~20 分間振盪 (40min<sup>-1</sup>)し，洗浄した。洗浄後，4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE を新しい液に交換し，同じ条件で振盪して再度洗浄した。続いて，4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE を捨て，TE buffer 1 mLに交換し，15分以上氷上に平衡化した。TE buffer を捨て，酵素処理の前段階として SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes(Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 200  $\mu$ Lに交換し，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，20 units の制限酵素 XbaI を含む反応液 100  $\mu$ L に交換し，37°Cで一晩振盪した。4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE 及び XbaI 反応液の組成は以下のとおりである。

・4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE (15 mL)

100mM Pefabloc SC (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 0.0144 g  
 TE (pH8.0) 14.9856 mL

・XbaI 反応液 (1.5 mL)

XbaI (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 30  $\mu$ L  
 H buffer (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 147  $\mu$ L  
 滅菌蒸留水 1323  $\mu$ L

DNA サイズマーカーである CHEF DNA Size Standard Lambda ladder(BioRad, カリフォルニア州)をシャーレへ取り出し，カバーガラスで約 2 mm の短冊状に切断し使用した。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，プラグに付着した余分な Buffer をキムワイプ (Kimberly Clark, テキサス州) で取り除いた後，数分間乾燥させた。プラグを貼り付けたコームをゲル作成台にセットし，1% SeaKem Gold Agarose in TBE 100 mL を流し込んだ。ゲルが固まるまで 20~30 分間静置した。水準器を用いて泳動槽が水平になるように調整した。また 2.2 L の 0.5 ×

TBE(BioRad, カリフォルニア州)を泳動 buffer とした。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)秒, buffer 温度 14°C, 泳動時間 22 時間, ポンプの循環速度 100 とした。電流は最初 90~100 mA, 最終的には 150 mA となるように調整とした。泳動装置は CHEF-DR II システム (BioRad, カリフォルニア州) を用いた。泳動後, ゲルを染色し, イルミネーターにて泳動像を確認した。

## C. 研究結果

### 1. 牛及び豚直腸便サンプル における STEC スクリーニング及び分離

牛の直腸便 591 検体のうち stx1 または stx2 が陽性を示した検体は 140 検体 (23.7%) であった。140 検体のうち, 27 検体(4.6%)は stx1 のみ, 89 検体(15.1%)は stx2 のみ, 24 検体 (4.1%)は stx1 および stx2 について陽性を示した。

stx 陽性を示した 140 検体についてコロニーPCR を実施し, STEC 株を分離した。140 検体のうち, 全体の 5.9%, 陽性検体の 25%に当たる 35 検体から 39 株の STEC が分離された。39 株のうち 10 株は stx1 のみ, 19 株は stx2 のみ, 10 株は stx1 および stx2 陽性であった。39 株について, 各株における性状解析および PFGE の結果を表 1-牛, 図 1-牛に示した。

豚直腸便 178 検体のうち stx1 または stx2 について陽性を示した検体は 87 検体 (48.9%) であった。87 検体のうち, 3 検

体 (1.7%) は stx1 のみ, 81 検体 (45.5%) は stx2 のみ, 3 検体 (1.7%) は stx1 および stx2 について陽性を示した。

stx 陽性を示した 87 検体についてコロニーPCR を実施し, STEC 株を分離した。87 検体のうち, 全体の 8.4%, 陽性検体の 17%に当たる 15 検体から 16 株の STEC が分離された。16 株は全て stx2 のみ陽性であった。16 株について, 各株における性状解析および PFGE の結果を表 1-豚, 図 1-豚に示した。

### 2. stx サブタイプの特 定

牛では, コロニーPCR により分離された 39 株について stx subtyping PCR を実施した。stx1 陽性を示した 20 株は全てサブタイプ stx1a に属した。stx2 陽性を示した 29 株は stx2a, 2c, 2d のいずれかまたは複数を有しており, stx2b, 2e, 2f, 2g を有する株は検出されなかった。stx サブタイプの組み合わせとして 1a/2a : 2 株, 1a/2d : 4 株, 1a/2a/2c : 2 株, 1a/2a/2d : 1 株, 1a/2c/2d : 1 株, 2a/2c : 2 株, 2a/2d : 1 株, 2c/2d : 2 株, 2a/2c/2d : 2 株が得られた。豚では, コロニーPCR により分離された 16 株について stx subtyping PCR を実施したところ, 全ての株が stx2 のみ陽性であったため stx2 のサブタイプについてのみ調べた。結果, 16 株全て stx2e 陽性を示し, stx2a, 2b, 2c, 2d, 2f, 2g を有する株は検出されなかった。

### 3. 凝集試験または 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

牛では, コロニーPCR により分離された

39株について抗病原性大腸菌血清を用いた免疫血清凝集試験を行った。凝集試験でO抗原が決定されたのはO136:5株, O8:4株, O157:2株, O103:1株の12株であった。凝集試験でO抗原が決定されなかった27株はOg-typing PCRによってOg型が決定された。最も多かったのはOg113:7株で, Og22:6株, Og116:4株, Og2, 50:2株と続いた。他にOg136, Og103, Og117, 107, Og117, 107+Og179, Og130, Og163, Og171, Og183が1株ずつ検出された。表1-牛

豚では, コロニーPCRにより分離された39株について抗病原性大腸菌血清を用いた免疫血清凝集試験を行った。凝集試験でO抗原が決定されたのはO136:5株, O8:4株, O157:2株, O103:1株の12株であった。凝集試験でO抗原が決定されなかった27株はOg-typing PCRによってOg型が決定された。最も多かったのはOg113:7株で, Og22:6株, Og116:4株, Og2, 50:2株と続いた。他にOg136, Og103, Og117, 107, Og117, 107+Og179, Og130, Og163, Og171, Og183が1株ずつ検出された。表1-豚

#### 4. 病原性因子遺伝子の検出

牛では, コロニーPCRにより分離された39株について, 6種類(stx1, stx2, eae, fliC, hlyA, rfbE)の病原性因子遺伝子の保有状況を調べた。39株のうち各遺伝子について陽性を示したのはstx1:20株, stx2:29株, eae:4株, fliC:5株, hlyA:23株, rfbE:2株であった。eaeを有した株はO103株, Og136株, O157株, 計4株であった。fliCを有した株はOg22株,

Og113株, O157株, 計5株であった。hlyAを有した株はO103株, Og116株, Og130株, O136またはOg136株, O157株, Og163株, Og2, 50株, OgUT株, 計23株であった。rfbEを有した株はO157株のみであった。表1-牛

豚では, コロニーPCRにより分離された16株について病原性遺伝子の保有状況を調べた。16株全てでstx2は検出されたものの, 他の5種類の病原性遺伝子は検出されなかった。表1-豚

#### 5. 薬剤感受性試験

牛では, コロニーPCRにより分離された39株について, 10種類(ABPC, CEZ, CTX, GM, KM, TC, NA, CPF, CP, ST)の薬剤に対する感受性を調べた。全ての薬剤に対して感受性であった株は4株で, 他の35株は単一または複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した。35株のうち複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した株は20株であった。中間耐性または耐性を示した株が多かった薬剤はTC, ABPC, KM, CPで, KMについては半分以上(28株)が中間耐性であった。またCP耐性を示した8株のうち3株はABPCとTC, 4株はTCについても耐性を示した。一方, CEZ, CTX, NAについては全てまたはほとんどの株が感受性を示した。表1-牛

豚では, コロニーPCRにより分離された16株について, 感受性を調べた。全ての薬剤に対して感受性であった株は無く, 全ての株が単一または複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した。16株のうち複数の薬剤に対して中間耐性または

耐性を示した株は 15 株であった。中間耐性または耐性を示した株が多かった薬剤は ABPC, ST, KM, TC で、これらの薬剤に対して半分以上の株が耐性または中間耐性を示した。また、KM については感受性を示した株は認められなかった。一方、CEZ, CTX, NA については全ての株が感受性を示した。表 1-豚

## 6. PFGE の結果

牛では、コロニーPCR で得られた 39 株について PFGE を実施した。得られた泳動像は図 1-牛に示した。

Og113 の 7 株は PFGE により 3 グループ (a, b, c) に分類された。グループ a を構成する株番号 1, 2 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも去勢された黒毛和種であった。グループ a は PFGE パターンとともに解析した全ての性状も同じ結果を示した。グループ b を構成する株番号 3, 4, 7 の株はそれぞれ別の都道府県から得られた株であった。個体はいずれも去勢された黒毛和種であった。性状について 7 番の株のみ *stx2c*, *fliC* を保有していた点や薬剤耐性、中間耐性を示す薬剤の種類について差異が見られたものの、*stx1a/2d* を有していた点、ABPC と TC に耐性を示した点は共通していた。グループ c を構成する株番号 5, 6 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも雌の交雑種であった。5 番は *stx2c/2d* を保有していたのに対し 6 番は *stx2a/2c/2d* を保有していた点で差が見られたが、保有していた病原遺伝子や薬剤耐性を示した薬剤は共通していた。

