

別紙1

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4年度 総括研究報告書

研究代表者 明田 幸宏

令和5（2023）年 5月

別添 2

目 次

I. 総括研究報告

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・・・1

研究代表者 明田幸宏

II. 分担研究報告

1. 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発・・・9

林 哲也

2. 感染症発生動向調査（NESID）をベースとした腸管出血性大腸菌感染症を原因とする広域食中毒探知と対応の取り組み・・・13

砂川富正

3. 食品由来株の収集・・・16

工藤由起子

4. 動物由来株の収集と分子型別・・・26

寺嶋 淳

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・・・43

平井晋一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・63

厚生労働省科学研究費補助金
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

明田幸宏（国立感染症研究所 細菌第一部 部長）

研究協力者

李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

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 900 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。

地方衛生研究所における全ゲノム配列解析の課題を抽出する目的で、沖縄県衛生環境研究所と協同して、Oxford Nanopore 社（ONT）シーケンサーによるデータ解析および全ゲノム配列解析環境の構築を行った。ONT データの解析では、沖縄県内での腸管病原性大腸菌の解析を行い、イルミナシーケンサーと同等の解像度の型別を行えることが示された。解析環境の構築では、沖縄衛研で全ゲノム配列解析環境を構築した。同環境は、現在食中毒疑い事例の調査等で活用されている。また分担研究者の成果の概略も併せて示す。

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、多くの地方衛生研究所において次世代シーケンサーが導入されている。しかし、Oxford Nanopore 社（ONT）シーケンサーについては、単一塩基多型（SNP）等を用いた菌株間の関連性解析の知見が少ない。そこで、沖縄県衛生環境研究所（沖縄衛研）と協同して、ONT データを用いた病原性大腸菌事例の解析を行った。さらに、イルミナシーケンサーによるデータも含めた情報解析環境の構築を、沖縄衛研にて試験的に行った。

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 2022 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。

地方衛生研究所と協同した WGS 解析

沖縄県で 2022 年に発生した腸管病原性大腸菌（EPEC）O153 感染事例について、協同して WGS 解析を行った。本事例では、家族内感染 2 株および散発例 1 株が近い時期に分離されていた。そこで、沖縄衛研にて 3 株のゲノム DNA を抽出し、Rapid Barcoding Kit（Oxford Nanopore）でライブラリー抽出した後に、MinION にて R9.4 のフローセル（Oxford Nanopore）を用いてシーケンス解析を行った。得られた Fast5 ファイルを感染研に送付後、Guppy basecaller にて、3 種のモデル（Rapid, High accuracy, Super accuracy）でベースコールを行った。それぞれの条件で得られた FastQ ファイルを用いて、Tracycler にてアセンブリを行った。アセンブリによって得られたコンプリートゲノムから ART を用いて疑似ショートリードを作製し、Lee ら（2021. Emerg Infect Dis 27:1509-1512）の方法を用いて core genome (cg)SNP を抽出した。また、解析を行った 3 株については、MiSeq (Illumina) でも全ゲノム配列の解読を行った。上記と同様の方法で cgSNP を抽出し、ONT データによる結果との比較を行った。

地方衛生研究所における WGS 解析環境の構築

沖縄県衛生環境研究所における WGS 解

析環境を構築するために、同所のワークステーションへの Linux 仮想環境の構築および感染研・細菌第一部使用プログラムのインストールおよび動作確認を行った。

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、2564 株について分子型別解析を実施した。このうち 2275 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 95 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 665、O26 が 182、O111 が 55、O103 が 42、O121 が 19、O145 が 16、O165 が 5、O91 が 26 であった。得られたデータは 2023 年 5 月号の IASR の EHEC 特集号において公表される。

MLVA 型別を実施しデータを送付した地方自治体は、34 施設であった。MLVA データを送付し、感染研において統一型名を付与した菌株数は 884 株であった。このうち 482 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。

地方衛生研究所と協同した WGS 解析

Oxford Nanopore シークエンサーによるデータを解析した結果、ベースコールモデルによって結果が大きく異なっていた(図 X1)。すなわち、精度が最も低い Rapid によるベースコールでは、最も多数の

SNP が認められた。精度が中間の High accuracy および精度が最高の Super accuracy によるデータでは、菌株 22-13 および 22-18 間の SNP の数は同一であり、ゲノム中の位置も概ね同一であった。High accuracy では 22-17 および 22-18 間の SNP は検出されなかったが、Super accuracy では両株間に 2 カ所の SNP が認められた。イルミナシークエンサーによる cgSNP 解析では、22-13 および 22-17/22-18 間で 2 カ所の SNP が認められた。22-17 および 22-18 間での差異は認められなかった。これらの SNP の位置は、ONT における High accuracy データと概ね一致していた。各条件で得られたコンプリート配列を比較したところ、Super accuracy およびイルミナ(ONT データで得られた配列をイルミナデータで修正した配列)によって得られた配列間では 47 か所、High accuracy およびイルミナ間では 241 か所の違いが認められた。これらの大部分はホモポリマー(同一塩基が連続する配列)上に存在していた。

地方衛生研究所における WGS 解析環境の構築

沖縄衛研の解析ワークステーションに、基本的な WGS 解析(アセンブリおよび cgSNP 解析)を行うことが可能な環境を構築した。同環境は、現在沖縄衛研においてセレウス菌等の食中毒調査に活用されている。

D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年より約 10%増加した。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 900 株に上った。このうち 55%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。

地方衛生研究所と協同した WGS 解析の結果、ONT シークエンサーによって得られたデータは、High accuracy または Super accuracy のベースコールを行うことで、イルミナデータと同等の cgSNP 解析が行える可能性が示唆された。ONT によるデータは精度が低いとされる。実際にホモポリマー部分ではイルミナデータとの齟齬が認められたが、このような部分は insertion/deletion (indel) とされ cgSNP 解析には含まれない。このため、cgSNP 解析結果には影響がなかったと考えられる。今後、より多数の事例の解析によって、ONT データ解析の妥当性を評価する必要がある。一方、ONT データは容量が非常に大きい（数 G byte 以上）ため、送付時にデータが破損する例が見られた。このため、地方衛研である程度の解析を行った後に情報を共有するのが効率的と考えられた。

データ解析環境の構築では、感染研・細菌第一部で使用中のプログラムのインストールを行ったが、一部専門知識が必要

であり、情報解析に慣れない担当者が行うのは困難であることが判明した。今後、より簡易に解析環境を構築可能な体制を整える必要がある。

E. 結論

地方衛生研究所と協同した WGS 解析や解析環境構築によって、ONT シークエンサーでもイルミナシークエンサーと同様な菌株間関連性解析が可能であることが示唆された。一方で、解析データや解析環境の共有についてはより簡易・効率的な方法が必要であると考えられた。

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（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）
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、前年度までに引き続き、我が国で WGS を利用したサーベイランスと事例

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、欧米諸国におけるWGSの活用状況、使用する解析パイプラインやデータベース等の調査を文献情報を基に行うとともに、我が国での活用法について検討した。これと並行して、前年度までに収集している国内分離株のWGSデータの整理や再シーケンスを進めるとともに、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、公共データベースからのWGSデータの追加収集を行った。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、0165、0103、0157 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。また、0145に関しては、WGSを利用してStx1ファージの多様性に関する詳細な解析も行った。

感染症発生動向調査（NESID）をベースとした腸管出血性大腸菌感染症を原因とする広域食中毒探知と対応の取り組み（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）

広域食中毒アラートとして、迅速な集団発生・広域散発事例の探知を目的として、食中毒情報以前の感染症情報である感染症発生動向調査（NESID）データを活用し、過去データに基づくベースラインとの比較により、特異なEHEC患者報告数の増加を迅速に探知することを目的として、レベル1－4のアラートシステムの開発に取り組んできた。また、広域食中毒アラートを端緒とした感染源の分析からさらに

汚染源へと迫る広い追及についても本分担研究グループの研究目的の一つとした。2019年から2022年までの状況として、全体を通してレベル4は2019年第44週に探知した0157VT1VT2による1回のみであった。レベル3以上の年毎の検知回数／厚生労働省への情報提供回数は、2019年（5回／4回）、2020年（2回／1回）、2021年（1回／0回）、2022年（3回／3回）であった。2022年は19週から22週にかけて、NESID上では東日本を中心に例年を上回る0157VT1VT2症例数の増加を認めたが（2週連続で+1SD以上となり、またイベント数20前後で推移したことからレベル3相当）、原因究明に繋がる情報は得られなかった。レベル分けの根拠とした情報は2018年のデータであり、直近の3年間は新型コロナウイルス感染症によるパンデミックによる大きな影響を受けていたと考えられる。厚生労働省への情報提供（注意喚起）は、アラートレベルの見に拠らず、MLVAの時間的・空間的拡がりについても加味したことから、2022年の厚生労働省への情報提供回数は3回と比較的多いように見えるが、実際には他の要因が含まれる。アラートレベルの設定及び情報提供のあり方について検討を進める必要がある。また、実際にこの3年間に、本研究をベースとした広域としての調査事例が無かったことから、省庁を超えた分析には至らなかった。

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衛生微生物部 部長）

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反復配列多型解析 (MLVA) 型の多様性を明らかにするため、食品由来 STEC 菌株を MLVA 法に供試し、MLVA 型多様性を解析した。その結果、MLVA 法に供試した STEC 菌株は、殆どが由来食品ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であり、1 株のみ 1 遺伝子座のリピート数が異なる株であった。同一検体中に MLVA 型が大きく異なる STEC が存在する可能性は低いことから、食中毒検査で同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一の MLVA 型の報告が過去に複数の自治体からあったことから、一層、食品を汚染する STEC の分離と分離株の MLVA 型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低いが複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

動物由来株の収集と分子型別 (研究分担者 寺嶋 淳 岩手大学農学部共同獣医学科 教授)

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。また、豚では STEC による浮腫病が知られているがヒトへの病原性は低いと考えられており、Non-0157 STEC による食中毒が報告されている状況でも豚の保有する STEC に関する情報は少ない。したがって、汚染源となり得る牛及び豚の 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 2021 年の 4 月から 2022 年の 8 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された豚 521 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。

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主任研究官)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学的解析法である反復配列多型解析 (MLVA) 法は、地方衛生研究所 (地衛研) における食中毒サーベイランスで用いられている。類似したタンデムリピート (TR) パターンを持つ EHEC 菌株が広域に蔓延することが、毎年、サーベイランスで確認されている。MLVA 法が分子疫学的解析法として有効で

あるためには、蔓延が一定期間で終わる原因が、菌株の多様性増加により MLVA 法で同一クローン由来と判断できなくなったためでないことを示す必要がある。また、MLVA 法が持つ能力をサーベイランスで活かすには、地衛研の検査精度も高くなければならない。そこで、蔓延菌株に対する MLVA 法の有効性を検証するために、長期的な継代培養を行い、蔓延菌株を模擬的に作成し、TR 数の変化を観察した。継代培養した LB Broth を平板培地に画線培養し、得たコロニーについて MLVA 法を行ったところ、培養 30 日目以降、TR 数が変化していた。150 日目まで継代培養を続けても、コロニーの TR 数の変化は 2 領域以内であり、同一クローン由来と判定できる範囲内だった。継代培養は、蔓延菌株が晒される環境と同じでないことを考慮する必要があるが、MLVA 法は宿主外で長期間に渡って変異が蓄積した菌株にも有効と思われた。次に、全国の地衛研を対象に MLVA 法の精度管理試験を行ったところ、参加した 37 施設中 30 施設が全検体に正しく回答した。不正解の検体があった施設に実験工程を照会したところ、基本的な工程を正しく行えていなかった。例えば、解析ファイルの Bin 設定が適切でなかった施設、電気泳動の際に DNA の添加を忘れた施設があった。これら施設に改善法を示したが、全地衛研の約 3 割は本研究で実施してきた精度管理試験に未参加である。我が国のサーベイランスの精度を上げるためにも、MLVA 法の検査精度試験の継続が必要だろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

なし

2) 学会発表

泉谷秀昌：分子疫学解析の現状と問題点、課題など（総括）。令和3年度希少感染症診断技術研修会、2022年2月オンライン

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（2021年）。第43回日本食品微生物学会学術総会、2022年9月、東京都

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

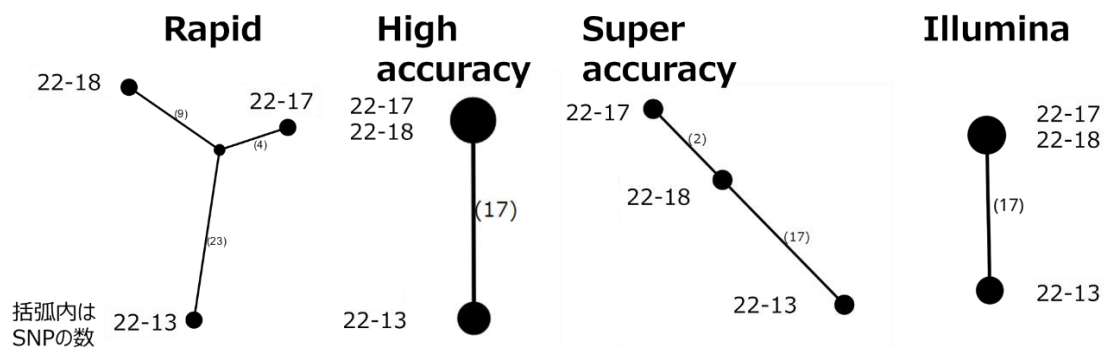


図 X1. ベースコールモデルおよびシーケンサー別にみた EPEC O153 における SNP による median joining tree

各ノード（丸印）は菌株を示す。カッコ内は SNP の数を示す。Rapid、High accuracy、および Super accuracy は Oxford Nanopore シーケンサーデータのベースコールモデルを示す。Illumina は、Illumina HiSeqX によって得られたデータを示す。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究
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、前年度までに引き続き、我が国で WGS を利用したサーベイランスと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、欧米諸国における WGS の活用状況、使用する解析パイプラインやデータベース等の調査を文献情報を基に行うとともに、我が国での活用法について検討した。これと並行して、前年度までに収集している国内分離株の WGS データの整理や再シーケンスを進めるとともに、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、公共データベースからの WGS データの追加収集を行った。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、O165、O103、O157 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。また、O145 に関しては、WGS を利用して Stx1 ファージの多様性に関する詳細な解析も行った。

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きた。本研究班の目的の 1 つは、MLVA に関する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、効率的に事例調査やサーベイランスを実施するための解析手法とデータベースの必要要件等を明らかにすることを目指している。また、これと並行して、これ

までに蓄積された国内分離株のゲノムデータと新たに取得する国内株のデータの整理と解析を行うとともに、海外株のデータを公共データベース（DB）から収集して 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指している。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であり、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とサーベイランス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、文献情報を基に欧米諸国（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調査した。

(2) 前年度までに引き続き、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/DDBJ と ENTEROBASE) からデータを追加収集した。WGS 情報の取得には、基本的にはイルミナ社のシーケンサ（サンプル数に応じて MiSeq または NovaSeq 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、ONT 社の 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。0145 と 0121 については、前年度までに収集した WGS データに加え、それぞれ *lac* オペロンと *iee* 遺伝子や IS との関係及び Stx1 フェージ領域の個別シーケンスを行い、その多様性等を解析した。

(倫理面への配慮)

該当しない

C. 研究結果

(1) 欧米諸国における 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。欧米では中国製 (MGI 社) のシーケンサの利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

