

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

広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及び
ゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究
(23KA1005)

令和5年度 総括研究報告書

研究代表者 明田 幸宏

令和6(2024)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究	1
研究代表者	明田幸宏
II. 分担研究報告	
1. 2023年度EHEC検出状況とEHECのWGS解析パイプライン構築	14
	明田幸宏
2. 広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究（分担研究）	23
	中村佳司
3. 食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析	26
	砂川富正
4. 食品関連サンプル由来株の収集、解析	29
	廣瀬昌平
5. 反復配列多型解析法の精度管理、及び性能の評価	39
	平井晋一郎
6. 離島コホート研究	68
	大西真
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	74

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 5 年度総括研究報告書

「広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及び
ゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究」

研究代表者	明田幸宏	国立感染症研究所細菌第一部 部長
研究分担者	中村佳司（九州大学大学院医学研究院） 砂川富正（国立感染症研究所実地疫学研究センター） 廣瀬昌平（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部） 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） 大西 真（沖縄県衛生環境研究所 感染症研究センター）	
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） 島袋 梢（国立感染症研究所 細菌第一部） 加納 一彦（国立感染症研究所 品質保証管理部） 土橋 西紀（国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 高橋 琢理（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 有馬 雄三（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 高原 理 （国立感染症研究所 感染症疫学センター） 久手堅 剛（沖縄県衛生環境研究所） 平良 遥乃（沖縄県衛生環境研究所） 柿田 徹也（沖縄県衛生環境研究所）	

研究要旨：

食中毒は国民に対して甚大で直接的な影響を及ぼす。そのため食中毒の発生予防や発生した際には迅速な原因究明を実施し、その健康被害の拡大抑止が必要不可欠である。特に腸管出血性大腸菌（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。これまで EHEC 感染症の事例調査のため各種の分子型別法が開発・利用されてきた。MLVA 法が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている。本研究では地衛研における MLVA 法運用のさら

なる効率化迅速化を目指した技術導入および精度向上、MLVA 型別データと発生動向を利用した EHEC 食中毒アラート発出システムの構築、その評価を進めてた。また食品や動物由来株を含めたゲノムデータベースの拡充化を進め、さらにゲノムデータを利用した原因究明に利用可能なゲノム解析パイプラインを構築した。今後、その試用を通じて評価および改良を進める。さらに EHEC 感染症の起因菌と食材等感染源の関連性解析および本研究で構築された食中毒アラートシステム及び検査解析スキーム評価のため、他の地域からの食品流通などの影響を受けにくい離島（沖縄県）でのコホートを確立し、それらの解析・評価を進めた。

A. 研究目的

食中毒は国民に対して甚大で直接的な影響を及ぼす。そのため食中毒の発生予防や発生した際には迅速な原因究明を実施し、その健康被害の拡大抑止が必要不可欠である。特に腸管出血性大腸菌（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。これまで EHEC 感染症の事例調査のため各種の分子型別法が開発・利用されてきた。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。前身の研究班では、本法の活用に重点を置き、地衛研における実施の精度向上のため、その精度管理を進めてきた。また MLVA 法を利用して全国で分離された EHEC 菌株の分子疫学的解析を実施することで個々の事例の関連性について検討を重ね、さらにその情報を利用した注意すべき事例の探知及びアラート発出を試みてきた。また EHEC 血清型によって MLVA 法の解像度が異なることから、海外株や食品・動物由来株を含む様々な EHEC 菌株の全ゲノム配列の取得を行い、MLVA 型別との関連性を評価するとともに、大規模なゲノム情報のデータベース化を進めている。その

結果、EHEC 食中毒の早期探知のための技術基盤が構築されつつあり、それらを利用した実的な運用に着手する段階に来ている。以上より、本研究計画では地衛研における MLVA 法運用のさらなる効率化迅速化を目指した技術導入および精度向上、MLVA 型別データと発生動向を利用した EHEC 食中毒アラート発出システムの構築、その評価を実施する。また世界的には食中毒を含む感染症の分子疫学解析が全ゲノム情報を用いたものとなっており、食品や動物由来株を含めたゲノムデータベースの拡充化を進めることで MLVA 法との優劣性を明らかにし、将来的な運用に資する基盤を構築する。またゲノムデータを利用した原因究明に利用可能なゲノム解析パイプラインを構築し（R5 年度）、その試用を通じて評価および改良を進める。さらに EHEC 感染症の起因菌と食材等感染源の関連性解析および本研究で構築された食中毒アラートシステム及び検査解析スキーム評価のため、他の地域からの食品流通などの影響を受けにくい離島でのコホートを確立し、それらの解析・評価を進める。