O136 または Og136 を示した 6 株のうち 3 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ d)。グループ d を構成する株番号 11, 12, 13 の株は同一都道府県内の 2 農場から得られた株であった。個体はいずれも雌の交雑種であった。薬剤耐性について 11, 12 は KM に中間耐性を示したが、13 は感受性であった点で差異が見られたが、*stx* サブタイプや保有していた病原遺伝子については共通していた。

Og22 の 6 株のうち 2 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ e)。個体はどちらも雌であり、一方は黒毛和種、一方は交雑種であった。グループ e を構成する株番号 14, 15 の株は異なる都道府県から得られた株であった。グループ e は PFGE パターンとともに解析した全ての性状も同じ結果を示した。

Og116 の 4 株のうち 2 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ f)。グループ f を構成する株番号 25, 26 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも去勢された交雑種であった。薬剤耐性について 25 は KM に対して中間耐性であったのに対し 26 は感受性であった点で差異が見られたが、*stx* サブタイプや保有していた病原因子遺伝子、耐性を示した薬剤については共通した結果が得られた。図 1-牛

豚では、コロニーPCR で得られた 16 株について PFGE を実施した。得られた泳動像は図 1-豚に示した。

O8 または Og8 の 13 株から 2 つの PFGE パターンの同一なグループ (g, h) に分類された。グループ g は株番号 1~3 (表 1-豚) の 3 株で構成された。薬剤感受性

について ABPC, ST に耐性, KM に中間耐性を示した点は共通であったが, TC に 1 番は耐性を示したのに対し 2, 3 番は中間耐性であった点, GM に 1, 3 番は感受性を示したのに対し 2 番は中間耐性であった点で差異が見られた。グループ h は株番号 4~7 の 4 株で構成された。4, 5, 6 番は薬剤感受性の結果は全て共通していたが, 7 番のみ ABPC と ST に対し感受性を示した点で他の 3 株と異なっていた。

#### D. 考察

本研究では牛の直腸便 591 検体及び豚の直腸便 178 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。

まず牛では, 検体における stx のスクリーニングにおいて 23.7%に当たる 140 検体で stx1, stx2 のいずれかまたは複数が陽性を示した。

李らの報告において国内 7 地域 15 県の 110 農場から収集した 551 の牛糞便検体の PCR による stx 陽性率は 24.1% (133 検体) とされており<sup>1)</sup>, 本研究ではこれに近い結果が示された。本研究で対象となった牛は北日本 6 道県に限定されていたが, 李らの報告の結果と stx 陽性率に大きな差がないことから, STEC の保有に地域差はなく, 北日本 6 道県の牛でも国内の他の地域と同様の STEC 保菌率であると考えられる。

本研究では凝集試験法または Ogtyping PCR 法で O 抗原型, Og 抗原型を決定し, 4 種類の O 抗原型と 12 種類の Og 型が検出された。最も得られた株数の多かった O 型, Og 型は Og113 であった。

O26, O103, O111, O121, O145, O157 は国内におけるヒト由来腸管出血性大腸菌の主要な O 抗原とされているが<sup>2)</sup>, このうち本研究で検出されたのは O103, O157 の 2 種類のみであった。また stx のサブタイプと病原性因子遺伝子 (stx1, stx2 の他に, eae, fliC, hlyA, rfbE) を PCR で調べた結果, 検出されたサブタイプは stx1a, stx2a, stx2c, stx2d の 4 種類であった。FAO/WHO STEC Expert Group の報告では, HUS などの重篤な病態と関連している stx サブタイプは stx1a, stx2a, stx2c, stx2d の 4 種類であり, 加えて eae の存在が病原性に大きく関与するとしている<sup>3)</sup>。また Ethelberg らは特に stx2 と eae の両方を保有することが HUS を引き起こす重要な因子であるとしている<sup>4)</sup>。本研究で得られた株のうち, eae を保有した株は O103 株, Og136 株, O157 株であったが, stx2 もともに保有していたのは O157 株のみであった。O157 株は今回調査した病原性因子遺伝子を全て保有していた。以上より, 本研究で得られた STEC の分離株のうち, O157 株は高い病原性を有している可能性があると考えられた。Og113 については stx の他に hlyA を有する株が 2 株検出された。O113 は牛検体から分離される株の O 抗原型として最も一般的であるとされており<sup>5), 6)</sup>, 今回はこれを支持する結果が得られた。Karmali らによる血清型を用いた STEC 病原性の疫学的分類では, O113 の一部はまれに HUS 散発例から検出されるグループ C に分類されており<sup>7)</sup>, 実際にヒト臨床例から検出される例や HUS を引き起こす例も報告されている。1999

年の Paton らによって報告された、O113 が HUS を引き起こした例では、原因株は eae を欠損していた<sup>8)</sup>。また 2012 年の Monaghan らは臨床例から分離された O113 株は hly を保有していたと報告している<sup>6)</sup>。以上より本研究で得られた Og113 株の中にヒトに対して病原性を有する株が含まれている可能性は否定できない。ただし本研究で調べられた病原因子の数は stx を除いて 4 種類であり病原性を断定するには不十分であった可能性が高い。特に大腸菌の接着に関わる因子は病原性の決定に重要であり、saa や iha など eae 以外にも複数調べる必要があると考えられる。調査する病原因子を増やすことで O157 以外の株の病原性が明らかになることも十分に考えられる。

本研究で得られた株の O 抗原型、Og 型と stx サブタイプについて、同じ O 抗原または Og 型を示した株では共通の stx サブタイプを保有している例が見られた。Og113 に分類された 7 株は全て stx2d を有しており、O136、Og136 を示した 6 株は全て stx1a を有していた。O113 については共通して stx2d を有しているという報告が複数存在する<sup>6),9)</sup>。今回の結果は O 抗原型と stx サブタイプにはある程度の相関があるとする説を支持するものとなった。stx サブタイプと病原性の関連が指摘されていることから、O 抗原型と stx サブタイプの相関が明らかになることで O 抗原型のみでの信憑性の高い病原性の推測ができるようになる可能性が考えられる。

薬剤感受性について、テトラサイクリ

ン、アンピシリン、クロラムフェニコール、ST 合剤の順に耐性を示した株が多く、カナマイシンでは 28 株が中間耐性を示した。テトラサイクリン、アンピシリン、サルファ剤、カナマイシンは牛での使用量の多い抗菌薬である<sup>10)</sup>。これら 4 剤については抗菌薬使用量の多さが原因となり耐性菌が認められたと考えられる。一方でクロラムフェニコールについては使用実態が無いのにも関わらず耐性菌が複数認められた。クロラムフェニコール耐性を示した株はアンピシリン、テトラサイクリンについても耐性を示している株が多く、原田らの報告ではクロラムフェニコール耐性が他薬剤によって共選択されている可能性が指摘されている<sup>11)</sup>。したがって今回検出されたクロラムフェニコール耐性はアンピシリンやテトラサイクリンによって共選択されたものと考察された。このように抗菌薬の乱用は使用していない薬剤に対する耐性菌の出現も促進すると考えられるため、抗菌薬の慎重な使用が引き続き求められる。

STEC の主要 6 抗原に分類される O103、O157 の株はどの薬剤に対しても耐性を示さなかった。また 3 剤以上耐性を示した株は 39 株中 4 株であった。ヒトの医療に重要とされる第三世代セファロスポリンのセフォタキシムやフルオロキノロン系薬剤のシプロフロキサシンについては全てまたはほとんどの株が感受性を示した。以上のことから、薬剤耐性のみについて考えるとヒトの医療に由々しき影響を与えうるような STEC の薬剤耐性状況ではないと言える。STEC における薬剤耐性菌の出現状況が悪化しないよう、抗菌

薬の慎重な使用に加え定期的なモニタリングも求められる。

PFGE では個体，農場，都道府県をまたいで同一泳動パターンの株が得られた。調査した遺伝子の保有状況や薬剤感受性については差異が見られたが，PFGE パターンが同一であった株は由来が同じまたは比較的近縁であった可能性が高いと考えられる。今回の結果より農場内のみならず農場，都道府県をまたいで菌株が拡散している可能性が示唆された。今回拡散していることが確認された菌株は比較的病原性が低いと考えられるものであったが，高病原性の STEC が同様に拡散した場合，食中毒リスクが上昇する可能性が考えられる。菌株の拡散状況についてモニタリングを継続するとともに拡散経路を解明することで食中毒予防に貢献するものと考えられる。一方で PFGE では株の遺伝的近縁性のある程度予測することが限界であり，詳細な遺伝的近縁性を判断するには MLVA 法など別の方法により分子疫学的解析を強化することや全ゲノムシーケンスが必要である。STEC 分離株の解析情報と菌株に関する疫学情報を組み合わせることで，食中毒予防に向けたより信頼性の高い情報提供が可能になるものと考えられる。