ている。

解析パイプラインは、前年度までに報告したように、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状況も変化がない。国内（分担者も含む）では、Platanus-b もアセンブリに使用されており、近縁菌株の SNP 解析には BactSNP 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 のいずれかが使用できるが、ii) と iii) が主流である。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) を採用していることが多いが、解析対象によって異なり、国際的なコンセンサスは依然として得られていない。この点は、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、まだ国際的なコンセンサスは得られていない。したがって、国際的なコンセンサスに基づいて 国内で使用する解析パイプラインを決定することは難しい。

(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 DB 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。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、新たな収集は行わなかったが、0145 に関しては、既に収集した WGS データに加えて、Stx1 フェージ領域の個別シーケンスを新たに行い、Stx1 フェージ領域の詳細な解析から 0145 における Stx1 フェージの多様性を明らかにし、論文発表した。0121 についても、前年度までに収集した WGS データに加え、*lac* オペロンと *iee* 遺伝子や IS の関係を解析し、ラクトース利用能の多様性と多様化メカニズムを明らかにし、論文発表した。

0165:H25 に関しては、近縁株 (0172：

H25 EHEC を含む)を加えて、新たに clonal complex 119 (CC119)としてデータを収集整理し、197 株(国内は 77 株)のゲノム情報 DB を構築した。また、その系統解析などを行って、グローバルな集団構造とその中での日本分離株の分布を明らかにし、論文発表した。

0103:H2 に関しては、前年度の解析で、系統の大きくなる 2 つの系統が存在すること、また近縁株を含めた系統解析の過程で、近縁株を含めた clonal complex として解析する必要があることが判明したため、主要系統については、ST17 complex として、0 抗原型が異なる近縁株も含めた WGS データの収集整理を行なった。具体的には、主要系統の 0103:H2 に加えて、40 の血清型/69 の ST に属する 6,091 株の WGS 情報を収集した(国内株は 199 株)。現在、これらの株のうち、クオリティーの悪いものや菌株情報が不十分なものを除いた 5,051 株の WGS を使って大規模な系統解析を行っている。ST2307 に代表されるマイナー系統に関しては、少数の海外株(ベルギー株など)の WGS 情報を追加収集して 080:H2 を中心とした小規模な比較解析のみを行い、論文発表した。

0157:H7 のうち、特に病原性が高いと推察されている clade 8 株に関しては、前年度までに収集した 511 株(国内株は 150: 亜系統を代表する 18 株については完全長配列を取得)の詳細な解析から、グローバルな集団構造に加えて、clade 8 の中で Stx2 高産生性で重症化頻度の高い亜系統を同定するなどの知見を得て、論文発表した。0157:H7 全体に関しては、前年度に引き続いてグローバルな大規模 WGS 情報 DB の構築を進め、7,290 株(国内は 3,275 株)からなる DB を構築した。このうち、分担者が以前にシーケンスした国内分離株の中には、当時のライブラリー調整キットの性能の関係でクオリティーの低いものが多く含まれていたため、960 株を再シーケンスし、DB に組み込んだ。現在、これらの株の WGS を使って大規模な系統解析を行っている。

D. 考察

(1) 欧米諸国における 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り、集団事例に関連するクローンの判定基準についても未だに国際的なコンセンサスは得られていない。したがって、国内で使用するべき解析パイプラインに関しては、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は難しいと考えられ、WGS の幅広い活用を我が国で開始するためには独自のパイプラインを構築する必要があると思われる。この点では、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である。この場合、英国等で使用されている遺伝子セットと共通の大腸菌コア遺伝子セットも使用すれば、他の病原性大腸菌にも同じ解析パイプラインが利用できる。

(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、0157、026、0145、0103、0121、0165 の WGS データの収集・整理を進めているが、海外からの公共 DB への登録が急速に進んでいること、また 0103 や 0165 のように、血清型は異なるが極めて近縁の EHEC が存在することが明らかになったことから、0157 と 0103 では非常に大規模な WGS 情報 DB を構築することになった。他の血清型についても、幅広い継続的な収集と DB のアップデートが必要である。また、0103 や 0165 以外の血清型に関しても、近縁株を含めた DB に変更することを検討する必要がある。さらに、データ重複やクオリティーの問題、株情報の不備等の問題があるため、収集したデータに関しても、整理作業を行っていく必要がある。同時に、DB 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べきである。参照配列あるいは landmark となりうる株に関しては、完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備することも重要である。このような解析に加えて、国内株については Stx の産生量や臨床情報が利用できるという我が国の強みを生かして、0157:H7 clade 8 で行ったように、高リスク系統の同定やその発生動向変化などの解析も進めるべきである。

E. 結論

欧米諸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使用する解析パイプライン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、WGS の幅広い活用を我が国で開始するためには独自のパイプラインを構築する必要がある。

WGS 情報 DB の構築に関しては、主要 EHEC 血清群のうち、O157、O103、O165 の国内・国外分離株の WGS データの収集・整理を進め、海外株を中心に大幅に DB を拡張した。O103、O165 については、O 抗原型が異なる近縁株も含めた DB を構築した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yano B., Taniguchi I., Gotoh Y., Hayashi T., & Nakamura K.: Dynamic changes in Shiga toxin (Stx) 1 transducing phage throughout the evolution of O26:H11 Stx-producing *Escherichia coli*, Scientific Reports, 13(1):4935, 2023.
- (2) Nakamura K., Seto K., Lee K., Ooka T., Gotoh Y., Taniguchi I., Ogura Y., Jacques Georges Mainil, Denis Piérard, Harata T., Etoh Y., Ueda A., Hamasaki M., Isobe H., Kimata K., Narimatsu H., Yatsuyanagi J., Ohnishi M., Iyoda S., Hayashi T.: Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25, Microbial Genomics, 9:000959, 2023.
- (3) Miyata T., Taniguchi I., Nakamura K., Gotoh Y., Yoshimura D., Itoh T., Hirai S., Yokoyama E., Ohnishi M., Iyoda S., Ogura Y., Hayashi T.: Alteration of a Shiga toxin-encoding phage associated with a change in toxin production level and disease severity in *Escherichia coli*. Microbial Genomics, 9:0009935, 2023.
- (4) Ikeda R., Nakamura K., Saulmont M., Habets A., Duprez JN, Korsak N., Hayashi T., Thiry D., Mainil JG.: *Escherichia coli* O80 in Healthy Cattle: Absence of Shiga toxinogenic and Enteropathogenic *E. coli* O80: H2 and (Phylo) Genomics of Non-Clonal Complex 165 *E. coli* O80, Microorganisms, 11(2):230, 2023.

- (5) Nakamura K., Seto K., Isobe J., Taniguchi I., Gotoh Y., Hayashi T.: Insertion Sequence (IS)-Excision Enhancer (IEE)-Mediated IS Excision from the lacZ Gene Restores the Lactose Utilization Defect of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O121:H19 Strains and Is Responsible for Their Delayed Lactose Utilization Phenotype, Applied Environmental Microbiology, 88(16):e0076022, 2022.

2. 学会発表

- (1) 林哲也, 次世代シーケンサを活用した病原細菌と細菌感染症研究. 特別講演: 第54回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2022.11.5, 福岡.
- (2) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC O157:H7 clade 8 の世界的な集団構造と Stx2 と Stx2a フェージのバリエーション. 第96回日本細菌学会総会, 2023.3.16~18, 姫路.
- (3) 中村佳司, 瀬戸和子, 李謙一, 後藤恭宏, 伊豫田淳, 林哲也, 隠れた志賀毒素産生性大腸菌系統, Clonal complex 119(CC119)の集団構造と CC119 菌株の糖代謝. 第96回日本細菌学会総会, 2023.3.16~18, 姫路.
- (4) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊藤武彦, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC O157:H7 clade 8 のグローバルな集団構造および系統・Stx2a phage subtype と Stx2 産生量・重症度の関連性. 第24回EHEC研究会, 2022.10.13-14, 川崎.
- (5) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 志賀毒素産生性大腸菌 O26:H11 ST21 系統における Stx1 フェージゲノム多様性と Stx1 産生性. 第24回EHEC研究会, 2022.10.13-14, 川崎.
- (6) 西田留梨子, 中村佳司, 谷口愛樹, 伊豫田淳, 林哲也, STEC O121:H19のグローバルな集団構造と主要病原因子をコードする遺伝子の進化. 第24回EHEC研究会, 2022.10.13-14, 川崎.
- (7) 中村佳司, 勢戸和子, 磯部順子, 林哲也, Insertion sequence (IS)-excision enhancer (IEE)を介したISの切り出しによるSTEC O121:H19の乳糖分解性の変化における乳糖の関与. 第24回EHEC研究会, 2022.10.13-14, 川崎.

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）」
分担研究報告書

分担課題名 感染症発生動向調査（NESID）をベースとした腸管出血性大腸菌感染症を原因とする広域食中毒探知と対応の取り組み

研究分担者： 砂川 富正
所属（令和4年度）： 国立感染症研究所実地疫学研究センター長

研究要旨 広域食中毒アラートとして、迅速な集団発生・広域散发事例の探知を目的として、食中毒情報以前の感染症情報である感染症発生動向調査（NESID）データを活用し、過去データに基づくベースラインとの比較により、特異な EHEC 患者報告数の増加を迅速に探知することを目的として、レベル1－4のアラートシステムの開発に取り組んできた。また、広域食中毒アラートを端緒とした感染源の分析からさらに汚染源へと迫る広い追及についても本分担研究グループの研究目的の一つとした。2019年から2022年までの状況として、全体を通してレベル4は2019年第44週に探知した0157VT1VT2による1回のみであった。レベル3以上の年毎の検知回数／厚生労働省への情報提供回数は、2019年（5回／4回）、2020年（2回／1回）、2021年（1回／0回）、2022年（3回／3回）であった。2022年は19週から22週にかけて、NESID上では東日本を中心に例年を上回る0157VT1VT2症例数の増加を認めたが（2週連続で+1SD以上となり、またイベント数20前後で推移したことからレベル3相当）、原因究明に繋がる情報は得られなかった。レベル分けの根拠とした情報は2018年のデータであり、直近の3年間は新型コロナウイルス感染症によるパンデミックによる大きな影響を受けていたと考えられる。厚生労働省への情報提供（注意喚起）は、アラートレベルの見に拠らず、MLVAの時間的・空間的拡がりについても加味したことから、2022年の厚生労働省への情報提供回数は3回と比較的多いように見えるが、実際には他の要因が含まれる。アラートレベルの設定及び情報提供のあり方について検討を進める必要がある。また、実際にこの3年間に、本研究をベースとした広域としての調査事例が無かったことから、省庁を超えた分析には至らなかった。

研究協力者（令和4年度の主たる所属）：
加納 一彦（同上・品質保証・管理部）
土橋 西紀（同上・実地疫学研究センター）
高橋 琢理（同上・感染症疫学センター）
有馬 雄三（同上・感染症疫学センター）
高原 理（同上・感染症疫学センター）

A. 研究目的

本分担研究グループにおいては、詳細な菌株データが得られていない初期の段階において、患者の届出情報から早期に広域 EHEC 事例疑いを探知し、迅速な調査開始につなげることが研究開始当時の最大の目的であった。すなわち、広域に流通する食品による食中毒アラート（以下、広域食中毒アラート）として、迅速な集団発生・広域散发事例の探知を目的として、食中毒情報以前の感染症情報であ

る感染症発生動向調査（NESID）データを活用し、過去データから算出したベースラインとの比較により、特異な EHEC 患者報告数の増加を迅速に探知する試みとなる。厚生労働行政においては部局の垣根を超えての活動という点がチャレンジである。なお、事例に応じて発出された広域食中毒アラートを端緒とした感染源の分析からさらに（場合によっては農林水産部局の管轄する）汚染源へと迫る広い追及についても本分担研究グループの研究目的の一つとした。

B. 研究方法

広域食中毒アラート検出の具体的な検出の方法としては、集団発生（ポイントソース）による報告数増加の影響を除くため、集団発生症例（家庭内感染含む）をクラスタリングした件数（=イベント数）を過去と比較することとなる。アラートレベルは

患者イベント数／過去と比べてどの程度多いか
(週とベースラインからの逸脱度：標準偏差によって分類)の組み合わせとなり、分かりやすさを重視してレベル1－4と区分し(図1)、レベルごとに対応を規定した。このアラートレベルの設定と各レベルにおける分担研究グループによる対応の具体的な内容については以下になる。

【レベル2+まで】

内部注意喚起アラート：隠れクラスタの確認、情報収集、継続監視を実施する。国立感染症研究所感染症疫学センター／実地疫学研究センター(FETPを含む)内で監視を強化する。

【レベル3】

提供可否を都度判断：他の情報を確認(年齢性別分布や地域の偏り、重症度等を考慮)して判断する。厚生労働省(医薬・生活衛生局食品監視安全課等)に情報提供→重症度、地理分布や年齢・性別分布の偏りなどを考慮し総合的に判断する場合がある。

【レベル4】

厚生労働省への情報提供を実施：厚生労働省関係各所(医薬・生活衛生局食品監視安全課・健康局結核感染症課)に情報提供を実施する。

レベル4により規定される厚生労働省へのアラートの「回数」については、2018年のデータをベースに5回(程度)としてきた(図2)。これは、多過ぎず少な過ぎず、必ずアクションを求める前提では適切として試行的に設定したものである。以上について NESID から得られる情報を自動的に整理し、自動的に分類出来るようにプログラムを組んだ。レベル分けの根拠とした情報は2018年のデータであり、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)によるパンデミック前の時期であることに注意する。

		ベースラインからの逸脱度	
		+1SD以上2SD未満	+2SD以上又は 2週連続で+1SD以上
患者イベント数／週	1-9件	レベル1	
	10-19件	レベル2	レベル3
	20件-	レベル2+	レベル4

図1. アラート閾値設定

		過去と比べてどのくらい多いか	
		+1SD以上2SD未満	+2SD以上、もしくは、二週連続1SD以上
患者イベント数／週	1-9件	14回	
	10-19件	3回	2回 O157VT2・42週 O157VT1VT2・19週
	20件-	2回 O157VT1VT2・38週 O26VT1・35週	5回 O157VT2・30週 O157VT2・34週* O157VT1VT2・23週 O157VT1VT2・33週 O121VT2・35週

図2. アラートレベルの設定(COVID-19前の2018年に準拠)

(倫理面への配慮)

本研究ではラインリスト作成やそのための個人情報情報を扱わないことから倫理的な問題は発生しない。

C. 研究結果

2019年から2022年までの情報について列挙する。全体を通してレベル4は2019年第44週に探知したO157VT1VT2による1回のみであった。レベル3以上の年毎の検知回数／厚生労働省への情報提供回数は、2019年(5回／4回)、2020年(2回／1回)、2021年(1回／0回)、2022年(3回／3回)であった。2022年の厚生労働省への情報提供回数は3回と比較的多いように見えるが、実際には厳密にレベル別アラートとして情報提供を行った回数は1回のみであり、同一MLVAの時間的・空間的拡がりについても加味した点で他の情報提供と異なる。2022年のその1回については、リアルタイムな監視の状況(2022年21-22週)として、O157VT1VT2が東日本にやや多い等の疫学的な偏りの可能性を認めた。2022年6月10日の情報提供の内容は以下のとおりである。

- ・全国で診断週2022年19週から22週にかけて、NESID上では例年を上回るO157VT1VT2症例数の増加を認め、特に診断・週21週から22週にかけては、明らかにO157VT1VT2に起因するイベント数の増加がみられた(2週連続で+1SD以上となり、またイベント数20前後で推移したことからレベル3相当)。