B. 研究方法

（ゲノム解析パイプライン構築、評価）

本研究班では、これまでに SNP 解析等の基本的なゲノム解析を半自動的に行う解析パイプラインを構築し、集団感染の検知を行ってきた。一部の自治体へは同プログラムが配布され、実際の集団感染解析に用いられている。しかし、解析環境導入の難易度が高いことが課題であった。そこで本研究では、解析環境を容易に配布・実行可能なプラットフォーム(docker) を利用したゲノム解析環境の実用化を試みる。まず 1、感染研・細菌第一部で行っている解析プログラムの修正および docker 化を行う。また、妥当性評価用のベンチマークデータの整備を行う。次に、開発した環境を 2-4 程度の地方衛生研究所に試験的に導入し、課題の抽出や解析環境の改善を行う。さらに、配布対象自治体をさらに広げるとともに、データベース(Docker Hub)に登録し、国内外の研究者および公衆衛生関係者が利用可能な状態にすることを旨とする。本年度は解析フローの設定とそれに使用する各種解析コンポーネントの docker 化を行う。また分担研究者による参照配列設定、SNPs 閾値の設定、検証を実施する。

(ゲノム情報収集、データベース拡充化)
臨床由来 EHEC 株のみならず食品や動物、環境等由来株(他の分担研究分からの菌株、データについても可能な限り含む) について収集を進め、それらの全ゲノムシーケンス情報を取得することで、EHEC 菌株ゲノムデータベースの拡充を継続的に進める。また得られた菌株ゲノム情報については、全ゲノムシーケンスデータと MLVA 型別との比較評価に用いるため、菌株毎で実際に実施された MLVA 型別データあるいは in

silico による MLVA 型別データの紐付けを行う。

本年度は特に研究代表者のグループが収集した、2021 年・2022 年に国内で発生した EHEC 集団感染事例(5 検体以上の事例; 分離源のヒトが全て無症状であった事例も含む) の分離株(計 426 株)のうち、226 菌株の WGS 情報を取得した。また、離島コホート研究の過程で収集された、2 つの離島で飼育されている牛から分離された病原大腸菌(EHEC および腸管病原性大腸菌(EPEC))および大腸菌群スクリーニング用の培地(XM-G 培地)あるいは主要 EHEC の推定鑑別培地(CHROMagar STEC)から釣菌した細菌の WGS 情報を取得した。

(MLVA 法の精度管理)

前身の研究班で実施された MLVA 法の精度管理において、明らかとなった精度管理プロトコールの問題点を整理し、MLVA 法におけるトラブルシューティング事例集、内部精度管理手法を作成する。これらを用いて地方自治体を対象とした研修会等を通じて普及させ改善し、改良型 MLVA 精度管理手法の確立を進める。また MLVA 法と全ゲノムシーケンスデータを用いた疫学解析手法の比較検討を他の分担課題で拡充化されるデータベースを利用して実施し、それぞれの手法の適応範囲や迅速性等の詳細な性能について明らかにする。

本年度は特に MLVA 法の精度管理試験の参加施設の選定を拡充して行い、菌株検体を送付、その試験の結果について評価を加えた。また、不正解例に対する原因究明を行い、トラブルシューティング集の作成をおこなった。

(食品関連サンプル由来 EHEC 株の収集、解析)

食品をターゲットとした EHEC 菌株の分離は、その分離率が低いため、対象を食品食材そのものに限らず、それらが生産される場の周辺環境等にも広げ EHEC 菌株の分離を進める。また食品食材以外のサンプルからの EHEC 分離の効率化を図るため、そのプロトコールについても検討し最適化を図る。得られた菌株については、MLVA 型別及び全ゲノムシーケンスを実施し、臨床分離株との関連性を評価する。

本年度は国内食肉処理施設より提供されたウシ糞便から EHEC 菌株を分離し、その性状、遺伝子型別を実施した。

(離島コホート研究)