一方，豚検体における stx1, stx2 のスクリーニングでは 48.9%に当たる 87 検体で stx1, stx2 のいずれかまたは複数が陽性を示した。また陽性になった 87 検体のうち 84 検体は stx2 陽性であった。また STEC 株分離率は 8.4%であった。日本における豚糞便から分離された STEC について，木島らは STEC 分離率

14%，小林は stx 陽性率 4.9%と報告している<sup>12),13)</sup>。一方，アメリカでは Cha らの縦断的コホート研究で調査期間中に 68.3%の豚から少なくとも 1 回は STEC が検出され，Remfry らはリアルタイム PCR による調査で stx 陽性率 70.1%であったと報告している<sup>14),18)</sup>。本研究では分離率はそれほど高くなかったものの，これまで国内で報告されてきた健康な豚の stx 陽性率よりも高い数値となった。アメリカでは先述のように高い STEC 陽性率，分離率が報告されており，国内では 1999 年に中沢らによって健康な豚から O157:H7 の分離が確認されているため<sup>15)</sup>，引き続き国内の豚の STEC 陽性率について調査する必要があると考える。分離率が低かった理由としては前章の IV で述べたようにバックグラウンドの微生物が多かった可能性があること，目的の大腸菌が VBNC の状態であった可能性があること，手技的な問題が挙げられる。

本研究で分離された 16 株は全て stx2e を保有していた。また 16 株中 13 株は O8 または Og8 に分類され，他に Og100, Og180, Og 不明が 1 株ずつ得られた。豚では Stx2e 産生性 STEC による浮腫病が知られている。浮腫病が発生するためには Stx2e 産生性 STEC が小腸に移行し，定着することが前提条件となる<sup>16)</sup>。Parma らはアルゼンチンにおける調査で O8, O138, O139 が浮腫病と関連していると報告している<sup>17)</sup>。以上のことから今回得られた株は小腸に定着することなく，不顕性感染としてあるいは正常細菌叢の一部として豚に保菌されていた浮腫病原菌であったと推測される。またアメリカ

カにおける Remfry らの報告では O8 が豚で最も頻繁に分離されており，今回の結果と一致した<sup>18)</sup>。よって日本でも同様に O8 が豚で最も一般的な O 抗原型であると推測される。

一方でヒト食中毒における主要 6 抗原とされる O 抗原型は本研究では豚から分離されなかった。病原性因子についても eae や hlyA といった遺伝子は検出されなかった。Friedrich らによると stx2e はヒトの下痢症に関連している可能性はあるが HUS との関連はないとされるため<sup>19)</sup>，本研究で豚より分離された株はヒトに重篤な病態をもたらす可能性は低いと考えられる。一方，緒言でも述べたように下痢症や HUS 患者から Stx2e 産生株が検出された例もあることから，病原性因子についてさらに調査するなどヒトへの影響についてはさらなる検討が必要であると考えられる。

薬剤感受性試験ではアンピシリン，ST 合剤，カナマイシン，テトラサイクリンについて耐性または中間耐性を示す株が多数得られた。本研究で薬剤感受性試験に使用した薬剤では，テトラサイクリン（オキシテトラサイクリン），トリメトプリム，アンピシリン，スルファモノメトキシ水和物，カナマイシンの順に実際の使用量が多い<sup>10)</sup>。したがって今回得られた結果については抗菌薬の使用量の多さが原因となり耐性菌が認められたと考えられる。一方，ヒトの医療に重要とされる第三代セファロスポリンのセフォタキシムについては全ての株が感受性を示した。フルオロキノロン系薬剤のシプロフロキサシンについては中間耐性を示した株が

認められたものの耐性を示した株は認められなかった。以上のことから薬剤耐性のみについて考えると牛と同様にヒトの医療に由々しき影響を与えうるような STEC の薬剤耐性状況ではないと言える。PFGE の結果，同一 PFGE パターンを示したグループが 2 グループ検出された。検出された 2 グループはそれぞれ同一農場由来と推測され，このことから農場ごとに STEC 保菌状況には差があると推察される。農場や都道府県をまたいで同一株と疑われる株が拡散しているかについて調査するためには，検体の由来農場について把握すること，調査を継続し検体数を増やすことが必要と考えられる。

#### (参考文献)

1. Lee K, Kusumoto M, Iwata T, Iyoda S and Akiba K. (2017). Nationwide investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups. *Epidemiology & Infection*.**145**:1557-1566.
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. (2014). 腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について. 食安監発 1120 第 1 号.
3. FAO/WHO STEC Expert Group. (2019). Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on a Risk Basis. *Journal of Food Protection*. 82 (1) : 7-21.
4. Ethelberg S, Olsen KEP, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Engberg J, Petersen AM, Olsen B, Gerner-Smidt P and Mølbak K.

- (2004). Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (5): 842-847.
5. Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I and Misawa N. (2014). Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *Journal of Food Protection*. 77(8):1269-1274.
  6. Monaghan AM, Byrne B, McDowell D, Carroll AM, McNamara EB and Bolton DJ. (2012). Characterization of farm, food, and clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O113. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9(12):1088-1096.
  7. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K and Kaper JB. (2003). Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(11):4930-4940.
  8. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA and Paton JC. (1999). Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(10):3357-3361.
  9. Miko A, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N, Krause G and Beutin L. (2009). Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(20):6462-6470.
  10. 農林水産省動物医薬品検査所. (2019). 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量. 動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器販売高年報別冊.
  11. Harada K, Asai T, Kojima A, Ishihara K and Takahashi T. (2006) Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *American Journal of Veterinary Research*. 67 (2) : 230-235.
  12. Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Kojima A, Morioka A, Nagata R, Kawanishi M, Nakazawa M, Tamura Y and Takahashi T. (2005). A National Surveillance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food-Producing Animals in Japan. *Journal of Veterinary Medicine, B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 52: 230-237.
  13. 小林秀樹. (2013). 動物における人獣共通病原性大腸菌の保有状況と特徴. 農林水産省委託プロジェクト 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発 技術情報集 p26.
  14. Cha P, Fratamico PM, Ruth LE, Bowman AS, Nolting JM, Manning SD and Funk JA. (2018). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in finishing pigs: Implications on public health. *International Journal of Food Microbiology*. 264: 8-15.

15. Nakazawa M, Akiba M and Sameshima T. (1999). Swine as a Potential Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerging Infectious Diseases*. 5(6):833-834.
16. 石川弘道 (2005). カラー版すぐに役立つ現場の豚病対策. 有限会社ベネット, 東京.
17. Parma AE, Sanz ME, Viñas MR, Cicuta ME, Blanco JE, Boehringer SI, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J and Blanco M. (2000). Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 72(3-4):269-276.
18. Remfry SE, Amachawadi RG, Shi X, Bai J, Woodworth JC, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD, DeRouchey JM and Nagaraja TG. (2020). Polymerase Chain Reaction-Based Prevalence of Serogroups of *Escherichia coli* Known to Carry Shiga Toxin Genes in Feces of Finisher Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. 17(12):782-791.
19. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A and Karch H. (2002). *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *The Journal of Infectious Disease*. 185: 74-84.

## E. 結論

本研究では牛の直腸便 591 検体及び豚 178 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。

牛では, stx 陽性率は 23.7%となり, 35 検体から 39 株が分離された。病原因子,

薬剤感受性の観点から公衆衛生学的に対応が求められるような菌株の検出は少数にとどまった。一方, 農場や都道府県をまたいで拡散している遺伝学的に近縁と考えられる菌株が検出された。

豚では, stx 陽性率は 48.9%となり, 15 検体から 16 株が分離された。得られた株は全て浮腫病原因 STEC と考えられる株であり, 公衆衛生学的に迅速な対応が求められるような菌株は検出されなかった。また, 本研究で得られた牛由来 STEC と豚由来 STEC を比較した結果, 菌株の性状に関して共通点よりも相違点の方が多く認められた。豚由来 STEC について由来農場の情報を収集する他, 調査を継続し結果を蓄積することが必要であると考ええる。豚由来 STEC について日本国内における報告は限られているため本調査を継続することは STEC 食中毒の原因究明に大きく貢献すると期待される。また牛由来 STEC との比較により拡散経路の解明の一助になると考えられる。

## 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

・和賀萌美, 品川正臣, 山田翔子, 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志賀毒素産生性大腸菌の性状解析 第 42 回日本食品微生物学会学術総会(WEB 開催) 令和 3 年 9 月 21 日 (火) ~10 月 20 日 (水)