- ・O157VT1VT2症例群は、やや女性に多いが、年齢層は幅広い。

- ・O157VT1VT2症例群は、地理的分布としては関東地方、北海道などの東日本が多い。

O157VT1VT2症例群は、事例調査(MLVAを含む)の情報も併せ、全体が単独の汚染原因によるものではないことが考えられるが、一部は広域流通している食材による事例の可能性もある。

- ・事例発生時には、迅速かつ丁寧な疫学調査・ゲノム解析がこれまで以上に重要であり、常に広域発生の可能性を念頭に置くと共に、再発予防のためには食材の汚染発生時点まで遡る連携した調査

が必要である。

・予防的には、これから腸管出血性大腸菌を始めとする食中毒がより増加する時期に入っていくこと、オミクロン株によるパンデミックの状況がやや落ち着き、人々の手洗い等の衛生に対する関心の低下が起こる可能性があることから、改めての国民に対する情報提供と注意喚起が必要である。

D. 考察

本研究は行政と連携して実施し、公衆衛生上の成果を上げることが必要である最たるものである。本分担研究グループが最大の目的とした EHEC 患者の届出情報から早期に広域事例疑いを探知し、迅速な調査開始につなげることについては、食中毒の前段階での EHEC 患者の届出時点を対象にしていることから、探知という点では一定の有用性を認めるシステムになっているものと考ええる。さらなる情報の深堀については、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課による自治体に対する詳細な情報収集が試みられた場面も少なくなかったが、総じて広域事例は各自治体においては単発・散発として発生していることは少なくなく、事例全体の情報収集やまとめを新たに追加的に行うことは出来なかった。広域事例全体の一部の可能性のある死亡例が発生した事例についての情報収集を、国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース (FETP) により実施出来た例はあったが、広域事例全体の感染源等の同定には至らなかった。各自治体にとっては散発である広域事例 (の可能性のある事例) に対する調査体制の整備が必要である。また、これまで、原因の可能性のあるメニュー・食品・食材に辿り着いても、その食品の汚染源までは分からず、多くは回収、再発防止策への取り組みに繋がってこなかった状況があったが、2022 年は特筆すべき事例発生も無かったと考えられた。国内でのエビデンスの集積と活用を厚生労働省のみならず農林水産省を含め、関係省庁全体で行える連携体制作りが重要である。

新型コロナウイルスを踏まえた研究実施にあたっての工夫としては、結果の項に記載したように、レベル 3 以上の年毎の検知回数/厚生労働省への情報提供回数は、2019 年 (5 回/4 回)、2020 年 (2 回/1 回)、2021 年 (1 回/0 回)、2022 年 (3 回/3 回⇒実際には 1 回) であった。COVID-19 がパンデミックとなった 2020 年からの回数の減少は明らかであり、COVID-19 パンデミック中のベースラインの変化に合わせたアラートレベルの設定変更の検討・試行が今後必要であると考ええる。さらに、2022 年に厚生労働省への情報提供を行う理由となった MLVA 情報に患者情報をどのように突合して効果的・効率的に行うための体制の構築についても今後、検討していきたい。

E. 結論

2018 年までのデータをベースに広域食中毒アラートの設定を行い、食中毒とは別システムである感染症発生動向調査のレベルで散発事例を広域事例として探知する仕組みを整えた。運用面で COVID-19 パンデミックの影響を強く受けていたと考えられ、閾値の改良を含む運用面の改善が急務である。更なる狙いであった汚染源の調査には至らなかったが、引き続き対応を強化していく。

F. 研究発表

1. 論文発表
特記事項無し
2. 学会発表
特記事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況 (あれば記載) (予定を含む。)

1. 特許取得
特記事項無し
2. 実用新案登録
特記事項無し
3. その他
特記事項無し

令和4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 明田幸宏 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

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反復配列多型解析 (MLVA) 型の多様性を明らかにするため、食品由来 STEC 菌株を MLVA 法に供試し、MLVA 型多様性を解析した。その結果、MLVA 法に供試した STEC 菌株は、殆どが由来食品ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であり、1 株のみ 1 遺伝子座のリピート数が異なる株であった。同一検体中に MLVA 型が大きく異なる STEC が存在する可能性は低いことから、食中毒検査で同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一の MLVA 型の報告が過去に複数の自治体からあったことから、一層、食品を汚染する STEC の分離と分離株の MLVA 型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低い複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬 昌平

国立感染症研究所

泉谷 秀昌

国立大学法人帯広畜産大学

佐々木 貴正

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) による食中毒は、その届出数や重症度も相まって日本の食中毒対策として最も警戒が必要となっている。

EHEC 集団感染事例の発生時には、感染源や感染経路の把握し、全国的な感染拡大を予防するために患者や食品から分離された菌株の迅速な解析が求められる。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。

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 型の迅速かつ正確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 法に供試する株数が少ないと、複数地域で食中毒事例に関連する同一 MLVA 型の株を見逃し、広域食中毒の早期探知に支障をきたす可能性がある。そのため、本研究では食品が同時に複数種類の EHEC 菌株に汚染されているかを確認するため、同一食品から分離された複数の志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 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、食品由来 STEC 菌株の基礎情報を蓄

積し、食中毒予防に資するために、令和 2 年度から令和 4 年度までに分離した食品由来株の保有病原因子関連遺伝子を解析し、薬剤感受性を判定した。

B. 研究方法

1) 菌株

令和 2 年度に食品 E (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 30 株、令和 3 年度に食品 F (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 30 株、令和 4 年度に食品 G (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 40 株、食品 H (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 35 株、食品 I (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 24 株、合計 159 株を供試した (表 1)。

2) DNA 抽出

カジトン培地に保存していた食品 G、H および I 由来株を Tryptone soya agar (OXOID) に画線し、37℃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 μ l に懸濁した。ヒートブロックで 100℃10 分間加熱した後、加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000 $\times g$ 10 分間遠心した上清を

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)。食品 G、H および I 由来の STEC 0157:H7 の抽出 DNA を鋳型として供試し、PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (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℃ の 15 分の熱変性ののち、95℃ 20 秒—60℃ 90 秒—72℃ 60 秒を 30 サイクルの増幅反応後、72℃ で 10 分間反応させた。増幅産物は Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (サーモフィッシュエンティフィック) 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ピート数を決定した。各遺伝子座ごとのリピート数を菌株間で比較した。また、得られたピークデータを MLVA 情報共有リストと照合し、過去に同一 MLVA 型の報告があるかを確認した。

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、食品 E、F、G および H 由来 STEC 0157:H7 各 1 株、I 由来の MLVA 型が異なる STEC 0157:H72 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)の方法で食品 E、F、G および H 由来 STEC 0157:H7 各 1 株、I 由来の MLVA 型が異なる STEC 0157:H72 株から抽出した DNA を鋳型として供試し、機器は PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (MJ research) および ProFlex PCR System (サーモフィッシュエンティフィック) 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)。

5) 病原因子関連遺伝子の解析

4)で抽出した DNA を PCR およびリアルタイム PCR 法の鋳型として供試した。*saa*、*iha*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*subA*、*katP*、*stcE* は、PCR 法で検出し、*eae* はリアルタイム PCR 法で検出した。機器は PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (MJ research)、VeritiPro 96 (Applied Biosystems) および QuantStudio5 リアルタイム PCR システム

(Applied Biosystems) を使用した。プライマーおよびプローブの配列を表 4 に示す。

6) 薬剤感受性試験

食品 E、F、G、H 由来の各一株、食品 I 由来株 1 および食品 I 由来株 2 を Tryptic soy agar (TSA、BD) に画線し 37℃ にて 18 時間培養した。培地上に生育したコロニーを滅菌 DW で懸濁した後、MUELLER-HINTON Broth に混合し、各ウェルごとに異なる濃度の薬剤（アンピシリン、セファゾリン、セフトキシム、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、コリスチン、クロラムフェニコール、トリメトプリム）が固着済の 96well プレートに接種した。35℃ で 16 から 20 時間培養し、ウェル底に直径 1mm 以上の菌体ペレットが確認できたウェルで菌の増殖を陽性と判定した。

C. 研究結果

1) 同一食品由来 STEC 菌株間での MLVA リピート数の比較

食品 G 由来の STEC 0157 菌株 40 株および食品 H 由来の STEC0157 菌株 35 株の 17 遺伝子座の各リピート数は各由来食品ごとに全株で同

一であった（表 5）。食品 I 由来株の STEC 0157 菌株は、23 株の 17 遺伝子座の各リピート数が同一であり、1 株が 1 遺伝子座のみリピート数が異なっていた。

2) 過去に報告された MLVA 型との照合

食品 E、F、H 由来の全株および食品 I 由来の 23 株（食品 I 由来株 1）の MLVA 型は、過去に自治体から報告された MLVA 型と同一であった（表 6）。食品 G 由来の全株および食品 I 由来の 1 株（食品 I 由来株 2）の MLVA 型は、未報告であった。

3) Stx サブタイプ型別試験

食品 E 由来の STEC 0157 菌株は、*stx2a* および *stx2c* を保有していた（表 7）。食品 F および G 由来株は、*stx2a* を保有していた。食品 H 由来株、食品 I 由来株 1 および食品 I 由来株 2 は、*stx2c* を保有していた。

4) 病原因子関連遺伝子の解析

食品 E 由来株は、*eae*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*katP* および *stcE* が陽性となった（表 8）。食品 F、G、H および I 由来株では、*eae*、*iha*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*katP* および *stcE* が陽性となった（表 8）。

5) 薬剤感受性試験

食品 E 由来株は、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールおよびトリメトプリムに耐性が認められ、食品 F、G、H 由来株および食品 I 由来株 1、2 では薬剤耐性が認められなかった（表 9）。

D. 考察

食品 G 由来株 40 株および食品 H 由来株 35 株は各由来食品ごとに全株が同一の MLVA 型であった。食品 I 由来株 24 株のうち、23 株は同一 MLVA 型であり、1 株は 1 遺伝子座のリピート数のみが異なる MLVA 型であった。以上の結果から、同一食品中に MLVA 型が大きく異なる STEC が存在する可能性は低いことが示唆された。このため、食中毒検査の際に同一検体から必要以上に多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品 E、F、G、H および I 由来株の一部は全国の自治体から報告された STEC と MLVA 型が一致した。これらの STEC が食品を介して広く食卓まで運ばれることで、食中毒リスクにつながる可能性が示唆された。また、食品由来 E、F、G、H および I 株は *stx2a* および *stx2c* を単独あるいは両方保有しており、共通して *eae*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、

ehxA、*katP* および *stcE* といった病原因子関連遺伝子を保有していた。そのため、これらの食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。食品 E（国産牛肉）由来株ではストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールおよびトリメトプリムに耐性が確認された。2020 年に動物医薬品検査所が行った調査では、ウシ由来大腸菌における耐性菌の出現頻度は、ストレプトマイシンで 14.6%、テトラサイクリンで 19.8%、クロラムフェニコールで 5.9% およびトリメトプリム（スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤）で 2.8% であり、食品 E 由来株の薬剤耐性と矛盾しない。その他の食品由来株では薬剤耐性が認められなかった。以上から、食品由来株が薬剤耐性を有する頻度は低い、複数の薬剤に耐性を有する菌株も確認されたため、注視する必要があると考えられた。

E. 結論

令和 4 年度に MLVA 解析に供試した食品 G、H および I 由来の STEC 0157 菌株 99 株は、殆どが由来食品ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であり、1 株のみ 1 遺伝

子座のリピート数が異なる株であった。同一検体中に MLVA 型が大きく異なる STEC が存在する可能性は低いことから、食中毒検査の際に同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一の MLVA 型の報告が過去に複数の自治体からあったことから、一層、食品を汚染する STEC の分離と分離株の MLVA 型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低いが複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 供試菌株

分離年度	由来	株数
令和2年度	食品E	30
令和3年度	食品F	30
令和4年度	食品G	40
	食品H	35
	食品I	24

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
Mix1	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGT TATATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTT ACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCT TCC	TTCATTAAATAAAAATCCCATGGAAAA TATTTTTTG GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACG CTC
	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
	EH111-8	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAAC GCTG
		PET	CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAA GCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTT TGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCTCGCCATCG
	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
Mix2	EH26-7	PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGAT AAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCT TTCTGGATGTTT	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAG C
	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATT GAAGA	CCTTGTGCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAA GA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGC AGTGATGA	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGG CGATC
	O157-36	NED	GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGT TAAAC	GCCGCTGAAAGGCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATC G	GGGTTTCCATTTTCTTTACCTTCAGG

表 3. Stx サブタイプ型別用プライマー配列

遺伝子	Forward	Reverse
stx1a	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG
stx1c	CCTTTCCTGGTACAACAGCGGTT	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA
stx1d	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA
stx2a	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG GCCACCTTCACTGTGAATGTG
stx2b	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	CAGCAAATCCTGAACCTGACG
stx2c	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	CCGGCCACACTTTACTGTGAATGTA
stx2d	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG GCCTGATGCACAGGTAAGGTG
stx2e	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT
stx2f	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	TAATGGCCGCCCTGTCTCC
stx2g	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT

表 4. 主要病原因子関連遺伝子のプライマーおよびプローブ配列

遺伝子	Forward	Reverse	Probe
eae	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	CTCATGCGGAAATAGCCGTTM	HEX-ATAGTCTCGCCAGTAT TCGCCACCAATACC-BHQ
saa	CGTGATGAACAGGCTATTGC	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	None
iha	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	TCCTTAAGCTCCCGGGGCTGA	None
espB	GCCGTTTTTGAGAGCCAGAAT	ATCATCCTGCGCTCTGCGAAC	None
espD	CGCTGGATTACAACTGGTTA	CCAGCTCAACCTTCGCACTCT	None
espP	GCTGGCAACCAGCAACAGCG	CGGTAGCCCGCTTCTGCACC	None
tir	CATTACCTTCACAAACCGAC	CCCCGTTAATCCTCCCAT	None
ehxA	ACAGCTGCAAGTGCGGGTCTG	GGGATGCACTGGAGGCTGCAC	None
subA	TATGGCTTCCCTCATTGCC	TATAGCTGTTGCTTCTGACG	None
katP	GCGCCAGTGGTGGTCAGCAA	ATATCGGGCTGCCGGTCCCA	None
stcE	GGCTCCGGAGGTGGGGGAAT	GAAGCCGGTGAGGAACGGC	None

表5. 食品 G、H および I 由来 STEC 0157 菌株の MLVA リピート数

菌株 由来	株数	MLVA リピート数																
		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
食品G	40	2	-2	1	3	-2	13	5	-2	-2	4	9	-2	4	4	8	6	5
食品H	35	2	-2	1	1	-2	7	8	10	-2	-2	5	12	5	3	6	10	7
食品I	23	2	-2	1	1	-2	7	8	10	-2	-2	5	12	5	3	6	10	7
	1	2	-2	1	1	-2	7	8	10	-2	-2	5	12	5	3	6	8	7

表6. 食品由来 STEC 0157 菌株の MLVA 型と過去の報告の照合

菌株 由来	分離年	株数	MLVA型	MLVA情報共有リストでの 同一MLVA型の報告
食品E	令和2年	30	20m0445	令和3年 6自治体 令和4年 3自治体
食品F	令和3年	30	17m0142	令和3年 2自治体
食品G	令和4年	40	22m0469	該当なし
食品H	令和4年	35	21m0453	令和3年 1自治体
食品I	令和4年	23	21m0453	令和3年 1自治体
		1	22m0470	該当なし