EHEC 感染症、食中毒事例の原因となる EHEC 菌株の原因食材等の究明は、EHEC 感染症発症に必要な菌数が非常に少ないことから探索が困難であり、EHEC 菌株の分離を伴う感染源の同定や、発症と原因食材等感染源との関係性など、明確な理解に至っていない。そこで本分担研究では、沖縄県内の離島をフィールドとして離島コホート研究を実施する。検体や分離株は、ヒト、動物、環境サンプル等を対象としていわゆる EHEC におけるワンヘルスサーベイランスを実施する。得られた菌株については MLVA 型別、全ゲノムシーケンスを実施することで分離元情報とともにその分子疫学的関連性について評価する。また離島コホートにおける検出数などにもよるが、本研究班の他の分担研究課題で提案されるゲノム解析パイプライン、プロトコール等についてもパイ

ロット的に利用することでその運用性についても評価を進める。

本年度は沖縄県で 2006 年から 2022 年に報告された EHEC 感染症の疫学情報を利用した市町村毎の事例数推定やウシ飼養数との関連性、ウシ糞便検体からの菌株分離を実施した。

(食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析)

これまで感染症発生動向調査 (NESID) や食中毒報告を元に全国規模の EHEC 感染症・食中毒の広域集発事例の探知に利用可能な手技手法の評価をおこなってきた。その結果、迅速探知システム (アラートシステム) の有用性は確認できたものの局地的な集団発生事例等ではアラート探知感度が低い等、改善すべき点について明らかとなった。そこで本分担研究では、アラート基準となる EHEC 感染症発生ベースラインの改訂、MLVA 型別や全ゲノムシーケンスデータ等の分子疫学的情報とのリンク、アラート発出のさらなる迅速化を進め、最終的に改良型食中毒迅速探知システムを実際に運用し、その評価をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析パイプライン構築、評価

ゲノム解析各解析コンポーネントの ducker 化前の解析パイプラインについて機能の評価や改善を行った。その結果、事前に設定した値 (カバレッジやコンタミネーションの割合等) に対して自動的に QC を行い結果を表示する機能を追加した。また、SNP 解析に関しては、結果の評価に必要なコアゲノムサイズ等を自動的に計算してレポートを

出力する機能を追加した。構築したパイプラインについて、docker コンテナ化を行った。Windows および Linux 環境下でインストールおよび動作確認を行った。通常インストールにはエラー対応を含め数時間を要するが、docker を利用した場合には一時間程度でインストール可能であった。プログラムの実行には、JupyterLab を利用した。JupyterLab は、ウェブブラウザ上で動作するため、OS に関わらず利用可能である。また、ノートブックと呼ばれるファイル内ではコードの編集、実行および結果の表示が可能である。JupyterLab のノートブック上でマニュアルと解析コードを一体化したファイルを作製することで、情報解析初心者でも容易に実行可能な環境が構築された。また並行して、SNPcaster パイプラインの活用法についての以下の通り、検討が行われた。

i) 解析対象の配列に対する参照配列の設定：SNPcaster で行われる SNP 解析には、BactSNP プログラムが採用されている。このプログラムでは、解析したい菌株の WGS をそれぞれ参照配列にアラインメントし、参照配列を含む全ての解析対象株に共通するゲノム領域（コアゲノム配列）に存在する SNPs を抽出する。EHEC 血清型間にはゲノム多様性があることから、解析対象と遺伝的に近縁でない（例えば、異なる血清型の）菌株のゲノム配列を参照配列として設定すると、コアゲノム配列が縮小され、菌株間の SNPs 数が過小評価される可能性がある。本研究で収集した海外 5 事例の EHEC 血清型は 0157（2 事例）あるいは 026（3 事例）であった。0157 の菌株の解析に 026 菌株のゲノムを、026 の菌株の解析に 0157 菌株のゲノムをそれぞれ参照配列とした場合、血清型が一致している場