## 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)

株番号	採材日 (年月)	stx	O抗原	Og-typing	農場	年齢(月-日)	品種	性別	病原因子											薬剤耐性					PFGE	
									stx1	stx2	fli-C	eae	rfbE	hlyA	ABPC	CEZ	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX	CP	ST		
1	200915	1a/2d	×	Og113	A	29-15	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	a
2	200915	1a/2d	×	Og113	A	30-3	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	a
3	210405	1a/2d	×	Og113	B	27-5	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	R	I	S	S	R	b	
4	210405	1a/2d	×	Og113	C	30-2	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	b	
5	210609	2c/2d	×	Og113	D	25-3	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	c	
6	210609	2a/2c/2d	×	Og113	D	26-4	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	c	
7	210714	1a/2c/2d	×	Og113	E	27-14	黒毛和種	去勢	○	○	○	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	b	
8	200703	1a	O136	—	F	64-1	黒毛和種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
9	210205	1a	O136	—	G	27-27	交雑種	去勢	○	×	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S		
10	210205	1a	×	Og136					○	×	×	○	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S		
11	210609	1a	O136	—	D	25-24	交雑種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	d	
12	210609	1a	O136	—					○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	d	
13	210623	1a	O136	—	H	26-13	交雑種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	d	
14	200610	2d	×	Og22	I	26-14	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	e	
15	200703	2d	×	Og22	J	28-27	交雑種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	e	
16	200703	2c	×	Og22	K	25-2	交雑種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S		
17	210405	2d	×	Og22	C	29-16	黒毛和種	去勢	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S		
18	210714	2c/2d	×	Og22	E	27-14	黒毛和種	去勢	×	○	○	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S		
19	210714	1a/2a/2c	×	Og22	L	26-1	交雑種	去勢	○	○	○	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
20	200703	2a/2d	O8	—	F	37-16	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
21	210205	2c	O8	Og8	M	71-15	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
22	210205	2c	O8	Og8					×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
23	210405	1a/2a/2c	O8	Og8	N	26-14	交雑種	雌	○	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
24	210609	2a/2c	×	Og116	O	24-5	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S		
25	210623	2a	×	Og116	H	26-5	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	f	
26	210623	2a	×	Og116	H	25-28	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	f	
27	210714	2a/2c	×	Og116	L	25-27	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S		
28	200731	2a	×	Og2,50	P	27-4	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S		
29	210714	2a/2c/2d	×	Og2,50	Q	26-19	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S		
30	200731	1a/2a	<b>O157</b>	—	R	25-21	交雑種	去勢	○	○	○	○	○	○	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
31	210714	1a/2a/2d	<b>O157</b>	—	L	26-7	交雑種	去勢	○	○	○	○	○	○	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S		
32	200703	1a	<b>O103</b>	Og103	K	25-12	交雑種	雌	○	×	×	○	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
33	210609	1a	×	Og117,107	S	28-17	黒毛和種	去勢	○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R		
34	210609	1a	×	Og117,107+Og179					○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	R	R	R		
35	200915	2a	×	Og130	T	189-24	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
36	210609	1a/2a	×	Og163	U	155-25	黒毛和種	雌	○	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
37	200731	2c	×	Og171	P	27-21	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
38	210405	1a	×	Og183	C	29-30	黒毛和種	去勢	○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	I	I	S	S	S	S		
39	210205	2a	×	OgUT	V	27-6	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S		

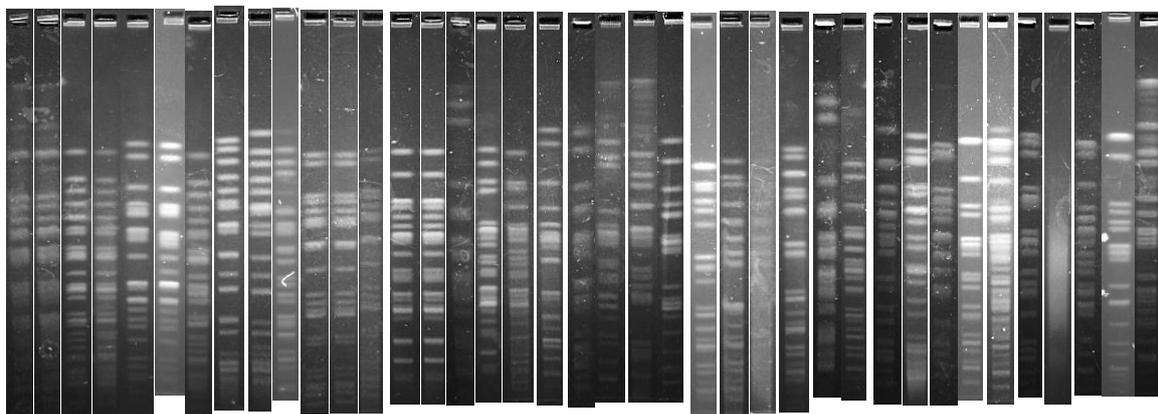
表-1 (豚)

株番号	採材日 (年月)	stx	O抗原	Og-typing	病原性因子						薬剤耐性										PFGE
					stx1	stx2	fli-C	eae	rfbE	hlyA	ABPC	CEZ	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX	CP	ST	
1	210727	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	R	g
2	210727	2e	O8	—	×	×	○	×	×	×	R	S	S	I	I	I	S	S	S	R	g
3	210727	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	I	I	S	S	S	R	g
4	210727	2e	O8	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	h
5	210727	2e	O8	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	h
6	210727	2e	O8	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	h
7	210727	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	h
8	210419	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	S	S	S	S	I	I	S	I	S	S	
9	210419	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	I	I	R	S	S	R	I	
10	210419	2e	O8	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	I	I	S	S	I	S	R	
11	210419	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	R	S	
12	210727	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	S	S	S	I	R	R	S	S	R	R	
13	210727	2e	—	Og8	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	I	I	R	
14	210727	2e	—	Og100	×	×	○	×	×	×	S	S	S	I	I	R	S	I	S	R	
15	210727	2e	—	Og180	×	×	○	×	×	×	R	S	S	S	R	I	S	S	S	R	
16	210727	2e	—	OgUT	×	×	○	×	×	×	R	S	S	R	R	R	S	I	S	S	

图 1 - 牛

No.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39



a a b b c c b

d d d e e

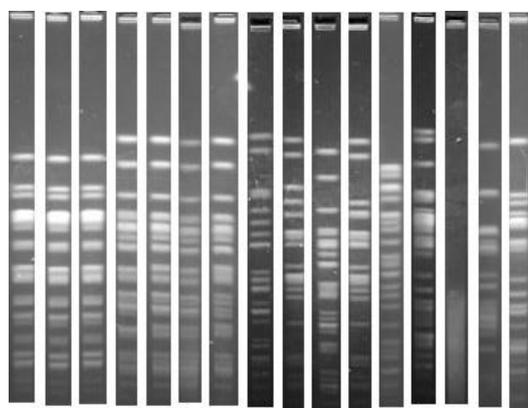
f f

PFGE Group

图 1 - 豚

No.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



g g g h h h h

PFGE Group

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）の反復配列多型解析（MLVA）法は、新しい分子疫学的解析法として、地方衛生研究所（地衛研）に急速に普及している。現在、食品流通網の充実により食中毒事例の形態が変わりつつあるため、近年に分離されたEHEC菌株を使ってMLVA法の有効性を再検証する必要があるだろう。一方、本法を公衆衛生分野で活かすには、地衛研における検査精度が高くなければならない。来年度に全国規模でのMLVA法の精度管理試験を予定しているため、今年度に試験での検証項目を決める必要がある。そこで、本研究ではMLVA法の菌株間の類似性を判定する能力（分離能）を検証するために、2016～2020年に、国内で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株を用いて各年の多様性指数（SDI）を算出した。その結果、2017年の0111のSDIが0.925とやや低かったが、それ以外は0.95以上だった。全国規模でのEHEC 0157集団事例が発生した2018年でもSDIが高かったことは、MLVA法の分離能が高く、同一クローン由来の菌株間の僅かな違いも認識していることを示している。次に、MLVA法における同一クローン由来のEHEC菌株であることの判定基準を検証するために、公共データベースに登録されているEHECのゲノムデータを使って、*in silico*でMLVA法を行った。その結果、同じ集団事例で分離された菌株のタンデムリピートが違った領域は2つまでだったことから、2領域違いを基準とすべきだろう。最後に、EHEC 0157、026及び0111の菌株及びDNAを一部の地衛研に配布してMLVA法の精度管理プレ試験を行った。9施設は全検体について正解だったが、1施設が1検体でフラグメント解析ソフトの使用法に問題があり不正解の回答をした。来年度、全国規模で精度試験を行う際、解析ファイルを正しく利用できるかを検証できる検体を配布する必要があるだろう。