表7. 食品由来 STEC 0157 菌株が保有する Stx サブタイプ

菌株	Stxサブタイプ
食品E由来株	stx2a, 2c
食品F由来株	stx2a
食品G由来株	stx2a
食品H由来株	stx2c
食品I由来株1	stx2c
食品I由来株2	stx2c

表8. 食品由来 STEC 0157 菌株が保有する主要病原因子関連遺伝子

菌株	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>iha</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>	<i>tir</i>	<i>ehxA</i>	<i>subA</i>	<i>katP</i>	<i>stcE</i>
食品E由来株	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
食品F由来株	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品G由来株	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品H由来株	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品I由来株1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品I由来株2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

表9. 食品由来 STEC 0157 菌株の薬剤耐性

菌株	最小発育阻止濃度 (mg/L)											
	ABPC (32)*	CEZ (32)	CTX (4)	SM (32)	GM (16)	KM (64)	TC (16)	NA (32)	CPFX (4)	CL (16)	CP (32)	TMP (16)
食品E由来株	2	<1	<0.5	128	<0.5	<1	32	<1	<0.03	<0.12	32	>16
食品F由来株	2	<1	<0.5	4	<0.5	2	1	2	<0.03	<0.12	4	<0.25
食品G由来株	2	<1	<0.5	2	<0.5	<1	1	2	<0.03	<0.12	2	<0.25
食品H由来株	2	<1	<0.5	2	<0.5	2	1	2	<0.03	<0.12	2	<0.25
食品I由来株1	1	<1	<0.5	4	<0.5	2	1	2	<0.03	0.25	2	<0.25
食品I由来株2	1	<1	<0.5	4	<0.5	2	1	2	<0.03	0.25	1	<0.25

*Resistance breakpoint (mg/L)は Clinical And Laboratory Standards Institute に準じた。

AMPC:アンピシリン、CEZ:セファゾリン、CTX:セフォタキシム、SM:ストレプトマイシン、GM:ゲンタマイシン、KM:カナマイシン、TC:テトラサイクリン、NA:ナリジクス酸、CPFX:シプロフロキサシン、CL:コリスチン、CP:クロラムフェニコール、TMP:トリメトプリム

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 4 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

動物由来株の収集と分子型別

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	山田翔子	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	推野千紘	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。また、豚では STEC による浮腫病が知られているがヒトへの病原性は低いと考えられており、Non-O157 STEC による食中毒が報告されている状況でも豚の保有する STEC に関する情報は少ない。したがって、汚染源となり得る牛及び豚の 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 2021 年の 4 月から 2022 年の 8 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された豚 521 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 Ogtyping 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) 豚の直腸便からの STEC の分離収集

2021 年の 4 月から 2022 年の 8 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された豚 521 頭の直腸便および市販の豚肉を材料とした。採取した検体については明確な由来農場を把握することができなかったため、詳細な疫学的情報は不明である。糞便サンプル 1 g をノボバイオシンナトリウム (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, 上清を捨てた沈査に 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, 沈査を 450 μ L 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, 一晚培養した。残りの沈査から以下の方法で 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。上清を捨てた沈査に 100 μ L 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 μ L 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 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 μ L)

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

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℃, 一晚培養した。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℃, 一晚培養して 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℃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℃, 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。

2-1 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℃ 15 分間

94℃ 50 秒間

64℃ 40 秒間 35 サイクル

72℃ 1 分間

72℃ 3 分間

・ stx2a, stx2c, stx2d の PCR 反応条件

95℃ 15 分間

94℃ 50 秒間

66℃ 40 秒間 35 サイクル

72℃ 1 分間

72℃ 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。

2-2 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 μ 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℃, 1 晩培養した。培養後マッチ棒の頭 3~5 倍程度の菌体を回収し 3 mL の生理食塩液を入れた小試験管で懸濁した。懸濁液を 121℃, 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应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 μ L 滴下した。調製した抗原液の各検体 10 μ 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だけを陽性とし 1 分以降に遅れて出現する凝集塊や乳白色の背景に凝集塊が観察された微弱な凝集は陰性とした。混合血清で陽性と判断された場合、その混合血清を構成する単味血清を用いて凝集試験を行った。いずれの混合血清及び単味血清も陰性となった検体は大腸菌セット病原大腸菌免疫血清に含まれる O 群には該当しないと判定し、単独の単味血清が陽性となった検体のみをその単味血清名を O 群と判定した。

凝集試験で凝集塊が認められなかった検体に対しては Og typing PCR2)によって O 抗原の遺伝子を同定し Og 抗原とした。stx 遺伝子陽性検体のコロニーを 1 mL の LB broth に接種し 37℃, 1 晩培養した。100 μ L の培養液を 10,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し上清を捨て得られた沈査に 1000 μ L の TE buffer を加えて懸濁した。懸濁液を 100℃, 10 分間加熱した後 10,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し DNA テンプレートとした。20 種類のマルチプレックス PCR により Og 抗原を特定した。PCR 反応液組成及び PCR 条件は以下のとおりである。

・ PCR 反応液 30 μ L)

5 $\times$ K APA Taq Extra buffer no Mg
(KAPA) 6.0 μ L

Water	14.42 μ L
Primer Mix	3.52 μ L
MgCl ₂ (KAPA)	3.0 μ L
dNTP mix (KAPA)	0.9 μ L
KAPA Taq DNA polymerase (KAPA)	0.16 μ L
Template DNA	2.0 μ L
・ PCR 反応条件	
94°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

2-3 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 μ M 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(20 μ L)

10 $\times$ PCR buffer, -Mg (Invitrogen, カリフォルニア州)	2.0 μ L
MgCl ₂ (Invitrogen, カリフォルニア州)	3.0 μ L
Primer Mix	1.92 μ L
dNTP mix (Invitrogen, カリフォルニア州)	0.48 μ L
Taq DNA polymerase (Invitrogen, カリフォルニア州)	0.5 μ L
Water	11.1 μ L

Template DNA	1.0 μ L
--------------	-------------

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	

2-4 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 (CPFX) , 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, 2022] 。

2-5 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 μ 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 μ 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 μ Lに移し, 50°Cで 15~20 分間振盪 (40min⁻¹) 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 分以上氷上にて平衡化した。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 μ 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 μ 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 μ L

H buffer (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 147 μ L

滅菌蒸留水 1323 μ L

DNA サイズマーカーである CHEF DNA Size Standard Lambda ladder(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℃, 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。また、制限酵素 XbaI を用いて実験を行った結果類似したパターンを示した株の一部について、別の制限酵素である Bln I を用いて同様に PFGE を行った。制限酵素 Bln I は 20 units を使用し、制限酵素 BlnI を含む反応液の組成は、酵素を変更した点を除いて XbaI のものと同様である。

(3) 豚肉における志賀毒素産生性大腸菌の汚染状況調査

2022 年の 6 月から 11 月までに岩手県内で購入した豚ミンチ肉 48 検体および豚小腸 4 検体を材料とした。用いた検体の購入日、商品名、購入場所は表 10 に示した。

3-1 stx の PCR によるスクリーニング

本試験は「食品からの腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法」[厚生労働省, 2014] を参考とした。

食品検体 25 g をストマッカー袋に秤量し、ノボビオシン加 mEC (1) と同様) 培地 225 mL を加え、1 分間ストマッカー処理を行った後、42℃で 22±2 時間培養した。培養液 0.1 mL をマイクロチューブにとり、10,000 ×g, 10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH 85 µL を添加して 100℃で 10 分間加熱した。その処理液に滅菌した 1M Tris-HCl (pH7.0) 15 µL を加えて中和し、10,000 ×g, 10 分間遠心した。得られた上清を抽出 DNA とした。50 mM NaOH, 1M Tris-HCl (pH7.0) の組成は以下の通りである。

50 mM NaOH (20 mL)	
1 M NaOH	1 mL
Milli-Q water	19 mL
1 M Tris-HCl (pH 7.0)	
Trizma base	12.1 g
Milli-Q water	80 mL

Milli-Q water に Trizma base を溶解させたのち、塩酸を加え、pH 計測器で計測しながら pH 7.0 に調整した。その後 Milli-Q water で 100 mL に調整した。

抽出 DNA をテンプレート DNA とし、stx1, stx2 を検出する PCR を行った。本 PCR で用いた酵素、プライマー、サーマルサイクラーならびに PCR 反応液組成、

PCR 条件は前項 (1) と同様である。PCR 反応後、増幅産物を 2 %アガロースにより電気泳動を行った。泳動後、染色し、イルミネーターにて泳動像を確認した。用いた泳動バッファー、分子量マーカー、染色剤、イルミネーターは前項 (1) と同様である。

3-2. 分離培養

ノボビオシン加 mEC 培地で増菌培養した培養液をマッコンキー寒天培地に塗抹し、37℃で 18～24 時間培養した。

C. 研究結果

(1)-1. 豚直腸便検体における STEC スクリーニング及び分離

豚の直腸便 521 検体について stx1, stx2 遺伝子の有無を調べた。521 検体のうち stx1 または stx2 について陽性を示した検体は 252 検体 (48.4%) であった。内訳としては、stx1 のみが 3 検体 (0.6%)、stx2 のみが 246 検体 (47.2%)、stx1 および stx2 について陽性を示したのが 3 検体 (0.6%) であった。採材日別の stx 陽性率は表 6 に示した。最も高い陽性率を示したのは 2022 年 6 月 22 日の 59.3% であり、最も低い陽性率を示したのは 2022 年 8 月 2 日の 38.0% であった。また、各採材日ごとに検体を採取した順に並べると、陽性検体が続く箇所とほとんどない箇所があり、陽性検体はある程度まとまっていた (図 1)。

stx 陽性を示した 252 検体についてコロニーPCR を実施し、STEC 株を分離した。252 検体のうち、全体の 4.8%、陽性検体の 9.9% に当たる 25 検体から 26 株の STEC が分離された。26 株は全て stx2 の

み陽性であった。26 株について、各株における性状解析結果を表 1 に示した。

(1)-2. stx サブタイプの特異性

コロニーPCR により分離された 26 株について stx subtyping PCR を実施した。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、26 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。

(1)-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) の特異性

コロニーPCR により分離された 26 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 O8 で 5 株であった。凝集試験で O 抗原が決定されなかった 21 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 Og8 の 11 株で、次に Og9 の 4 株であった。他に Og89, 101, 162 が 2 株、Og22, Og100, Og180 が 1 株ずつ検出された。1 株 (表 7 の株番号 11) は凝集試験および Og-typing PCR で O 抗原型または Og 型を決定することができなかった。

(1)-4. 病原性因子遺伝子の検出

コロニーPCR により分離された 26 株について、6 種類 (stx1, stx2, eae, fliC, hlyA, rfbE) の病原性遺伝子の保有状況を調べた。26 株全てで stx2 は検出されたものの、stx 以外の病原性遺伝子は検出されなかった。

(1)-5. 薬剤感受性試験

コロニーPCR により分離された 26 株について、11 種類 (ABPC, CEZ, CTX,

GM, KM, TC, NA, CPM, CP, ST, MEPM) 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。26 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 23 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 については全ての株が感受性を示した。

(1)-6. PFGE の結果

コロニーPCR で得られた 26 株について制限酵素 Xba I を用いた PFGE を実施した。得られた泳動像を図 2-1 に示した。O8 または Og8 の 16 株から 2 つ (g, h), Og9 の 4 株から 1 つ (i), PFGE パターンの類似したグループがあった。グループ g, h については制限酵素 Bln I を用いた PFGE を実施した (図 2-2)。

グループ g は株番号 6~8 (表 1) の 3 株で構成された。採材日は 3 株とも 2021 年 7 月 27 日で検体番号が 8, 9, 10 と連続していた。この 3 株は Xba I, Bln I とともに類似したパターンを示し、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 6 番は耐性を示したのに対し 7, 8 番は中間耐性であった点、GM に 6, 8 番は感受性を示したのに対し 7 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 13~16 の 4 株で構成された。採材日は 4 株とも 2021 年 7 月

27 日で検体番号は 78, 80, 83, 89 であった。この 4 株は Xba I では類似したパターンを示したが、Bln I で切断した場合に株 14 と 15 は類似したパターンだったものの、株 13 と 16 では類似性は高いが少し違うパターンとなった。13, 14, 15 番は薬剤感受性の結果は全て共通していたが、16 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。

グループ i は株番号 22, 23 の 2 株で構成された。採材日は 2 株とも 2022 年 6 月 22 日で検体番号は 25, 31 であった。この 4 株は Xba I では一見類似したパターンであったが、一部若干の違いがみられた。株番号 25 は GM に感受性であったが、株番号 31 は中間耐性を示した点で異なっていた。

(2)-1 豚肉検体における STEC スクリーニング及び分離

豚ミンチ肉 48 検体および豚小腸 4 検体について stx1, stx2 遺伝子の有無を調べた。すべての検体で stx1, stx2 とともに陰性であり、陽性を示した検体はなかった。検体の情報と結果の一覧を表 2 に示した。分離培養では豚ミンチ肉 48 検体のうち 24 検体、豚小腸は 4 検体すべてでマッコニキ寒天培地で大腸菌と推測される乳糖発酵菌がみられた。豚ミンチ肉 11 検体では大腸菌の可能性が低い菌がみられ、13 検体ではコロニーがみられなかった。

D. 考察

本研究では豚の直腸便 521 検体より STEC を分離し、その株について性状解析した。

検体における *stx1*, *stx2* のスクリーニングでは 48.4%に当たる 252 検体で *stx1*, *stx2* のいずれかまたは両方が陽性を示した。また陽性になった 252 検体のうち 246 検体は *stx2* 陽性であった。また STEC 株分離率は 4.8%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%, 福山らは STEC 分離率 10.7%と報告している^{1), 2), 3)}。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、Fratamico らは *stx* 陽性率 70%, 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^{4), 5), 6)}。本研究では分離率は 4.8%とそれほど高くなかったものの、*stx* 陽性率は 48.8%とこれまで国内で報告されてきたものより高い数値となった。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、2003 年には福山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^{7), 8)}、引き続き国内の豚の STEC 陽性率や分離株の性状について調査する必要があると考えられる。分離率が低かった理由としてはバックグラウンドの微生物が多かった可能性や、目的の大腸菌が VBNC の状態であった可能性、手技的な問題等が挙げられる。

本研究で分離された 26 株は全て *stx2e* を保有していた。また 26 株中 16 株は O8 または Og8 に分類され、続いて Og9 が 4 株、Og89,101,162 が 2 株、他には Og100, Og22, 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⁹⁾。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¹⁰⁾。またアメリカにおける 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⁶⁾。よって今回分離された株は浮腫病原菌との関連が疑われるため、今後浮腫病原菌の特徴である F18 線毛の有無を調査するなどさらなる検討が必要であると考えられる。

一方、ヒトで食中毒の原因となることが多い O26, O103, O111, O121, O145, O157 といった主要 6 抗原の血清型の株は本研究では分離されなかった。病原性因子についても *eae* や *hlyA* といった病原性に大きく関わりとされる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¹¹⁾、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り、Zweifel らは豚の *Stx2e* 産生 STEC がヒトへの感染源となる可能性を排除できないと報告していることから¹²⁾、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、スルファメトキサゾール、アンピシリン、トリメトプリム、カナマイシンの順に実際の使用量が多い¹³⁾。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世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について考えるとヒトの医療に重大な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、類似したパターンを示したグループが 3 つ (g, h, i) あった。グループ g の株は Xba I, Bln I 共に類似したパターンを示した。これらは採材日が同じかつ検体番号が近いとため、同一農場由来の可能性が高いと考えられる。また、グループ h と i では類似したパターンをもつ株の中に、わずかに相違がある株がみられた。よってこれらは関連性を示唆する株と考えられる。さらに、スクリーニングにおいて陽性検体がある程度まとまっていたこともあわせて考えると、農場ごとに STEC の保持状況に差がある可能性が示唆される。

よって今後、農場間の差や農場をまたいで同一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

て把握することが必要だと考えられる。

本研究ではさらに豚検体および豚小腸検体における STEC 汚染状況を調査した。PCR によるスクリーニングの結果 stx 遺伝子陽性の検体はなく、今回調べた豚肉の STEC 汚染は極めて少ないと考えられた。その理由としては、今回調査した豚肉を処理した処理場や加工場での衛生管理レベルが高いことが考えられる。しかし今回の調査では検体数も少なく、前述のように糞便における STEC 陽性率は高い値であったことから、今後も調査を継続する必要があると考えられる。

(参考文献)

1. 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. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 52(5): 230-237.
2. 小林秀樹. (2014). 牛・豚が保有する病原性大腸菌の細菌学的特性の解明と疫学的解析基盤の構築. 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: 149-155.
3. 福山正文, 古畑勝則, 大仲賢二, 八木原怜子, 小泉雄史, 原元宣, 堂ヶ崎知格, 島田時博, 栗林尚志, 中澤宗生, 渡邊忠男. (2003). 豚からの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型. *感染症学雑誌*. 77(12): 1032-1039.
4. 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. *Int J Food Microbiol.* 264: 8-15.