合と比較して、コアゲノム配列が 0.3~0.4 Mb 縮小され、抽出 SNPs も最大で 3 SNPs 少なくなった。本研究では解析の解像度を最大にするため、解析対象の菌株の血清型と同一の血清型のゲノム（0157 の場合は Sakai 株、026 の場合は 11368 株）を参照配列として、SNP 解析を行なった。

ii) 同一クローンの判定基準となる SNPs 数の閾値の検証：NCBI に登録されている菌株セットの管理 ID (BioProject ID) のうち、イタリアおよびフランスの事例（計 3 事例、全て 026 EHEC）の管理 ID 内には、それぞれ単一事例に由来する EHEC 菌株の WGS データが登録されており、菌株間の最大 SNPs 数はいずれの事例においても 5 SNPs 以下であった。アメリカの 0157 による 2 事例のうち、1 事例 (BioProject ID: PRJNA517910) には、2018 年の大規模集団事例時にウィスコンシン州で分離された菌株の WGS データが登録されており、菌株同士の疫学的関連性が不明であったため、本解析から除外した。残りの 1 事例 (BioProject ID: PRJNA215830) についても、複数の事例に由来する菌株の WGS データが登録されていたが、菌株の疫学情報が論文報告されていた (Turabelidze G, et al. J Clin Microbiol, 2020) ため、菌株同士の疫学的関連性と遺伝的距離（菌株間の SNPs 数）の対応を精査した。その結果、同一感染事例の原因と考えられる菌株同士の遺伝的距離は、1 つの菌株を除いて 5 SNPs 以内であり、例外の 1 株とその他の菌株の遺伝的距離は 11~12 SNPs であった。また、互いに疫学的関連性のない菌株同士の遺伝的距離は 13 SNPs よりも大きくなることが分かった。これらの結果は、海外の EHEC 集団感染事例において、5 SNPs が同一クローン判定のひ

とつの基準となることを示唆している。

2. ゲノム情報収集、データベース拡充化
研究班内で取得された菌株などを利用してゲノム情報を取得した。計 226 の臨床由来 EHEC 菌株に関して、平均 740 Mb (387~1,368 Mb) のショートリード配列を取得した。代表的な EHEC 菌株である 0157 Sakai 株ゲノムの全長 (5.6 Mb) に対し、平均 132x カバレッジ (69x~244x) のデータ量であったことから、WGS 解析に十分なデータ量がいずれの菌株においても取得されていると考えられた。離島コホート研究から分離された計 155 の牛由来の菌株に関して、平均 806 Mb (560~1,225 Mb) のショートリード配列を取得した。ショートリード配列をアセンブルして得たドラフトゲノム配列のうち、8 つについては複数の菌株のゲノム配列が含まれていると判断した。残りの 147 株のうち、XM-G 培地で分離された菌株は 122 株含まれており、そのうち 119 株が大腸菌であることが WGS を用いた解析から推定された。CHROMagar で分離された 9 菌株は全て大腸菌であり、そのうち 2 株は eae 遺伝子陽性であった。離島コホート研究を担当する研究者が事前に行なった PCR 解析 (stx, eae, および EHEC 主要 O 血清群) により、EHEC あるいは EPEC であると推定された 16 菌株のうち、15 株は stx と eae 遺伝子のどちらか、あるいは両方が陽性であった。残りの 1 株の血清型は 0121:H11 であり、O 血清型は EHEC 主要血清型のひとつである 0121:H19 と共通するが、H 血清型は異なっていた。

また MLVA 型別とそのデータ蓄積において 3308 株について分子型別解析を実施した。このうち 2923 株について MLVA 法による解

析を実施した。解析依頼施設数は延べ 94 施設であった。各血清群において同定された型数は、0157 が 862、026 が 148、0111 が 72、0103 が 62、0121 が 16、0145 が 12、0165 が 3、091 が 38 であった。得られたデータは 2024 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、48 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約 1500 株であった。2023 年度は 55 施設から約 1500 株分のデータについて照会があり、感染研で精度確認を行った (上記型名付与を行った株のデータを含む)。全遺伝子座における正解率 (平均値) は約 98% であった。株毎の正解率 (平均値) は約 89% であった。

3. MLVA 法の精度管理

全国の地衛研を対象に MLVA 法の精度管理試験の参加依頼をしたところ、国立感染症研究所から 1 日に発送できる菌株検体数を超える申し込みがあった。そこで、過去試験に未参加の施設や本法の導入歴が少ない施設を中心に 21 施設を参加施設として選んだ。試験の結果、全体的に高い検査精度にあったが、2 施設が回答を誤った。2 施設に検査工程を照会したところ、解析ファイルの Bin 設定が適切でなかったこと、及びタンデムリピート (TR) 領域の増幅ピークに釣られて立ち上がったノイズを TR と判定したこと等、基本的な工程を正しくできていなかった。次に、過去の精度管理試験で得られた電気泳動データを収集し、機器や試薬の情報を基に分析したところ、非典型的ピークの発生を抑えるには、特異性が高い Master mix の使用が有効と分かった。最後に、これまでの精度管理試