#### A. 研究目的

近年、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反復配列多型解析（MLVA）法は、特定遺伝子領域における繰り返し配列のリポート（TR）数の比較により菌株間の類似性を判定する方法である<sup>1)</sup>。MLVA法の結果は数値であるため、自治体間での結果の比較が容易であるという利点がある。さらに、MLVA法ではPCR法を用いるので短時間で解析結果を出すことができる。2018年に厚生労働省は地方自治体に対して、EHECの食中毒調査等で用いる分子疫学的解析としてはPFGEからMLVA法へ統一する様に通知した（平成30年2月8日付け健感発0208第1号、薬生食監発0208第1号）。

過去の研究により<sup>2)</sup>、MLVA法の菌株間の類似性の違いを判定する能力（分離能）は高く、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）と同程度と報告されている。さらに、この研究によってMLVA法を用いた際

の同一集団事例由来の菌株であることの判定基準も示されている。しかし、近年、食品流通網の拡大・複雑化に伴い、食中毒の期間が長くなり、規模も拡大している<sup>3)</sup>。さらに輸入食品を介して海外に分布しているEHEC菌株による感染症事例も増えていると思われる。この様に食中毒の形態が変わりつつある現在、MLVA法の有効性については、近年に分離されたEHEC菌株を用いて再検証した方が良いだろう。

MLVA法の有効性の検証として、我が国で分離されたEHEC菌株について、MLVA法により多様な遺伝子型に分かれるかを調査する必要があるだろう。過去の研究では、2005～2007年に日本全国で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株をMLVA法で解析すると遺伝子型の多様性は非常に高かった<sup>2)</sup>。しかし、2018年の夏頃に、分子疫学的解析法で同じ遺伝子型を持つEHEC 0157菌株が全国的に蔓延した<sup>4)</sup>。2012年8月には、EHEC 0157に汚染された白菜の浅

漬が食品流通網を介して北海道から山形県、東京都、神奈川県、奈良県、大阪府にまで広がり、最終的に160名以上もの感染者が発生した<sup>5)</sup>。この様に同一クローン由来のEHEC菌株が広域に蔓延した場合、我が国に分布するEHEC菌株におけるMLVA法の遺伝子型の多様性に变化があるかもしれない。

MLVA法の有効性検証において、海外で分離されたEHEC菌株のゲノムデータを用いた解析も必要だろう。海外の研究によってEHECのMLVA法の検証が行われている。しかし、日本でのEHECのMLVA法ではゲノムの17領域のTR数が解析されているが、海外の多くのMLVA法の研究ではアメリカ合衆国CDCが推奨する8領域の解析が採用されている<sup>6)</sup>。従って、海外のEHEC菌株についても17領域のMLVA法を用いて有効性を検証する必要がある。一方で、EHECの中で分離頻度が高い血清型である0157では、地域間で異なる進化系統学的集団 (PG) の菌株が分布していると報告されている<sup>7)</sup>。特定の菌種をMLVA法で解析すると、各PGの菌株は固有の遺伝子型を持つことが示されていることから<sup>8)</sup>、海外と日本に分布するEHEC菌株では、各遺伝子領域のTR数の多様性が大きく異なるかもしれない。もしかしたら、海外で分離された菌株については同一クローン由来であるかの判定基準を変えるべきかもしれない。

MLVA法が有効な分子疫学的解析法であったとしても、本法が持つ能力を公衆衛生分野で発揮するには、実施機関での検査精度が高くなければならない。我が国では、地方衛生研究所 (地衛研) が各地域で分離されたEHEC菌株について分子疫学的解析法を行い、食中毒調査等に活用しているため、地衛研に対する精度管理が大切だろう。昨年度の本研究では、精度管理を行うための準備として、配布する候補菌株を選定し、DNAの抽出法を決めた。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から<sup>9)</sup>、昨年度に複数回の継代培養を行い変異がなかった菌株を候補とした。精度管理で菌株のDNAを配布する場合、輸送期間中にDNAの品質低下が起こることも予想されることから、抽出したDNAを一定期間、特定温度で放置してもMLVA法の結果に影響を与えないことも確認した。本研究では、来年度に全国規模でのMLVA法の精度管理試験を予定している。そこで、来年度の試験における検証項目を明らかにするために、今年度は一部の地衛研を対象にプレ試験を行った。

本研究では、MLVA法の分子疫学的解析法としての有効性を検証するために、2016～2020年に国立感染症研究所 (感染研) 細菌第一部に搬入されたEHEC菌株を用いて、MLVA法データの多様性を経時的に調査した。次に、海外で発生したEHECの集団食中毒及び集団感染症事例由来の菌株の

MLVAデータを解析し、同一クローン由来菌株であることの異同判定の基準を検討した。さらに、一部の地衛研を対象としたEHECのMLVA法の精度管理プレ試験を行い、来年度の全国規模での試験における検証項目を決定した。

## B. 研究方法

### 1. MLVA法データの経時的整理に基づく有効性の検証

2016～2020年に全国の地衛研で分離されたEHEC 0157、026及び0111菌株の内、感染研に搬入された全ての菌株を用いて、MLVA法の菌株間の分離能を検証した。各年に搬入された各血清型の菌株について、以下の式を用いてSimpson's Diversity Index (SDI) を算出した<sup>10)</sup>。

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

$D$ はSDI、 $M$ は各血清型の総菌株数、 $S$ はMLVA法の遺伝子型の総数、 $n_j$ は $j$ 番目のMLVA型に属する菌株数を意味する。SDIが1.0の時、その年に搬入された1つの血清型の全菌株が、MLVA法により互いに異なる遺伝子型に分かれることを示す。反対に、SDIが0の時、全菌株が同じ遺伝子型であることを示す。各血清型のSDIについてカイ二乗検定を行い、搬入年間での有意な増減があるかを調査した。

### 2. MLVA法データの地理的整理に基づく有効性の検証

我が国の地衛所及び感染研で用いられている17領域のMLVA法が海外で分離されたEHEC菌株においても有効であるかを調査した。最初に、Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) に記載されている文献から、海外で発生したEHEC 0157、026及び0111の集団食中毒及び集団感染症事例を報告している文献を抽出した。次に、抽出された文献から、集団事例であるとの判断が疫学的調査及びPFGE法の結果に基づいている研究を選んだ。さらに、集団事例由来の菌株について全ゲノムシーケンスが行われており、contig配列が公共のゲノムデータベースに登録されている文献を選んだ。最後に、集団事例由来の菌株のcontig配列を公共のゲノムデータベースから得た後、MEGA11 Software<sup>11)</sup>を使って*in silico*でMLVA法を行った。

### 3. MLVA法の精度管理の受験施設

感染研 細菌第一部から情報を得て、全国の地衛研の中からEHECの日常検査においてMLVA法を実施している施設を選定した。選定した地衛研に打診し、最終的に10施設に受験いただいた。10施設の内訳は、東北地区に1施設、関東地区に4施設、東海地区に2施設、近畿地区に1施設、中国地区

に1施設、及び九州地区に1施設だった。選定した10施設をグループI（施設A-E）及びグループII（施設F-J）に分けた。

#### 4. MLVA法の精度管理試験での問題内容

各施設に3つの菌株検体（検体1-3）及び3つのDNA検体（検体4-6）の合計6検体を配布した（表1）。グループI及びIIの間で菌株検体は異なるが、DNA検体は共通にした。検体は令和2年度の本研究で候補としたEHEC菌株から選んだ。菌株の選定基準としては、菌株検体ではMLVA法で典型的なTRを持つEHEC、DNA検体では非典型的なTRを持つEHECを選んだ（表1）。つまり、DNAである検体4の領域0157-9のTR数は-2であるが、このTR数を持つ菌株は日本で分離されるEHEC 0157の中では少数派である。検体6の領域EHC-5のTR数は10であるが、同様にEHEC 0111菌株の中では少数派である。検体の調製方法としては、EHEC菌株をカジトン培地に植えた後、37°Cで1晩培養したものを菌株検体とし、EHECのDNAをInstaGene matrix（Bio-Rad Laboratories）で抽出した後、NanoDrop（Thermo Fisher Scientific）でDNAを2 ng/ $\mu$ Lに調製してDNA検体とした。

問題内容として、全検体についてMLVA法を実施してもらいTR数の回答を求めた（図1）。各受験施設には、日常検査で実施している実験方法（DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等）でMLVA法を行う様に伝えた。また、問題と併せて、実験方法に関するアンケートを行った。

#### 5. MLVA法の精度管理試験の実施工程

各受験施設に菌株（検体1-3）及びDNA（検体4-6）を別々に送付した（表1）。2021年11月22日（月）、各施設に菌株（検体1-3）をゆうパック常温便で発送した。11月25日（木）、各受験施設に菌株（検体4-6）をゆうパック冷凍便で発送した。

回答用紙としては、2021年11月23日（火）に各受験施設の受験者にエクセルファイルを（図1）をメールにて送付した。回答締切りを2022年1月31日（月）とした。