5. Fratamico PM, Bagi LK, Bush EJ and Solow BT. (2004). Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swine Feces Recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study. *Applied and Environmental Microbiology.* 70(12): 7173-7178.

6. 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.

7. 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.

8. 福山正文, 古畑勝則, 大仲賢二, 八木原怜子, 小泉雄史, 原元宣, 堂ヶ崎知格, 島田時博, 栗林尚志, 中澤宗生, 渡邊忠男. (2003). 豚からの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型. *感染症学雑誌.* 77(12): 1032-1039.

9. 小林秀樹. (2018). 豚の浮腫病と離乳

後下痢ならびにそれらの対策について. *All about SWINE.* 53: 13-24.

10. 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.

11. 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 Diseases.* 185: 74-84.

12. Zweifel C, Schumacher S, Beutin L, Blanco J and Stephan R. (2006). Virulence profiles of Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Veterinary Microbiology.* 117(2-4): 328-332.

13. 農林水産省動物医薬品検査所. (2020). 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.

E. 結論

本研究では豚糞便 521 検体より STEC を分離し, その株について性状を解析した。*stx* 陽性率は 48.8% となり, 25 検体から 26 の株が分離された。陽性率はこれまで国内で報告されてきたものより高い値となったが, 公衆衛生学的に重要である, 主要な O 抗原や病原性因子を保有するような食中毒リスクの高い株は分離されなかつ

た。

さらに本研究では豚ミンチ肉 48 検体および小腸 4 検体における STEC 汚染状況を調査した。*stx* 陽性検体はなく、STEC による汚染の可能性は低いと考えられた。

今後は豚糞便由来株について由来農場の情報を収集する他、調査を継続し情報を蓄積すること、また調査する豚肉製品の種類を増やすことが必要であると考え。豚糞便や豚肉由来 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 食中毒の原因究明の一助となると考えられる。

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

・山田翔子, 和賀萌美, 推野千紘, 山崎朗子, 寺嶋淳. 岩手県の食肉処理場に搬入された豚の直腸便および豚肉における志賀毒素産生性大腸菌の性状解析. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会 令和 4 年 11 月 9 日~11 月 11 日

・山田翔子, 和賀萌美, 推野千紘, 山崎朗子, 寺嶋淳. 岩手県の食肉処理場に搬入された豚の直腸便における志賀毒素産生性大腸菌の性状解析. 第 24 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 令和 4 年 10 月 13 日~10 月 14 日

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

図 1 採材日別陽性率

210419			
1		51	
2		52	
3		53	
4		54	
5		55	
6		56	
7		57	
8		58	
9		59	
10		60	
11		61	
12		62	
13		63	
14		64	
15		65	
16		66	
17		67	
18		68	
19		69	
20		70	
21		71	
22		72	
23		73	
24		74	
25		75	
26		76	
27		77	
28		78	
29		79	
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40		90	
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			

210727			
1		51	
2		52	
3		53	
4		54	
5		55	
6		56	
7		57	
8		58	
9		59	
10		60	
11		61	
12		62	
13		63	
14		64	
15		65	
16		66	
17		67	
18		68	
19		69	
20		70	
21		71	
22		72	
23		73	
24		74	
25		75	
26		76	
27		77	
28		78	
29		79	
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			

211221			
1		51	
2		52	
3		53	
4		54	
5		55	
6		56	
7		57	
8		58	
9		59	
10		60	
11		61	
12		62	
13		63	
14		64	
15		65	
16		66	
17		67	
18		68	
19		69	
20		70	
21		71	
22		72	
23		73	
24		74	
25		75	
26		76	
27		77	
28		78	
29		79	
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40		90	
41		91	
42		92	
43		93	
44		94	
45		95	
46		96	
47		97	
48		98	
49		99	
50		100	
		101	

220602				
1		51		101
2		52		102
3		53		103
4		54		104
5		55		105
6		56		106
7		57		107
8		58		108
9		59		109
10		60		110
11		61		111
12		62		112
13		63		113
14		64		
15		65		
16		66		
17		67		
18		68		
19		69		
20		70		
21		71		
22		72		
23		73		
24		74		
25		75		
26		76		
27		77		
28		78		
29		79		
30		80		
31		81		
32		82		
33		83		
34		84		
35		85		
36		86		
37		87		
38		88		
39		89		
40		90		
41		91		
42		92		
43		93		
44		94		
45		95		
46		96		
47		97		
48		98		
49		99		
50		100		

220802				
1		51		101
2		52		102
3		53		103
4		54		104
5		55		105
6		56		106
7		57		107
8		58		108
9		59		109
10		60		110
11		61		111
12		62		112
13		63		113
14		64		114
15		65		115
16		66		116
17		67		117
18		68		118
19		69		119
20		70		120
21		71		121
22		72		122
23		73		123
24		74		124
25		75		125
26		76		126
27		77		127
28		78		128
29		79		129
30		80		
31		81		
32		82		
33		83		
34		84		
35		85		
36		86		
37		87		
38		88		
39		89		
40		90		
41		91		
42		92		
43		93		
44		94		
45		95		
46		96		
47		97		
48		98		
49		99		
50		100		

表 1 豚由来 26 株の性状一覧

株番号	採材日 (年月)	検体番号	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	MEPM	Xba I	Bln I
1	210419	#3-2	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	I	S	I	S	S	S		
2	210419	#77-1	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	R	S	S	R	I	S		
3	210419	#78-7	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	S	S	I	S	R	S		
4	210419	#78-11	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	R	S	S		
5	210727	#1-5	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	R	R	S	S	R	R	S		
6	210727	#8-20	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	R	S	g	g
7	210727	#9-2	2e	O8	—	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	I	S	S	S	R	S	g	g
8	210727	#10-15	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	g	g
9	210727	#23-1	2e	—	Og100	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	R	S	I	S	R	S		
10	210727	#38-15	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	I	I	R	S		
11	210727	#40-1	2e	—	OgUT	×	○	×	×	×	×	R	S	S	R	R	R	S	I	S	S	S		
12	210727	#70-3	2e	—	Og180	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S		
13	210727	#78-20	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h'
14	210727	#80-18	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h
15	210727	#83-1	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h
16	210727	#89-5	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	h	h''
17	211221	#2-2	2e	-	Og89,101,162	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	I	S	S	S		
18	211221	#3-2	2e	-	Og89,101,162	×	○	×	×	×	×	S	S	S	R	I	S	S	I	S	S	S		
19	211221	#24-3	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S	S		
20	211221	#87-2	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S		
21	211221	#93-1	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S		
22	220622	#25-5	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	i	
23	220622	#31-5	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	i'	
24	220622	#39-3	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S		
25	220622	#66-7	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S		
26	220802	#124-10	2e	-	Og22	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S		

図 2-1 XbaI を用いた PFGE 結果

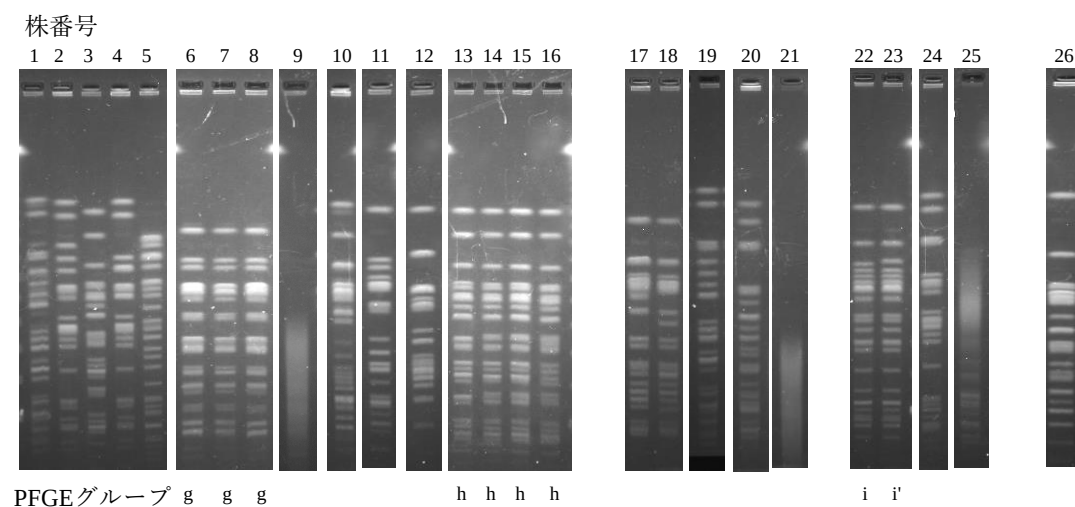


図 2-2 BlnI を用いた PFGE 結果

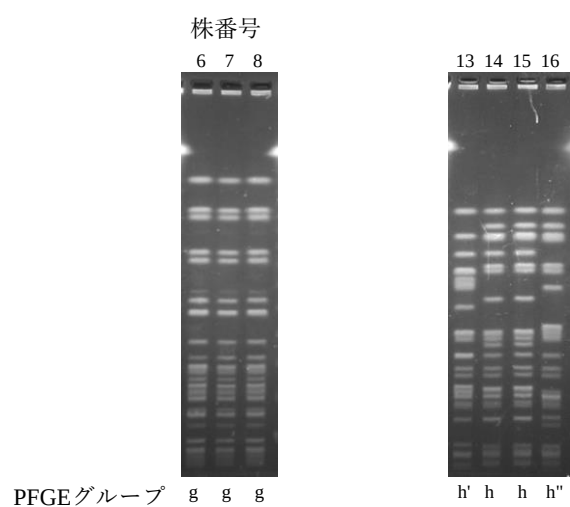


図 2 豚糞便から分離された STEC 26 株 PFGE 結果

表 2-1 豚ミンチ肉における結果

	購入日	購入場所	stx1	stx2	分離培養	
					(○：大腸菌	△：その他の菌)
1	220630	A	-	-	△	
2	220630	A	-	-	△	
3	220630	B	-	-	○	
4	220630	B	-	-	-	
5	221017	A	-	-	△	
6	221017	A	-	-	-	
7	221017	B	-	-	△	
8	221017	C	-	-	△	
9	221017	C	-	-	○	
10	221017	D	-	-	△	
11	221017	E	-	-	○	
12	221017	E	-	-	○	
13	221019	F	-	-	-	
14	221019	F	-	-	-	
15	221023	C	-	-	-	
16	221023	C	-	-	○	
17	221024	F	-	-	○	
18	221024	F	-	-	○	
19	221024	G	-	-	○	
20	221024	E	-	-	△	
21	221024	E	-	-	○	
22	221024	E	-	-	○	
23	221026	A	-	-	-	
24	221026	A	-	-	△	
25	221026	B	-	-	-	
26	221026	B	-	-	○	
27	221026	E	-	-	-	
28	221026	E	-	-	○	
29	221031	A	-	-	-	
30	221031	A	-	-	△	
31	221031	B	-	-	○	
32	221031	B	-	-	○	
33	221031	I	-	-	△	
34	221031	E	-	-	-	
35	221031	E	-	-	○	
36	221102	F	-	-	-	
37	221102	F	-	-	△	
38	221103	I	-	-	○	
39	221103	E	-	-	○	
40	221103	E	-	-	○	
41	221107	A	-	-	-	
42	221107	A	-	-	-	
43	221107	B	-	-	○	
44	221107	B	-	-	○	
45	221107	I	-	-	○	
46	221107	E	-	-	○	
47	221107	E	-	-	○	
48	221107	E	-	-	○	

表 2-2 豚小腸における結果

	購入日	購入場所	stx1	stx2	分離培養	
					(○：大腸菌	△：その他の菌)
1	220630	A	-	-	○	
2	221026	A	-	-	○	
3	221031	A	-	-	○	
4	221107	A	-	-	○	

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 明田 幸宏 国立感染症研究所 細菌第一部長
研究分担者 平井 晋一郎 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学的解析法である反復配列多型解析（MLVA）法は、地方衛生研究所（地衛研）における食中毒サーベイランスで用いられている。類似したタンデムリピート（TR）パターンを持つEHEC菌株が広域に蔓延することが、毎年、サーベイランスで確認されている。MLVA法が分子疫学的解析法として有効であるためには、蔓延が一定期間で終わる原因が、菌株の多様性増加によりMLVA法で同一クローン由来と判断できなくなったためでないことを示す必要がある。また、MLVA法が持つ能力をサーベイランスで活かすには、地衛研の検査精度も高くなければならない。そこで、蔓延菌株に対するMLVA法の有効性を検証するために、長期的な継代培養を行い、蔓延菌株を模擬的に作成し、TR数の変化を観察した。継代培養したLB Brothを平板培地に画線培養し、得たコロニーについてMLVA法を行ったところ、培養30日目以降、TR数が変化していた。150日目まで継代培養を続けても、コロニーのTR数の変化は2領域以内であり、同一クローン由来と判定できる範囲内だった。継代培養は、蔓延菌株が晒される環境と同じでないことを考慮する必要があるが、MLVA法は宿主外で長期間に渡って変異が蓄積した菌株にも有効と思われた。次に、全国の地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験を行ったところ、参加した37施設中30施設が全検体に正しく回答した。不正解の検体があった施設に実験工程を照会したところ、基本的な工程を正しく行えていなかった。例えば、解析ファイルのBin設定が適切でなかった施設、電気泳動の際にDNAの添加を忘れた施設があった。これら施設に改善法を示したが、全地衛研の約3割は本研究で実施してきた精度管理試験に未参加である。我が国のサーベイランスの精度を上げるためにも、MLVA法の検査精度試験の継続が必要だろう。