験で把握した情報を基にトラブルシューティング集を作成した。

4. 食品関連サンプル由来 EHEC 株の収集、解析

牛糞便由来株36株は、すべて *stx* および *eae* 陽性であり、血清型は O157:H7 が 33 株、O26:H11 が 2 株 O111:HUT が 1 株であった。MLVA 型は、EHEC O157 が 18 種類 (13m0154、13m0177、13m0662、13m0694、15m0180、16m0206、16m0516、17m0097、17m0134、17m0320、17m0512、18m0297、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629、20m0450 および 21m0465)、EHEC O26 が 2 種類 (17m2226 および 21m2145)、EHEC O111 が 1 種類 (16m3038) に分類された。EHEC O157 の MLVA 型 18 種類のうち、7 種類 (16m0516、17m0512、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629 および 21m0465) は本課題で新規に報告された型であり、残りの 11 種類は過去に報告された型と同一であった。EHEC O26 の MLVA 型 2 種類 および EHEC O111 の MLVA 型 1 種類は、本課題で新規に報告された型であった。13m0177、15m0180 および 18m0616 は、異なる月にまたがって 2 回以上分離された。また、EHEC O157 および EHEC O26 全株は運動性を示したが、EHEC O111 は運動性を示さなかった。また分離された菌株の保有する *Stx* サブタイプのパターンは、EHEC O157 では *stx2a* 単独、*stx2c* 単独、*stx1a* および *stx2c* ならびに *stx1a* および *stx2a* の 4 種類、EHEC O26 では *stx1a* 単独の 1 種類、EHEC O111 で *stx1a* および *stx2a* の 1 種類であった。

5. 離島コホート研究

(EHEC 感染症の発生頻度の市町村比較)

2006 年から 2022 年の期間において、439 例

の報告があった。散发例を含む事例数としては 270 事例であり、沖縄県の人口 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は 1.76 であった。沖縄県 41 市町村ごとの 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は、0–9.1 の範囲でばらつきが多かった。人口 4000 人未満の 12 町村では解析期間において報告はみられなかった。人口 4000 人以上の 29 市町村の 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は、中央値 0.58 (平均 1.29) であり、10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数が 1 未満の市町村が 29 のうち 22 存在した。平均値以上の値を示す市町村は 5 市町村と限定的であった。これら 5 市町村はいずれも、沖縄島とは異なる離島に存在する市町村であった。

(ウシ飼養数・飼養戸数の市町村比較)

人口 2000 人以上の各市町村の人口 1000 人あたりウシ飼養数およびウシ飼養戸数と EHEC 感染症事例数 (人・年あたり) の関連を図 2 に示した。EHEC 感染症事例数が平均値以上の値を示す 5 市町村は、A 市を除いて EHEC 事例数の多い順に、人口あたりウシ飼養頭数が多かった。一方で、A 市も含めた 5 市町村は、ウシ飼養農家の人口あたりの戸数は多かった。

(A 市および B 市で飼養されるウシの EHEC 保有率)

ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いた増菌培養液から DNA を抽出し、ベロ毒素検出リアルタイム PCR を実施した結果、100 検体中 32 検体で VT 遺伝子が検出された。VT 遺伝子陽性検体から VT 保有菌株の分離を試みた。その結果、13 株の EHEC が分離された。A 市は 50 検体中 6 検体 (12%) が VT 遺伝子陽性、うち 2 検体から

2 株 (4%) の EHEC 株が分離された。B 市は 50 検体中 26 検体 (52%) が VT 遺伝子陽性、うち 11 検体から 11 株 (22%) の EHEC 株が分離された。

O-genotyping についての結果としては、Og157 および Og111 が 3 株分離されたが、10 株は MP1 Plus を用いた PCR ではいずれの O 群陽性シグナルを得ることができず、Og- という判定となった。つまりヒトから分離される EHEC の頻度の高い 7 つの血清群ではないことが示された。

VT1 陽性株が 5 株 (46.2%)、VT2 陽性株が 9 株 (69.2%)、うち両毒素遺伝子陽性株は 1 株であった。eae 遺伝子陽性株は 6 株 (46.2%) 存在した。