#### 6. MLVA法の精度管理試験における問題及び正解基準

検体5の領域0157-37においては、複数の回答を正解とした。回答用紙の表や備考欄において（図1）、遺伝子増幅産物のサイズのみではTR数を判定できないことが示されていていれば正解とした。例えば、「表において、TR数が判定不能（UN）とされ、さらに遺伝子増幅産物のサイズが書かれている。」及び「表でTR数が6、6.5又は7と判定され、備考欄に“電気泳動するとTR数6と7の間に遺伝子増幅産物のピークが確認された。”や“電気泳動すると遺伝子増幅産物のピークがフラグメント解析ソフトのBin内に入らなかった。”と書かれている。」を正解とした。検体5の0157-37以外の領域については正しいT

R数の回答のみを正解とした。

### C. 研究結果

#### 1. MLVA法データの経時的整理に基づく有効性の検証

2016～2020年に感染研に搬入されたEHEC 0157、026及び0111についてSDIを算出したところ、2017年のEHEC 0111のみが0.925と最も低く、それ以外は0.95以上だった。各血清型のSDIについて搬入年間で有意な増減は認められなかった。搬入菌株数は、どの年においても0157が最も多く、0111が最も少なかった。

#### 2. MLVA法データの地理的整理に基づく有効性の検証

海外で発生したEHEC 0157による集団食中毒として3事例を選定した（表2）。1事例目は、2011年にカナダで発生した生殻付きクルミを原因とする集団食中毒事例である<sup>12)</sup>。この事例で感染者から分離された14菌株の内、11菌株のcontig配列を公共のデータベースからダウンロードできた（Accession No. PRJNA481261）。contig配列を用いて*in silico* MLVA法を行ったところ、4つのMLVA型に分かれた（表2（A））。型2の4菌株では領域0157-9で、型3の1菌株では領域0157-34及び0157-9でTRを検出できなかった。しかし、11菌株中で異なったTR数を持つ0157は型4の1菌株のみで、領域0157-25のsingle locus variant（SLV）だった。

EHEC 0157による2事例目として、2009年にアメリカ合衆国全域で発生したクッキーの生地を原因とする集団食中毒事例を選んだ<sup>13)</sup>。この事例では76名の感染者が確認された。抽出した文献では、感染者由来の5菌株についてWGSが行われていたが、本研究ではcontig配列がデータベースに登録されていた3菌株のデータをダウンロードした（Accession No.: PRJNA481261）。*in silico* MLVA法の結果、3菌株が同じMLVA型を持っていた（表2（B））。全菌株において、領域0157-36のTR数を検出できなかった。

EHEC 0157による3事例目としては、2007年にアメリカ合衆国の複数の州で発生したピザ集団食中毒事例である<sup>13)</sup>。この事例では21名の感染者が確認された。抽出した文献では、感染者由来の6菌株についてWGSが行われているが、本研究ではcontig配列が公共のデータベースに登録されていた5菌株のデータをダウンロードした（Accession No.: PRJNA65991）。*in silico* MLVA法の結果、4つのMLVA型に分かれた（表2（C））。型2及び型3の各1菌株は、それぞれ領域EHEC-1及び0157-36におけるSLVだった。型4の1菌株は領域EHEC-1及び0157-36のTR数が異なるdouble locus variant（DLV）だった。大半のEHEC 0157菌株の領域0157-36にTRを持つが、

本研究では全菌株においてTRを検出できなかった。

海外で発生したEHEC 026による事例として、2016年3月末にイスラエルの保育園で発生した集団感染症事例を選んだ<sup>14)</sup>。この事例で感染者から分離された6菌株のEHEC 026のcontig配列を公共のデータベースからダウンロードした (Accession No. PRJNA285020)。in silico MLVA法を行ったところ、全ての菌株が異なるMLVA型に分かれた (表2 (D))。型1及び3の菌株は領域0157-9が、型2の菌株は領域EHC-2のTR数が異なるSLVだった。型6の菌株は領域EH26-7及びEHC-2のTR数が異なるDLVだった。EHEC 026菌株の大半は領域EHC-6にTRを持つが、本研究では全ての菌株でTRを検出できなかった。全菌株の中で型4の菌株のみEHC-2でTRが確認できなかった。

本研究の選定条件に適合した海外のEHEC 0111による集団食中毒または集団感染症事例の文献を抽出できなかった。

### 3. MLVA法の精度管理試験の回答の評価

菌株検体 (検体1-3) については、グループI及びII間で異なる検体を配布した (表1 (A))。グループIでは、全施設が検体1-3の全ての領域について正しいTRを回答したことから、正解と判定した。グループIIでは、検体3の領域EH111-11について、施設GがTR数をUN、遺伝子増産物のサイズを437 bpと記載したため、正誤判定を保留とした (表3 (A))。この領域について他の施設は正しいTR数を回答したことから正解と判定した。グループIIの全施設が検体1及び2の全領域、検体3のEH111-11以外の領域で正しいTR数を回答したことから正解とした。

正誤判定を保留とした施設Gの検体3の領域EH111-11について回答の経緯を調査した。フラグメント解析ソフトGeneMapper (Thermo Fisher Scientific) のBinファイル、及び電気泳動データを取り寄せた。その結果、施設Gで使用されているBinファイルにはTR数2及び4が設定されていたが、TR数3が未設定だった。このBinファイルの由来は、過去のある研究班で作成した試作版とのことだった。電気泳動ファイルを確認したところ、遺伝子増産物のピークはTR数2と4のほぼ中央に立ち、TR数2と4のBin間は12 bp (2つのTR分のサイズ) であった。その後、電話で聞き取り調査を行うと、施設Gの受験者はTR数3のBinが未設定だったためUNとしたとの回答だった。以上より、TR数3のBinが未設定でも電気泳動の結果を解釈すればTR数が3と判定できたことから、保留とした回答を不正解とした。

DNA検体 (検体4-6) については、グループI及びIIで共通の検体を配布した (表1 (B))。検体5の領域0157-37の回答のみが複数に分かれた (表3 (B))。施設B、I及びCはTR数をそれぞれ7、6.5及び9と回

答し、それ以外の施設はTR数をUN、遺伝子増産物のサイズを記載した。施設B、I及びCは備考欄に、この領域の遺伝子増産物を電気泳動すると、ピークはTR数が6と7の間であり、増産物のサイズのみではTR数の判定ができなかったと記載していた。さらに、施設I及びCはサンガーシーケンスを実施し、検体5は領域0157-37に9つのTRを持っているが、PCR法でプライマーからTRまでの領域に遺伝子の欠落が起きていることを把握していた。以上より、検体5の領域0157-37の回答については全施設正解と判定した。また、検体4及び6の全領域、検体5の0157-37以外の領域についても全施設が正しいTR数を回答したことから正解と判定した。

一方で、施設Aに送付した菌株検体において遺伝子変異と思われる現象が見られた。施設Aから回答があった際、メールにより「検体3 (菌株) の培地中の一部の細胞において領域EHC-6と0157-37のTRが検出されなくなっていた。」と報告を受けた。メールによる報告では以下の通りである。施設Aの受験者は、検体3を画線培養により5つのコロニーを得た後、アルカリ熱抽出によりDNAを調製しMLVA法を行ったところ、1つのコロニーで上述の2領域でTRが検出されなかった。受験者はTRが検出できなくなった原因はプラスミドの脱落によると判断し、他の4つのコロニーで検出されたTR数を回答した。

### D. 考察

本研究により、MLVA法は、我が国で近年に分離されたEHEC 0157、026及び0111の菌株に対しても分離能が高いことが明らかになった。泉谷らが2005～2007年に全国で分離されたEHECを用いてMLVA法の分離能を評価した際、散発事例由来の菌株を全て用いたが、集団事例由来では代表の1菌株のみを選んだ<sup>2)</sup>。その結果、0157、026及び0111のSDIはそれぞれ0.991、0.988及び0.986だった。本研究では、散発及び集団事例を区別せずに感染研に搬入された全菌株を用いてSDIを算出した。本研究の結果、2017年の0111のSDIがやや低かったが、それ以外の値は泉谷らの数値と大きく変わらなかった。我が国では、2018年に特定の食品が原因と疑われた大規模なEHEC 0157の集団事例が発生した<sup>4)</sup>。しかし、本研究では2016～2020年のSDIの間で有意な差が見られなかった。この結果は、我が国で実施されているMLVA法では17領域を解析するため、本法の分離能が非常に高くなっていることを示唆している。一般的に、同じEHECの集団事例由来の菌株であっても、事例の規模が拡大して長期化すると、徐々に菌株に変異が蓄積する。17領域のMLVA法では、事例の長期化により菌株に蓄積した変異の一部をTR数の変化 (つまり、SLVやDLV) として検出でき