A. 研究目的

全国の地方衛生研究所（地衛研）では食中毒を早期に探知するために分子疫学的解析法によるサーベイランスが行われている¹⁾。これまで、サーベイランスでは菌株間の類似性を判定する能力（分離能）に優れたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法が用いられてきた。しかし、PFGE法は迅速性に欠け、さらに結果が画像データであるために自治体間での共有には不向きである¹⁾。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、規模も拡大しており²⁾、PFGE法では対応しづらい状況下にある。

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）は、特定遺伝子領域における繰り返し配列の（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³⁾。MLVA法の分離能は、PFGE法と同程度以上であると報告されている⁴⁾。また、

MLVA法ではPCR法を用いるため、PFGE法と比較し短時間で解析結果を出すことが可能である。さらに、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、つまり広域な食中毒への対応に適するとの利点もある。そこで、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）。

MLVA法がサーベイランスに用いられるようになってから、類似したTRパターンを持つEHEC菌株が一定期間、広域に蔓延することが、毎年、確認されている⁵⁾。これら菌株が分離された感染者の間には疫学的関連性が確認されないことが多い。しかし、菌株間のTRパターンの違いは1～2領域であることから、これら菌株は同一クローンから発生したと思われる⁴⁾。一般的に、病原体は宿主内では負の自然選択

圧がかかり、多様性が抑えられる⁶⁾。反対に、宿主外では正の自然選択圧がかかるために多様性が増加する。従って、類似したTRパターンを持つEHEC菌株の蔓延する原因として、あるクローンが食品流通網に乗ること等により宿主外で維持され、時間経過に伴い菌株の多様性が増加したと考えられる。一方で、蔓延が一定期間で終わる原因として、菌株が付着した食品等が消費されたことが考えられるが、もしかしたら、多様性が増加し過ぎてMLVA法では同一クローン由来と判断できなくなったのかもしれない。蔓延菌株に対するMLVA法の有効性を証明するためにも、宿主外で長期的に維持されたEHEC菌株のTRパターンの変化を調査するべきだろう。

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、地衛研での検査精度が高くなければならない。本研究では、地衛研でのMLVA法の検査精度を担保するために、以前から精度管理試験を実施する準備を進めてきた。2020年度には、精度管理試験での配布に適したEHEC菌株を選定し、DNAの抽出法も決めた。2021年度には、精度管理試験での検証項目を決定するために、一部の地衛研にご支援いただいてプレ試験を実施した。プレ試験では検体としてEHECの菌株及びDNAを配布したが、一部の菌株検体でプラスミドの脱落が起こり、TR数が検出不能となった。全国規模で精度管理試験を実施した際、このような現象が起こった検体を受け取る施設が増えると想定される。また、プレ試験では1施設からの回答が不正解であったが、不正解の原因はDNA抽出法でなく、フラグメント解析ソフトの使用法が正しくないことだった。そこで、本年度に実施予定の全国規模でのMLVA法の精度管理試験ではDNA検体を配布し、解析ソフトを正しく利用できるかを検証することにした。

本研究では、蔓延菌株に対するMLVA法の有効性を検証するために、長期的・連続的な継代培養により、蔓延菌株を模擬的に作成し、TR数の変化を観察した。次に、全国の地衛研を対象としたEHECのMLVA法の精度管理試験を行い、地衛研での検査精度を評価した。

B. 研究方法

1. 蔓延菌株に対する MLVA 法の有効性の検証

蔓延菌株を模擬的に作成するために、2つの方法で4菌株を長期的・連続的に継代培養した(表1)。1つ目の継代培養方法では普通寒天平板培地を用いた。具体的には、冷凍保存されている各菌株を普通寒天平板培地に画線塗抹し、37℃1晩、静置

培養した。滅菌済み綿棒で1つのコロニーを釣菌し、新しい普通寒天平板培地に隙間ができない様に塗布した。その後、10日間に3回の頻度で、以下の通り継代培養を行った。37℃で静置培養後、平板培地の半分に発育した菌体を滅菌済み綿棒で掻き取り、2 mLの生理食塩水に懸濁した。新しい滅菌済みの綿棒を懸濁液に十分に浸し、新しい普通寒天平板培地に隙間ができない様に塗布し、37℃で静置培養した。10日毎に、生理食塩水に懸濁しなかった菌体を培地から掻き取り、マイクロバンク(イワキ株式会社)を用いて、-20℃で冷凍保存した。最初の継代培養から150日が経過した時、長期的・連続的な継代培養を終了した。

2つ目の継代培養方法ではLB Broth, Lennox (Becton, Dickinson and Company)を用いた。具体的には、冷凍保存されている各菌株を普通寒天培地に画線塗抹し、37℃1晩、静置培養した。滅菌済み綿棒で1つのコロニーを3 mLのLB Brothに接種し、その後、10日間に3回の頻度で、以下の通り継代培養を行った。37℃で静置培養した後、マイクロピペットでLB Brothを良く懸濁し、200 μ Lを新しい3 mLのLB Brothに接種して37℃で静置培養した。10日毎に、新しいLB Brothに接種しなかったBrothを3000 $\times$ g、15分間遠心分離し、沈査を得た。その後、マイクロバンク(イワキ株式会社)を用いて-20℃で冷凍保存した。最初の継代培養から150日が経過した時、長期的・連続的な継代培養を終了した。

継代培養終了後、保存した菌体について以下の通りにMLVA法を行った。継代培養150日目のマイクロバンクの1つのビーズを取り出し、2 mL生理食塩水に懸濁後、懸濁液を普通寒天平板培地に画線塗抹した。37℃1晩、静置培養した後、15個のコロニーを釣菌した。InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories)を使って取扱説明書に従い各コロニーからDNAを抽出し、泉谷らの方法に準じてMLVA法を実施した⁴⁾。Multiplex PCR法で増幅した遺伝子についてはキャピラリーゲル電気泳動装置で電気泳動し、GeneMapper Ver 4.0 (Thermo Fisher Scientific)を使用しTR数を算出した。各菌株について、TR数に変異が見られたコロニーがあった場合、30日目、60日目、90日目及び120日目のマイクロバンクについても同様の方法でMLVAを行った。

2. MLVA法の精度管理試験の参加施設

地方衛生研究所全国協議会に加盟している地方衛生研究所等の施設から、都道府県及び政令指定都市に属する66施設を抽出した。これら施設から、昨年度の本事業により実施された精度管理プレ試験に参加した10施設を除いた56施設に参加の依頼をした(表2)。その結果、37施設から参加の承諾が得られた。参加施設の内訳は、北海道・東北・新潟地区が7施設、

関東・甲・信・静地区が5施設、東海・北陸地区が5施設、近畿地区が5施設、中国・四国地区から7施設、九州地区から8施設だった。

3. MLVA法の精度管理試験での問題内容

参加した全施設に同様のDNA検体を配布した。昨年度の精度管理プレ試験で用いた9菌株のEHEC 0157、026及び0111から4菌株を選び（表1）、これら菌株のDNAを検体とした。検体の調製方法としては、InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories) を用いて、EHEC菌株からDNAを抽出し、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) で20～25 ng/ μ Lに調製した。参加施設に検体を送付するまで-20℃で凍結保存した。問題内容として、4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）。4検体の内、検体4のみ1つの領域に非典型的なTR数を持っていた。検体4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ため、遺伝子産物はTR数が6と7の間で検出される。そこで、参加施設には「検体4も回答をお願いしますが、一部の領域が非典型的なTRを持つために本試験の評価対象としません。」と伝えた。しかし、施設からの回答を精査した結果、非特異的なTRをもつことが原因ではない検査工程の誤りが幾つか確認されたので、検体4も評価対象とした。また、参加施設には、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。問題と併せて、実験方法に関するアンケートを行った。

4. MLVA法の精度管理試験の実施工程

2022年12月14日（水）または15日（木）に、各参加施設に検体1-4を特定記録郵便にて常温で発送した。回答用紙については2022年11月25日（金）に各参加施設の担当者にエクセルファイル（図1）をメールにて送付した。回答締切りを2023年1月31日（火）とした。

5. MLVA法の精度管理試験における回答の評価

基本的に、各検体について全ての領域で表1のTR数と一致した場合、正解とした。ただし、検体4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内に入らなかつ

た。”と書かれている。」を正解とした。正解でなかった場合、その原因を明らかにするために、参加施設に検査工程を照会し、併せて泳動ファイルの送付を依頼した。

C. 研究結果

1. 蔓延菌株に対する MLVA 法の有効性の検証

普通寒天平板培地を用いて継代培養した菌株について、150日目のマイクロバンクを用いてMLVA法を行ったところ、菌株1～4の内、菌株1の1つのコロニーのみで領域0157-9及び領域0157-34のTR数が1つ増えていた（表3（A））。そこで、菌株1について、継代培養30日目、60日目、90日目及び120日目について同様にMLVA法を行ったが、TR数が変化したコロニーは確認されなかった。

LB Brothを用いて継代培養した菌株について、150日目のマイクロバンクを用いてMLVA法を行うと、菌株1～4の内、菌株2及び検体3でTR数が変異したコロニーが確認された（表3（B））。菌株2では継代培養60日目に領域EH111-8のTR数が不検出となった2個のコロニーが観察された。また、菌株2では継代培養90日以降に領域EHC-2のTR数が1つ減ったコロニーが継続的に確認された。検体3では継代培養30日目に領域EHC-1のTR数が1つ減った2個のコロニーが観察された。また、検体3では継代培養120日目及び150日目で領域EHC-6のTR数が不検出となったコロニーがそれぞれ5個及び12個、確認された。

2. MLVA法の精度管理試験の回答の評価

精度管理試験に参加した37施設の内、28施設が全検体に正解、6施設が1つ以上の検体で不正解だった（表4）。3施設は1つ以上の検体で判定保留だった。全検体に正解だった28施設の内、2施設はテイルドプライマーを使用していた。そのため、検体4の領域0157-37での遺伝子増幅産物のサイズが約127 bpだった。2施設の回答を判定保留とした理由は、検体4の領域0157-37についてTR数を7又は6と判定し、「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。」等の記載が無かったことだった。この件について、この施設にメールにて回答の根拠を照会したところ、「遺伝子増幅産物が解析ソフトのBinの外であることを認識していたが、近いBinのTR数と判定した。」との回答が得られたので、本試験では正解と扱った。残りの1施設の回答を判定不能とした理由は、全ての検体について複数領域でTR数をUN（つまり、TR数を算出できない）と回答したことだった。この施設に回答の根拠をメールで照会したところ、「問題文に“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。”と書かれていたので、他の蛍光色のピークが立つことで検出されるノイズをUNと回答した」とのことだった。問題文の意図を理解できなかったことから、判定不能とした。

不正解の検体があった6施設（施設A-F）の内、施設Aは検体2-4に不正解だった（表4、表5（A））。施設Aに、検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、2つの問題点があった。1つ目の問題点として、EH111-14のTR数を間違えた原因は、解析ソフトのBinの設定ミスだった。具体的には、TR数 = 1のサイズのBinがTR数 = 2と設定されていた。2つ目の問題点として、電気泳動の際にPCR産物の添加し忘れと思われた（図2（A））。MLVA法で検出される17領域は、2つのプライマーミックスを用いて行われるが、施設Aでは1つのプライマーミックスで検出される領域が全て-2となっていた。泳動ファイルを確認するとPCR法で反応しなかった蛍光プライマーのピークも検出されていなかった。

施設Bは検体2と検体4に不正解だった（表4、表5（B））。施設Bに、検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、全ての検体について領域間で遺伝子増幅効率に差があり、領域0157-9と領域0157-34のピークが低かった（図2（B））。施設Bは最もピークが低かった領域0157-9を-2と判定していた。検査工程を照会したところ、「試薬やキャピラリーの状態は悪くなかった（つまり、期限切れや使用回数を超えている状態ではない）。しかし、試験では、保存されていたプライマーミックスを使い、ミックスの調製時期は不明。」との回答が得られた。MLVA法では、領域0157-9は0157とそれ以外の血清型で使われるプライマーの配列が異なる。検体1はEHEC 0157、検体2と検体4はEHEC 026、検体3はEHEC 0111のDNAである。施設Bは検体1と検体3には正解したことから、プライマーミックス中で、026用の領域0157-9のプライマーの状態が悪くなっていたことが予想された。

施設Cは検体4の領域EH111-11のTR数を1と誤って回答していた。この施設に検査工程を照会したところ、記録用紙には正しいTR数である2が記入されていたが、回答用紙に転記する際に誤ったことが明らかとなった。

施設Dは検体2の非特異的なピークを領域0157-37のTR数 = 10と判定した（表4、表5（C））。施設Dに検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、検体2のこの領域において小さなピークが再現性良く観察されたことが分かった（図2（C））。実験工程についても不適切な事項は見当たらず原因を特定できなかった。

施設Eは全ての検体において領域EH111-11をUNと回答した（表4、表5（D））。施設Dに検査工程を照会し、泳動ファイル

の送付も依頼したところ、全体的にピークのサイズが小さく検出されており、領域EH111-11とEH157-12が特に小さくなっているのが分かった（図2（D））。また、シングルPCRで行っても同様の結果だった。実験工程についても不適切な事項は見当たらず原因を特定できなかった。照会の結果、施設Eは、現在、日常検査においてMLVA法を殆ど実施していないことも明らかとなった。

施設Fは検体4の領域EHC-6をUNと判定した表4、表5（E））。施設Fに泳動ファイルの送付も依頼したところ、検体4のEHC-6のピークは解析ソフトのBinの僅か外にあるピークをUNと判定していることが分かった（図2（E））。電話での照会の結果、「解析に使用した試薬やキャピラリーの状態は悪くなかった。」との回答が得られた。問題用紙に「検体4は一部の領域に非典型的なTRを持つ」と記載したことで、施設Fの判断を惑わした可能性があると思われる。

D. 考察

長期的・連続的な継代培養したEHEC菌株に対してもMLVA法は同一クローン由来と判定できた。継代培養には普通寒天平板培地及びLB Brothを用いたところ、培養150日目まで普通寒天平板培地では菌株1の1コロニーのみでTR数が変化したのに対して、LB brothでは菌株2及び菌株3で複数のコロニーでTR数が変化していた。LB brothでは菌株2も菌株3もそれぞれ培養60日目及び30日目までTR数の変化が観察されていた。これらの結果から、普通寒天平板よりLB brothでの培養の方が、正の自然選択圧が強く掛かっていると思われる。本研究では、地衛研でのサーベイランスで観察される類似したTRパターンを持つ菌株の蔓延が一定期間で終わる原因が、多様性の増加により、MLVA法で同一クローン由来と判断できなくなったためではないことの証明を試みた。しかし、普通寒天平板培地及びLB brothで150日培養してもTR数が変化した領域が2つ以内であり、その証明はできなかった。継代培養は、蔓延菌株が晒される環境と同じでないことを考慮する必要があるが、MLVA法は宿主外で長期間に渡って変異が蓄積した菌株にも有効と思われる。

LB brothでの培養では、TR数の変化において興味深い現象が見られた。LB brothでは、同じ培養日数で複数のコロニーが同様のTR数の変化を示した。例えば、菌株2をLB brothで60日間培養すると、2つのコロニーで領域EH111-8のTR数が不検出となった。また、LB brothでは、菌株2及び菌株3のどちらにおいても、培養初期と後半でコロニーのTR数の変化が異なっていた。例えば、菌株2では培養60日目に領域EH111-8のTR数が不検出となった2つの

コロニーが取れたが、90日以降、継続的に領域EHC-2のTR数が1減少したコロニーが観察された。これらの結果は、LB brothの培養では、特定の変異を持つ菌体が優勢な状態になり、優勢な菌体が置き換わることを示している。この現象が普通寒天平板培地では起こらず、LB brothで確認される原因を把握するためには、より詳細な検討が必要だろう。