ウシ糞便検体は国立感染症研究所 (伊豫田ら) ならびに宮崎大学 (井口ら) に供与し、それぞれ EHEC 分離を試みることで沖縄県衛生環境研究所における分離方法の妥当性を確認した。その結果、沖縄県衛生環境研究所で分離された EHEC13 株のうち、7 株は国立感染症研究所あるいは宮崎大学において分離された。6 株については、沖縄県衛生環境研究所のみで分離された。一方で、国立感染症研究所あるいは宮崎大学で分離された 4 株は沖縄県衛生環境研究所では分離できていなかった。

6. 食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析

2019 年から 2023 年までの情報について列挙する。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)、2023 年 (3 回/3 回) であった。2023 年の厚生労働

省への情報提供回数は 3 回で、2022 年と並び 2019 年に次ぐ多さであった。2023 年の EHEC 症例報告数は 2011~2019 年の報告数と同等の水準まで増加していたが、アラート検知回数は 2019 年より少なかった。

2023 年のアラート情報の 1 回については、リアルタイムな監視の状況 (2023 年 33-34 週) として、O157VT2 が東日本で多い等の疫学的な偏りを認めた。2023 年 8 月 22 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 2023 年 33 週から 34 週にかけて、NESID 上では例年を上回る O157VT2 症例数の増加を認め、特に診断・週 34 週にかけては、明らかに O157VT2 に起因するイベント数の増加がみられた (過去平均+2SD 以上となり、またイベント数 20 以上で推移したことからレベル 4 相当)。

- ・O157VT2 症例群は、女性に多いが、年齢層は幅広い。

- ・HUS 症例が発生しており、重症例発生への注意が必要。

- ・O157VT2 症例群は、地理的分布としては東北地方、関東地方などの東日本が多い。

O157VT2 症例群は、喫食歴や地理分布等の情報も併せ、多くの症例が単独の汚染原因によるものであると考えられた。

- ・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、新型コロナウイルスによるパンデミックの状況が落ち着き、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。

さらに、2017年に編成した「広域食中毒発生時の疫学調査に関するガイドライン」の更新作業の準備に取り組んだ。

D. 考察

MLVA法により解析した菌株数は昨年より約28%と大幅に増加した。解析結果は定期的あるいは不定期に厚生労働省 NESFD に MLVA リストとして掲載された。地方衛生研究所から型名付与のために送付された MLVA データは約1500株に上った。感染研で行った精度確認では菌株ベースで89%、遺伝子座ベースで98%一致しており、多くの地衛研において技術的な問題が解消されつつあると考えられた。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。

食中毒事例等の集団感染等の調査で WGS 解析を用いる情報解析手法は、正確かつ他機関でも利用・検証可能であることが望ましい。SNP 解析に用いるプログラムは数多く利用可能であるが、標準的な解析手法は現在までに確立されていない。その理由としては、SNP 解析には、参照配列におけるリピート配列の検出、コアゲノムサイズの同定や、組換え領域の検出・除去等の複数の解析過程が存在することが挙げられる。これらについて、一度に行えるプログラムは利用可能でなかった。また、プログラム間の依存関係のために、インストールが困難な場合も存在した。本研究では、生データ (WGS リードデータ) の QC から SNP 解析、系統解析までを行えるプログラムを、単一の docker コンテナに含めること

で、インストール時の課題を解決することができた。今後、地方衛生研究所等に試験的に配布し、評価を行うことで、プログラムおよびマニュアルの改善を行う予定である。

国内分離株の WGS データの収集では、計226の臨床由来 EHEC 菌株について、WGS データを収集することができたため、上述の SNPcaster パイプラインの検証にこのデータを活用するとともに、EHEC データベースのアップデートを行う。離島コホート研究によって牛から分離された EHEC 菌株、特に EHEC 主要血清型ではないが、stx 遺伝子陽性の菌株に関しては、参照配列あるいは landmark となりうると考えられるため、完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備するとともに、分担者が独自に開発した定量系を用いて、Stx の産生量を測定する予定である。牛から分離された non-EHEC 菌株は、EHEC データベースの拡充には直接関連しないが、牛の腸管内で EHEC と共存している可能性があるという点で重要であるため、典型的な EHEC 菌株との系統関係を解析するとともに、離島コホート研究を分担する研究者とともに今後の研究方針を議論していく予定である。