るために、SDIに有意な低下が見られなかったのだろう。

本研究では、同一クローン由来のEHEC菌株についてMLVA法での異同判定の基準を示せた。海外で発生した複数の集団事例由来のEHEC菌株のMLVA法のデータを用いて*in silico*でMLVA法を行ったところ、同じ事例においても一部の菌株でTRが検出できなかった（つまり、表2（A）のMLVA型2及び3の菌株、（D）の型4の菌株）。この原因として、菌株自体はTR数を持っていたが、文献の研究でWGSのショートリード配列をアッセンブルした際、TR数が長すぎた等でcontig配列が作れなかったことが考えられる。一方で、*in silico* MLVA法の結果、同じ事例で分離された全ての菌株において、TR数が検出できないことも確認された。MLVA法で解析される17領域の内、O血清型に共通してTRを持たない領域がある（例えば、0157の場合、領域EH111-14やEH26-7）。その様な領域以外において、事例由来の全菌株でTR数が検出できなかった場合、同様にcontig配列が作れなかった可能性がある。その他の可能性としては菌株の個性としてその領域にTRを持たなかったことも考えられる。また、EHC-6、0157-19及び0157-36等のプラスミド上に存在する領域においてTR数を検出できなかった場合は<sup>15)</sup>、検査過程で菌株がプラスミドを脱落したのかもしれない。本研究の結果、*in silico*の解析でTRを検出できなかった領域を除くと全ての事例において、変異がDLVまでに収まった。泉谷らは、同一集団事例由来の菌株の多くはSLVで収まることを報告しており<sup>2)</sup>、海外から持ち込まれたEHECによる集団事例においても、この異同判定の基準が採用できると思われる。

本年度の一部の施設を対象としたMLVA法の精度管理試験の結果、全ての施設において検査精度が高いことが確認された。本年度の精度管理試験の目的は、来年度に予定している全国規模での試験における検証項目を決定するためである。本年度の受験施設の検査能力が低い場合、試験内容の正解率が低くなり、来年度の試験内容を決定できなくなる。そこで、本年度はMLVA法を日常業務として実施している施設に受験いただいた。本年度の試験では、当初、DNA検体の正解率が低下すると予想していたが全ての施設で正解だった。例えば、検体5の領域0157-37については全施設が遺伝子増幅産物のサイズからはTR数を算出できないことを見抜いていた。特に、施設C及びIにおいてはサンガーシーケンスも実施してTR数を塩基配列から数えて把握していた。一方で、菌株検体において、唯一不正解となった回答があった。施設Gの検体3の領域EH111-11の回答を誤ったので、回答の経緯を調査した。PCR法や電気泳動法等の実験手技は正しかったが、Binファイルの解釈を誤っていた。この様な初歩的な間違いを防ぐため

にも本研究の様な精度管理の継続的な実施が必要である。また、各施設が自主的にMLVA法に用いる機器、試薬や解析ファイル等を定期的に評価することも大切だろう。

今年度に不正解だった回答の原因から、来年度の全国規模でのMLVA法精度管理試験では受験施設が解析ファイルを正しく利用できるかを検証する必要があるだろう。検証のためには、典型的なTR数を持つ検体だけではなく、検体4-6の様な非典型的なTR数を持つ検体も配布することが望ましいと思われる。一方で、検体としては菌株ではなくDNAを配布するべきだろう。今年度、菌株検体を調製した際、施設間での検体の違いを少なくするために、1つのコロニーを1回釣菌した後、連続して複数のカジトン培地に植え継ぎ、各施設に1培地を配布した。しかし、施設Aの検体3において培地中の一部の細胞でTR領域を持つプラスミドが脱落していた。来年度は全国規模で精度管理試験を実施するために、この様な現象が起こった検体を受け取る施設が増えるだろう。また、来年度はMLVA法の検査精度が高くない施設も受験すると思われる。全国規模での試験で菌株検体を配布し、受験施設がプラスミド上のTRが未検出と回答した場合、検査精度が低いためか、またはプラスミドの脱落が起きたためかの特定が困難になるかもしれない。今年度に行った実験方法に関するアンケートによると、施設間で菌株検体からのDNA抽出法は様々だった（アルカリ熱抽出法、キレックス樹脂試薬による抽出法、及び抽出を行わずコロニーダイレクトPCR法）。不正解の原因がDNA抽出法でなかったことからMLVA法の精度評価で重要な点はPCR法以降と思われる。

## E. 結論

近年、日本で分離されたEHEC 0157、026及び111菌株に対してもMLVA法は高い分離能を持っていた。MLVA法を用いた同一クローン由来菌株の異同判定はDLVまでと思われる。近年、全国で分離された菌株においてMLVA法データの多様性は高かった。来年度に実施予定MLVA法精度管理試験では、受験施設が解析ファイルを正しく利用できるかを検証する必要がある。

## 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国立感染症研究所 細菌第一部の泉谷秀昌先生に深く感謝申し上げます。何より、業務ご多忙の中、本年度のMLVA法の精度管理試験にご参加くださり、惜しみないご貢献をくださいました地方衛生研究所の先生方に心より感謝申し上げます。

## 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) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40 (5): 83-85, 2019
- 4) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 39 (5): 74-77, 2018
- 5) 小嶋ら, 病原微生物検出情報, 34 (5): 127-128, 2013
- 6) 泉谷ら, 日本食品微生物学会雑誌, 36(1): 10-12, 2019
- 7) Mellor, et al., Appl Environ Microbiol, 78(13): 4724-4731, 2012
- 8) Seto, et al., J Microbiol Methods, 139: 12-14, 2017
- 9) Yokoyama, et al., Int J Food Microbiol, 264: 39-45, 2018
- 10) Hunter, et al., J Clin Microbiol, 26: 2465-2466, 1988
- 11) Tamura, et al., Mol Biol Evol, 38(7):3022-3027, 2021
- 12) Rumore, et al., BMC Genomics, 19 (1): 870, 2018
- 13) Rusconi, et al., Front Microbiol, 7: 985, 2016
- 14) Moran-Gilad, et al., Epidemiol Infect 145: 2998-3006, 2017
- 15) 河合ら, 岡山県環境保健センター年報, 43, 79-85, 2019

## 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

所属：   
 担当者：

### 1. 問題及び回答

検体1-6について反復配列多型解析（MLVA）法を行い、Tandem Repeat（TR）数をご回答ください。

日常の検査において貴所で実施している方法（DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等）でMLVA法を行ってください。

TR数が算出できない遺伝子増幅が見られた場合はUNとご記入ください。また、その増幅産物のサイズ（bp）をご記入ください。

各検体の結果について、詳細に説明したい事がある場合は備考欄にご記入ください。

検体名	種類	TR数（上段）及び遺伝子増幅産物のbp数（下段）																
		EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
記入例	菌株	5	2	6	3	-2	UN	7	-2	4	-2	4	10	3	-2	2	-2	7
		721																
検体1	菌株																	
検体2	菌株																	
検体3	菌株																	
検体4	DNA																	
検体5	DNA																	
検体6	DNA																	

備考欄

以上で、「1. 問題及び回答」は終了です。誠に有難うございました。

図1 腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法精度管理試験での回答用紙

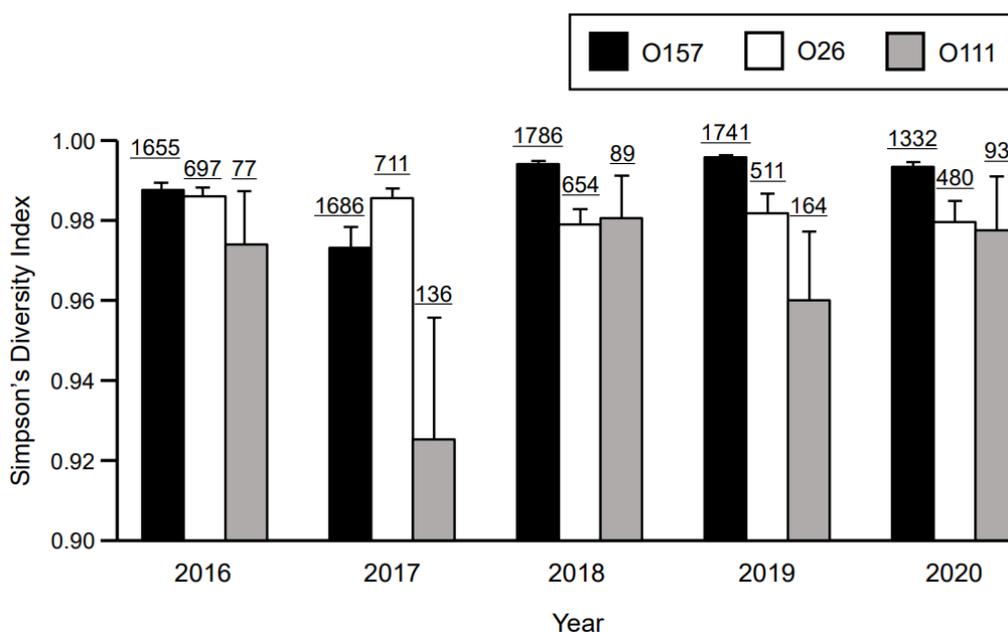


図2 EHEC菌株の各血清型におけるMLVA法遺伝子型の多様性

各血清型のSimpson's Diversity Indexを示す棒の上に書かれているアンダーバーがある数値は、各年に国立感染症研究所へ搬入された菌株数を示す。

表1 受験施設に配布したEHEC菌株

(A) 菌株検体

検体	グループ	MLVA法の各遺伝子領域におけるタンデムリピート (TR) 数																	血清型
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	I	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7	O157
	II	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	12	9	11	5	5	7	4	6	
2	I	2	1	1	2	3	8	13	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2	O26
	II	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	
3	I	4	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6	O111
	II	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	9	