本研究において全国規模でのMLVA法の精度管理試験を実施したことで、地衛研での検査精度には差があることが明らかとなった。参加施設全体としては、判定不能の1施設を除く36施設中、30施設が全検体に正しく回答できた。検体4の領域0157-37はMLVA法で非典型的なTR数を示すが、ある施設はこの検体について、MLVA法に加えてサンガーシークエンスも実施し、非典型的なTR数を示す原因を備考欄で回答した。その反面、MLVA法の基本的な実験工程を正しく行えず、不正解となった施設もあった。例えば、施設A及び施設Eは解析ソフトのBin設定に問題があり、TR数を正しく算出できなかった。また、施設Aは検体4を電気泳動する際、PCR法の遺伝子増幅産物の添加も忘れ、複数領域でTRが検出不能となった。施設Bは状態が悪いプライマーミックスを使用したため、複数検体でTRを検出できない領域があった。現在、MLVA法は地衛研での食中毒サーベイランスにおいて主流となっており¹⁾、更に、食中毒も広域化している²⁾。MLVA法を正しく実施できない地衛研があることは、我が国全体の公衆衛生に良くない影響を与えるだろう。以上より、本精度管理試験で不正解の検体があった施設には、早急に改善を求める必要があった。

MLVA法精度管理試験での回答評価後に、本法を正しく実施できなかった施設に改善法を提案できた。解析ファイルのBinの調整を誤っていた施設Aには正しいBin情報を提供できた。Binの調整が不十分であった施設Eには、調整が完了するまでの間、TRパターンが分かっているサンプルをコントロールとして一緒に電気泳動すれば対応できると伝えた。MLVA法の遺伝子増幅産物は実験日によって、泳動度が多少変化するため、既知のTRパターンをコントロールとする方法はBin調整済みの施設にも有効である。次に、施設Bには領域0157-9においてTRを検出できなかった原因として、026用のプライマーの状態が悪い可能性があることを伝えた。その後、施設Bからこの可能性が正しかったと連絡があった。令和5年2月に厚生労働省はEHEC 026に汚染された馬刺しが流通していると報道発表した。この事例由来のEHEC 026菌株は領域0157-9にもTR数を持つが、施設Bがこの菌株についてMLVA法を行ったところ、領域0157-9でTRを検出できなかった。そこで、プライマーミックスを調製し直したところ、正しい結果を得られた。他にも、施設Aは検体4においてPCR産物の添加

を忘れたが、このミスに気付く手段として、蛍光プライマーのピークを確認することが有効と伝えた。一方で、検体2で回答を誤った施設Dには改善方法を示せなかった。この施設は検体2の領域0157-37において非特異的なピークが再現性良く発生したことで、TR数の判定を誤った。回答評価後に実験工程を照会した上、泳動ファイルを取り寄せたが、問題がある点を特定できず、改善法をアドバイスできなかった。施設D以外からは検体2で非特異的なピークが観察されたとの報告が無かったが、特定の領域では非特異的なピークが発生し易いことが知られている。施設Dの原因を明らかにするためにも、今後、本精度管理試験に参加した全施設に対して非特異的なピークの発生について照会する必要があると思われる。

MLVA法精度管理試験では、全検体に正解した施設に対しても、検査精度の向上に有用な情報を提供できた。テイルドプライマーを使用した1施設は自身がテイルドプライマーを使用していることを認識していなかったが、解析ファイルのBinは調整済みだったために検体には正解できた。MLVA法の優れている点としてデータ共有性の高さが挙げられる¹⁾。本法の結果を異なる自治体間で共有する際、TRパターンではなく、泳動データを交換することもあり得る。そのような場合、自身がテイルドプライマーを使っていると認識していない場合、お互いの施設が誤った判断をしてしまうだろう。

MLVA精度管理試験の実施は今後とも必要と思われる。試験では、地方衛生研究所全国協議会に加盟する地衛研の内、都道府県及び政令市に属する66施設を対象とした。昨年度及び今年度に試験を実施し、合計47施設が参加したが、約30%の地衛研が未参加である。本研究で試験の対象としなかった中核市においてもMLVA法を実施できる施設もある⁷⁾。今後、これら施設におけるMLVA法の検査精度を把握し、向上させるためにも精度管理試験の継続は必要だろう。また、本年度の精度管理試験の結果、検査精度が高くない施設があった。これら施設へのMLVA法の検査精度の向上を図るためにも、精度管理試験の実施に加えて、研修会を開催する必要があると思われる。

E. 結論

長期的・連続的に継代培養したEHEC菌株をMLVA法で解析したところ、同一クローン由来と判定できる範囲内でのTR数の変化があった。これは、長期間に渡り変異が蓄積した菌株に対してもMLVA法が有効であることを示している。次に、全国の地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験を実施したところ、一部の施設でMLVA法を正しく実施できていなかった。これら施設

に問題の改善法を提案したが、未受験の施設もあることから、今後も精度管理試験の継続や研修実施の必要性がある。

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) 泉谷ら, 日本食品微生物学会雑誌, 36(1): 10-12, 2019
- 2) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40(5): 83-85, 2019
- 3) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 4) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 5) 泉谷ら, 病原微生物検出情報, 43(5): 108-109, 2022
- 6) Tanner, et al., Trends Microbiol. 26: 986-998, 2018
- 7) 泉谷ら, 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業 令和2年度総括研究報告書「食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究」, 1-19, 2020

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

- 1) Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Naoshi Ando, Junji Seto, Kyoko Hazama, Keigo Enomoto, Hidemasa Izumiya, Yukihiro Akeda, Makoto Ohnishi, Another advantage of multi-locus variable-number tandem repeat analysis that can putatively subdivide enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains into clades by *maximum a posteriori* estimation, PLOS ONE, 18(3): e0283684, 2023

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

別紙 1

所属：

担当者：

1. 問題及び回答

検体1～4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。

検体1～4は腸管出血性大腸菌O157、O26及びO111のいずれかのDNAです。

日常の検査において貴所で実施している方法（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1～3の回答は精度管理試験の評価対象です。検体4も回答をお願いしますが、一部の領域が非典型的なTRを持つために本試験の評価対象としません。

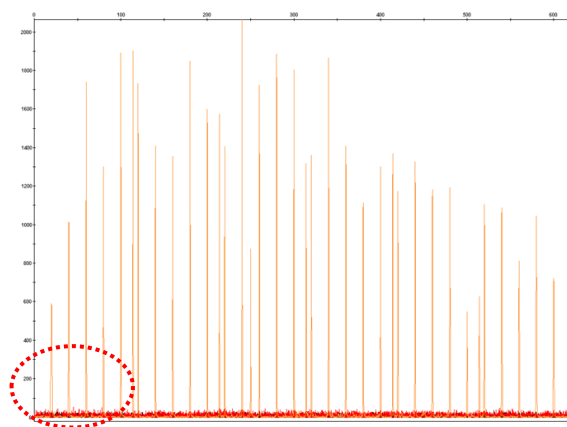
検体名	TR数（上段）及び遺伝子増幅産物のbp数（下段）																
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
記載例	5	2	6	3	-2	UN	7	-2	4	-2	4	10	3	-2	2	-2	7
	721																
検体1																	
検体2																	
検体3															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

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。

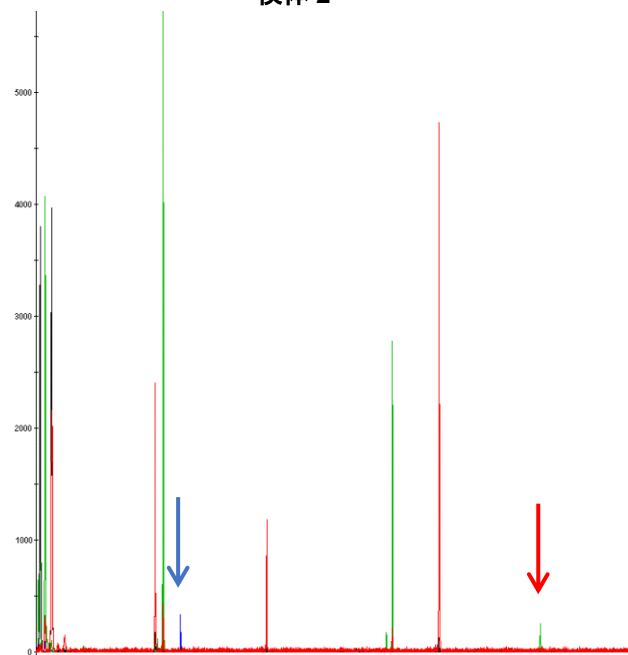
図1 腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法精度管理試験での回答用紙

(A)施設 A



(B)施設 B

検体 2



検体 4

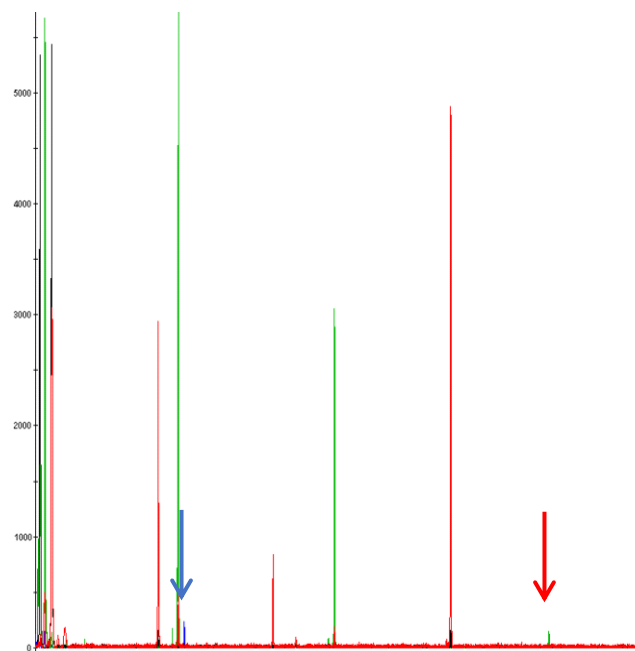


図 2 MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(A) 赤色破線の円は蛍光プラマーが検出されなかったことを示す。(B) 赤色及び青色の矢印はそれぞれ領域O157-9及び領域O157-34の遺伝子増幅産物のピークを示す。
(C)施設 D

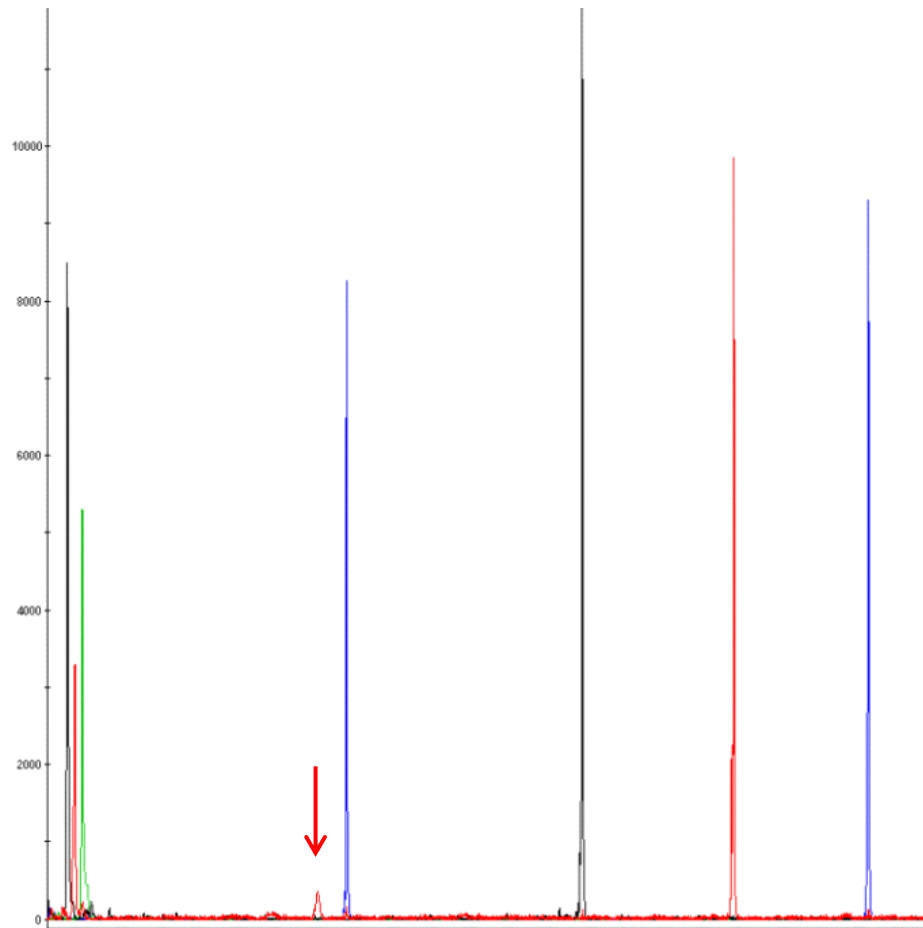


図 2(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(C) 赤色矢印は領域 O157-37 のタンデムリピート(TR)として判定された非特異的ピークを示す。

(D)施設 E

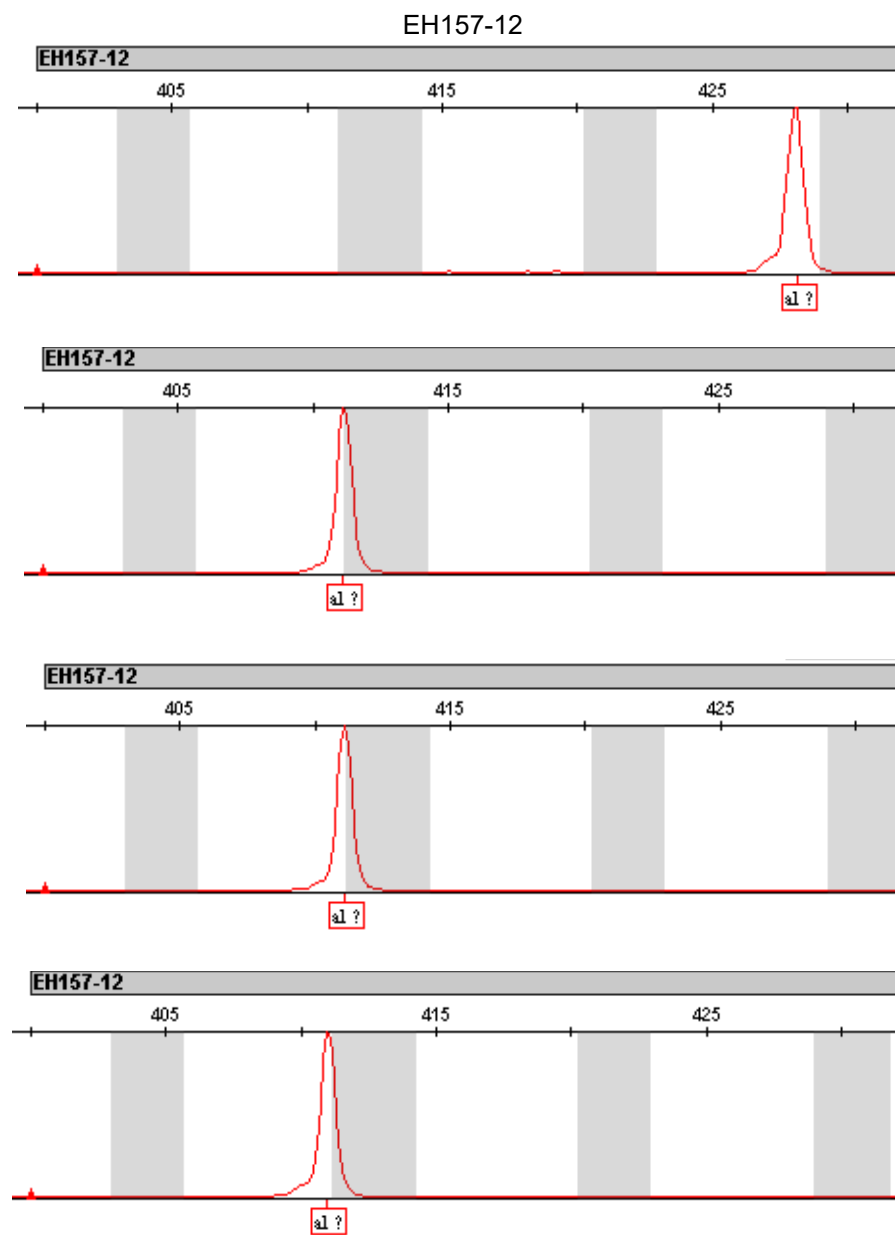
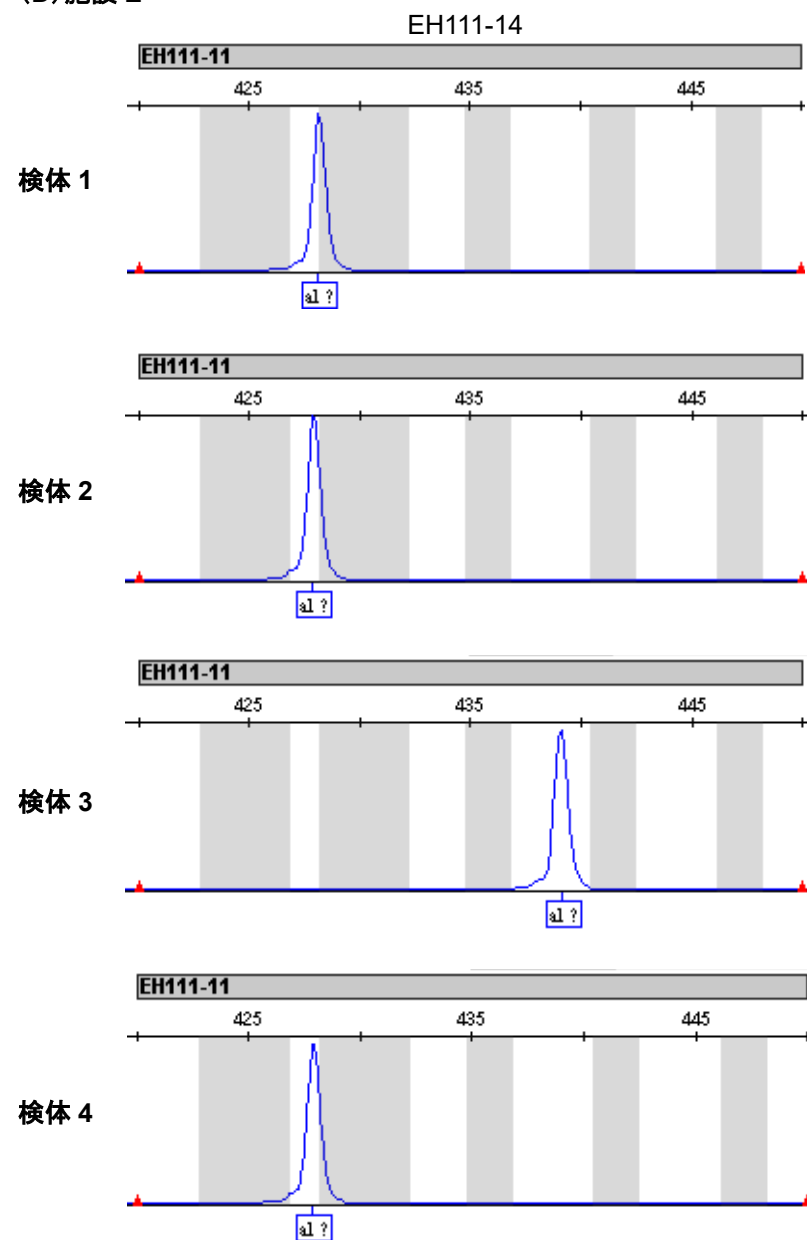


図 2(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(E)施設 F

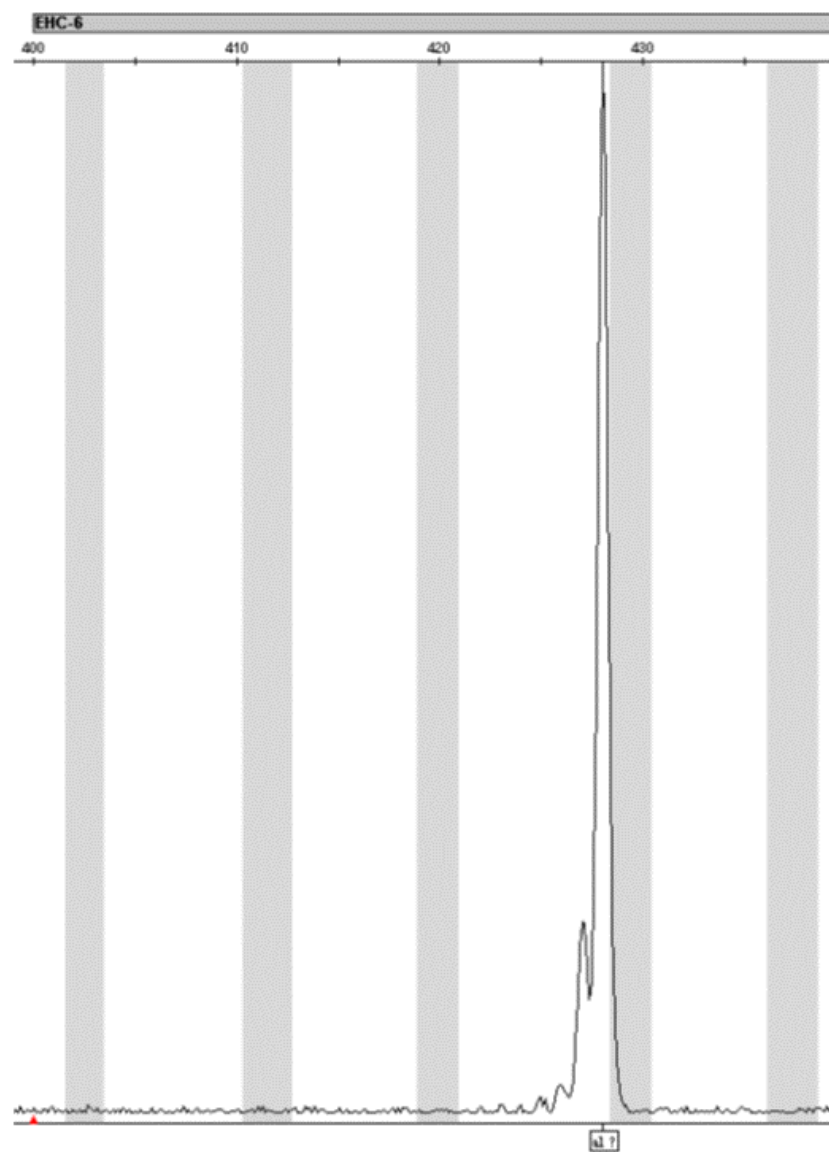


図 2(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

検体 4 の領域 EHC-6 における遺伝子増幅産物のピーク。

表1 本研究で用いたEHEC菌株のMLVA法におけるTRパターン

菌株 検体 ^{a/} ^b	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																
		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	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
2	O26	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
3	O111	4	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
4	O26	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN ^c

^a 蔓延菌株に対するMLVA法の有効性の検証実験での菌株。

^b MLVA法の精度管理試験での検体。

^c 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。

表2 MLVA法の精度管理試験の参加施設

支部 ^a	今年度 に 参加 ^b	昨年度 に 参加 ^c	施設数 ^d	参加率 (%) ^e
北海道・東北・新潟地区	7	1	11	72.7
関東・甲・信・静地区	5	4	17	52.9
東海・北陸地区	5	2	7	100.0
近畿地区	5	1	9	66.7
中国・四国地区	7	1	11	72.7
九州地区	8	1	11	81.8
全国	37	10	66	71.2

^a 地方衛生研究所全国協議会の支部。

^b 本年度に本研究で実施したMLVA法の精度管理試験に参加した施設数。

^c 昨年度に本研究で実施したMLVA法の精度管理プレ試験に参加した施設数。

^d 地方衛生研究所全国協議会に加盟している地方衛生研究所等の施設の内、都道府県及び政令指定都市に属する施設数。

^e 本年度及び昨年度に実施したMLVA法の精度管理試験及びプレ試験のどちらかに参加した施設の割合。

表3 長期的・連続的な継代培養によるEHEC菌株のTRの変化

(A) 普通寒天平板

継代培養 日数	各継代数において TR 数が変化したコロニー数			
	菌株 1	菌株 2	菌株 3	菌株 4
30 日	0	- ^a	-	-
60 日	0	-	-	-
90 日	0	-	-	-
120 日	0	-	-	-
150 日	1 ^b	0	0	0

^a 未測定。

^b 領域O157-9と領域O157-34のTR数が1増加し、TR数はそれぞれ20及び13。

(B) LB Broth

継代培養 日数	各継代数において TR 数が変化したコロニー数			
	菌株 1	菌株 2	菌株 3	菌株 4
30 日	- ^a	0	2 ^b	-
60 日	-	2 ^c	0	-
90 日	-	1 ^d	0	-
120 日	-	14 ^d	5 ^e	-
150 日	0	4 ^d	12 ^e	0

^a 未測定。

^b 領域 EHC-1 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 13。

^c 領域 EH111-8 の TR 数が不検出。

^d 領域 EHC-2 の TR 数が 1 減少し、TR 数は 24。

^e 領域 EHC-6 の TR 数が不検出。

表4 MLVA法の精度管理試験の回答における正解、不正解及び保留の内訳

支部 ^a	受験 施設数	正解 施設数	不正解 施設数	保留 施設数	不正解施設名(不正解検体 No.)
北海道・東北・新潟地区	7	5	0	2 ^c	-
関東・甲・信・静地区	5 ^b	2	3	0	施設 A(2-4)、施設 B(2、4)、施設 C(4)
東海・北陸地区	5	4	1	0	施設 D(2)
近畿地区	5	5	0	0	-
中国・四国地区	7 ^b	6	1	0	施設 E(1-4)
九州地区	8	6	1	1 ^d	施設 F(4)
全国	37	28	6	3	-

^a 地方衛生研究所全国協議会の支部。

^b 関東・甲・信・静地区と中国・四国地区の各 1 施設がテイルドプライマーを使用していたため、検体 4 の領域 O157-37 の遺伝子増幅産物のサイズが約 127 bp だった。

^c 2 施設が検体 4 の領域 O157-37 の TR 数をそれぞれ 7 及び 6 と回答し、「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。」等の記載が無かった。

^d 1 施設が問題の意図を理解できず、ノイズと分かっているピークを UN と判定した。

表5 MLVA法の精度管理試験で不正解だった回答の詳細

(A)施設 A

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) ^a																
	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
1	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
2	2	<u>2</u>	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
3	4	<u>2</u>	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
4	2	<u>2</u>	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	3	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	-2 ^b	5	-2 ^b	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	<u>-2</u> ^b	-2	1	-2	UN
120																	

^a 不正解の回答を下線で表示した。

^b 同一のプライマーミックスで検出された領域。

(B)施設 B

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) ^a																
	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
2	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	<u>-2</u>	2	-2	1	-2	-2
4	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	<u>-2</u>	2	-2	1	-2	UN
120																	

^a 不正解の回答を下線で表示した。

(C)施設 D

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) ^a																
	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
2	2	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	<u>10</u>

^a 不正解の回答を下線で表示した。

(D)施設 E

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) ^a																
	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
1	<u>UN</u>	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	12	19	6	8	6	3	7
	<u>427.72</u>																
2	<u>UN</u>	1	1	2	3	10	25	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
	<u>427.60</u>																
3	<u>UN</u>	1	5	2	-2	14	6	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	6
	<u>438.75</u>																
4	<u>UN</u>	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	UN
	<u>427.47</u>																
																	120.12

^a 不正解の回答を下線で表示した。

(E)施設 F

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) ^a																
	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EH1 -1	EH1 -2	EH1 -5	EH1 -6	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
4	2	1	1	2	3	12	14	-2	<u>UN</u>	-2	1	-2	2	-2	1	-2	UN
428																	121

^a 不正解の回答を下線で表示した。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

1. Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Naoshi Ando, Junji Seto, Kyoko Hazama, Keigo Enomoto, Hidemasa Izumiya, Yukihiro Akeda, Makoto Ohnishi, Another advantage of multi-locus variable-number tandem repeat analysis that can putatively subdivide enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains into clades by *maximum a posteriori* estimation, PLOS ONE, 18(3): e0283684, 2023
2. Yano B., Taniguchi I., Gotoh Y., Hayashi T., & Nakamura K.: Dynamic changes in Shiga toxin (Stx) 1 transducing phage throughout the evolution of O26:H11 Stx-producing *Escherichia coli*, Scientific Reports, 13(1):4935, 2023.
3. Nakamura K., Seto K., Lee K., Ooka T., Gotoh Y., Taniguchi I., Ogura Y., Jacques Georges Mainil, Denis Piérard, Harata T., Etoh Y., Ueda A., Hamasaki M., Isobe H., Kimata K., Narimatsu H., Yatsuyanagi J., Ohnishi M., Iyoda S., Hayashi T.: Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25, Microbial Genomics, 9:000959, 2023.
4. Miyata T., Taniguchi I., Nakamura K., Gotoh Y., Yoshimura D., Itoh T., Hirai S., Yokoyama E., Ohnishi M., Iyoda S., Ogura Y., Hayashi T.: Alteration of a Shiga toxin-encoding phage associated with a change in toxin production level and disease severity in *Escherichia coli*. Microbial Genomics, 9:0009935, 2023.
5. Ikeda R., Nakamura K., Saulmont M., Habets A., Duprez JN, Korsak N., Hayashi T., Thiry D., Mainil JG.: *Escherichia coli* O80 in Healthy Cattle: Absence of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *E. coli* O80:H2 and (Phylo) Genomics of Non-Clonal Complex 165 *E. coli* O80, Microorganisms, 11(2):230, 2023.
6. Nakamura K., Seto, K., Isobe J., Taniguchi I., Gotoh Y., Hayashi T.: Insertion Sequence (IS)-Excision Enhancer (IEE)-Mediated IS Excision from the lacZ Gene Restores the Lactose Utilization Defect of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

0121:H19 Strains and Is Responsible for Their Delayed Lactose Utilization Phenotype, *Applied Environmental Microbiology*, 88(16):e0076022, 2022.

令和5年4月3日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和4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) 細菌第一部・部長
- (氏名・フリガナ) 明田 幸宏・アケダ ユキヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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4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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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5年4月3日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和4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) 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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 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4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 食中調査の迅速化・高速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) 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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

厚生労働大臣 殿

令和5年 4月26日

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4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) 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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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4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・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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。