(B) DNA検体

検体	グループ	MLVA法の各遺伝子領域における TR 数																	血清型
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
4	I、II	2	-2	1	3	-2	10	5	-2	-2	4	9	-2 <sup>a</sup>	2	5	8	8	8	O157
5	I、II	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN <sup>b</sup>	O26
6	I、II	4	1	5	2	-2	8	6	10 <sup>c</sup>	3	-2	3	14	2	-2	1	-2	7	O111

<sup>a</sup> EHEC O157の中では、領域O157-9のTRが-2である菌株は少数派であるため。

<sup>b</sup> 9つのTRを持つが、TR付近に遺伝子の欠損が起きている。MLVA法でPCR法を行うと、TR数が6及び7の間に相当する遺伝子増幅産物が確認される。

<sup>c</sup> EHEC O111の中では、領域EHC-5のTRが-2ではない菌株は少数派であるため。

表2 海外で発生したEHECによる集団食中毒事例または集団感染事例由来の菌株における*in silico*でのMLVA法

(A)カナダで発生した生殻付きクルミを原因とする集団食中毒事例<sup>10)</sup>

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 <sup>a</sup>	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 <sup>a</sup>	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>a</sup>	EHC -6 <sup>a</sup>	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	9	16	5	24	8	8	6	5
2	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	7	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	9	NF <sup>c</sup>	5	24	8	8	6	4
3	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	12	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	NF <sup>c</sup>	NF <sup>c</sup>	5	24	8	8	6	1
4	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	12	NF <sup>b</sup>	11	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	6	9	16	6 <sup>d</sup>	24	8	8	6	1

<sup>a</sup> EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCR法により遺伝子増幅が確認されない領域。

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>c</sup> 一部の菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>d</sup> 他の菌株とTR数が異なった。

(B)アメリカ合衆国で発生したクッキー生地を原因とする集団食中毒事例<sup>11)</sup>

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 <sup>a</sup>	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 <sup>a</sup>	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>a</sup>	EHC -6 <sup>a</sup>	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	3	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	12	8	12	4	6	11	NF <sup>b</sup>	5	3

<sup>a</sup> EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCR法により遺伝子増幅が確認されない領域。

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

(C)アメリカ合衆国で発生したピザを原因とする集団食中毒事例<sup>11)</sup>

MLVA 型	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14 <sup>a</sup>	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7 <sup>a</sup>	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>a</sup>	EHC -6 <sup>a</sup>	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	
1	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	7	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	5	NF <sup>b</sup>	2
2	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	8 <sup>d</sup>	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	5	NF <sup>b</sup>	1
3	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	7	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	6 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	1
4	O157	2	NF <sup>b</sup>	1	6	NF <sup>b</sup>	6 <sup>d</sup>	4	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	8	10	7	4	3	5	4 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	1

<sup>a</sup> EHEC O157の菌株の大半において、MLVA法のPCRにより遺伝子増幅が確認されない領域。

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>d</sup> 他の菌株とTR数が異なった。

パターン	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																	菌株数
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5 <sup>e</sup>	EHC -6	O157 -3 <sup>e</sup>	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17 <sup>e</sup>	O157 -19	O157 -36 <sup>e</sup>	O157 -37 <sup>e</sup>	
1	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	-2	1	6 <sup>d</sup>	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
2	O26	2	1	1	2	3	6	5 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	-2	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
3	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	-2	1	10 <sup>d</sup>	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
4	O26	2	1	1	2	3	6	NF <sup>c</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	-2	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
5	O26	2	1	1	2	3	6	17	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	-2	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1
6	O26	2	1	1	2	8 <sup>d</sup>	6	5 <sup>d</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	-2	1	11	2	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	NF <sup>b</sup>	1

**(D) イスラエルの保育園で発生した集団感染事例<sup>12)</sup>**

<sup>b</sup> 全ての菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>c</sup> 一部の菌株のシーケンスデータにおいてTRを検出できなかった。

<sup>d</sup> 他の菌株とTR数が異なった。

<sup>e</sup> EHEC O26の菌株の大半において、MLVA法のPCRにより遺伝子増幅が確認されない領域。

表3 施設間で回答に違いが見られた検体及び遺伝子領域

(A) 検体3の領域EH111-11

施設	TR 数	遺伝子増幅産物	備考欄の概要
G	UN	437 bp	TR 数が 2 及び 4 の間に相当する遺伝子増幅産物が見られた。
F、H、I、J	3	記載なし	記載なし。

(B) 検体5の領域O157-37

施設	TR 数	遺伝子増幅産物のサイズ	備考欄の概要
A、D、E、H、J	UN	約 120 bp	記載なし。
F、G	UN	約 120 bp	フラグメント解析ソフト GeneMapper の Bin には含まれない遺伝子増幅産物のピークが見られた。TR 数が 6 及び 7 の間に相当する遺伝子増幅産物のピークが見られた。
B	7	記載なし	TR 数が 6 と 7 の Bin の間に遺伝子増幅産物 (120.61bp) のピークが見られた。所属の判定基準から TR 数を 7 と判定した。
I	6.5	記載なし	GeneMapper の Bin には含まれない遺伝子増幅産物のピークが見られた。シングル PCR 法により非特異的な増幅でないことを確認した。遺伝子増幅産物についてサンガーシーケンスを実施し、サイズを 123 bp と決定した。PCR 法ではオフセット 84 bp、1 個の TR は 6 bp であることから、計算により TR 数を 6.5 とした。
C	9	記載なし	TR 数が 6 及び 7 の間に相当する遺伝子増幅産物が見られた。サンガーシーケンスにより塩基配列を確認したところ TR 数を数えて 9 と判定した。なお、オフセット領域で 15 bp (TR 数 2.5 個相当) の欠落が起きていた。

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 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
泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真	2020年に分離された腸管出血性大腸菌のMLVA法による解析。	IASR	42	96-97	2021年5月
李謙一、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真	国内で分離された腸管出血性大腸菌の全ゲノム配列データベース化と食中毒事例の解析。	IASR	42	97-98	2021年5月
Nakamura K, Ogura Y, Gotoh Y, Hayashi T	Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in <i>Escherichia coli</i>	PLoS Pathogens	17(4)	e1009073	2021
Nakamura K, Tokuda C, Arimitsu H, Etoh Y, Hamasaki M, Deguchi Y, Taniguchi I, Gotoh Y, Ogura Y, Hayashi T.	Development of a homogeneous time-resolved FRET (HTRF) assay for the quantification of Shiga toxin 2 produced by <i>E. coli</i> .	PeerJ	9	e11871	2021

<p>Nishida R, Nakamura K, Taniguchi I, Murase K, Oooka T, Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Toyoda A, Mainilä JG, Piérard D, Seto K, Harada T, Isobe J, Kimata K, Etoh Y, Hamasaki M, Narimatsu H, Yatsuyanga J, Kameyama M, Matsumoto Y, Nagai Y, Kawase J, Yokoyama E, Ishikawa K, Shiimoto T, Lee K, Kang D, Akashi K, Ohnishi M, Iyoda S, Hayashi T.</p>	<p>The global population structure and evolutionary history of the acquisition of major virulence factor-encoding genetic elements in Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> O121:H19</p>	<p>Microbial Genomics</p>	<p>7(12)</p>	<p>000716</p>	<p>2021</p>
--	--	---------------------------	--------------	---------------	-------------

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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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



厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人九州大学

所属研究機関長 職 名 総長

氏 名 石橋 達朗

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

## 6. 利益相反の管理

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

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



厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字

次の職員の令和3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 (所属部署・職名) 実地疫学研究センター・センター長  
(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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



厚生労働大臣 殿

機関名 国立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3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
- 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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4年4月14日

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

次の職員の令和3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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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



厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和3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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。