EHEC の菌株検体を用いた MLVA 法の精度管理試験を行ったところ、参加施設は全体として高い検査精度を持っていた。我々が精度管理試験を実施する目的は、検査精度の把握に加えて、不正解があった施設に検査工程の問題点を特定し、改善法を提言することである。前身の研究班で実施した精度管理試験で不正解の検体があった6施設が本試験にも参加したが、これら施設は全検体に正解した。これは我々が実施してきた精度管理試験により、地衛研の検査能力

を向上させられたことを示唆している。一方で、今回の精度管理試験では2施設が1検体以上で不正解だったが、1施設はMLVA法の施設導入年数が2年、参加者の経験年数が1年であり、もう1施設は導入年数も経験年数も0年だった。これは、今後も、MLVA法の地衛研への普及と検査精度向上の必要性を示している。

本研究では、精度管理試験で不正解の検体があった施設に対して改善法を提案できた。施設Aが検体2及び検体3で不正解だった原因はBinファイルの調整不足だったので、細菌第一部が作成したBinの使用を勧めた。施設Aには、TR算出の際の注意点として、TRのサイズは理論上の数値と電気泳動での測定値が異なること、測定値はシーケンサーの機種等の影響を受けることを伝えた。さらに、TR数によってオフセット部分が変化する領域もあるため、各施設でBinファイルを設定する際は、TRが分かっているサンプルを流してBinを調整する必要性も伝えた。今回、施設Aが回答を誤った領域0157-19では、TR数が2-3のBinの間隔(約3 bp)は、他のTR数のBinの間隔(6 bp)より狭いという特徴を持つ。この理由は、TRs = 1または2を持つ菌株は、それ以外のTR数を持つ菌株とオフセット部分が異なるためである。

施設Bが検体3で不正解となった原因は、非典型的ピークをTRと判定したためだったことから、判定のコツを伝えた。具体的には、4種の蛍光標識の波長はPET-NED-VIC-FAMの順に近く、ある蛍光のピークが立った時、波長が近い他の蛍光は釣られて検出され易いことを念頭に置く必要があると説明した。釣られて検出されるピーク解決法として、

シングルPCRによる1領域の電気泳動を行うと当該ピークを防げると伝えた。さらに、血清型によってはほぼ全ての菌株がTRを持たない(つまり、-2)領域もあるので3, 8)、血清型もノイズであるかの判定の役に立つと教えた。検体3の菌株の血清型は0111であり、施設Bはこの検体の領域0157-17のTR数を6と回答したが、一般的に0111はこの領域にTRを持たない。

本研究では、MLVA法の電気泳動データと検査工程の情報を結び付け、非典型的ピークの発生原因を探ったところ、明確な発生原因を見付けられなかったが、幾つかの知見が得られた。最初に、非典型的ピークが発生した施設は全体の約半数だったことから、発生原因は検体固有ではなく、検査工程にあると思われた。また、分析した電気泳動データは、DNA検体を用いた精度管理試験由来であることから、発生要因はPCR以降の過程にもあることが分かった。次に、T社試薬BのMaster Mixを使った施設では、非典型的ピークの発生率が他試薬より低かった。試薬Bは試薬Aの改良版であり、特異性が高いPCRを行える特徴を持つため、非典型的ピークの発生率が低くなったと思われた。さらに、電気泳動にT社機種Dを用いた地衛研は8施設あったが、非典型的ピークは起きていなかった。機種Dは、試薬及びキャピラリーがカートリッジ式であり、利便性が高いと言う利点があるが、その反面、試薬やキャピラリーの種類を変えられない。ポリマーとしてT社機種DではPOP-1が採用されており、それ以外の機種ではPOP-7が使われていた。機種Dのキャピラリーは28 cmであり、それ以外の機種のキャピラリーより短かった。しかし、メーカーのT社が公開している情報では、ポリマーや

キャピラリーの種類と非典型的ピーク発生の因果関係は示されていない。また、機種 D にノイズの検出を抑える機能があるとは示されておらず、機種 D で非典型的ピークが観察されなかった原因は不明である。また、サンガーシーケンサーで電気泳動した際、ピークの高さで PCR 産物の定量はできないが、産物量が多い程、ピークが高くなる傾向にある。PCR 産物の希釈率が 50 倍未満と 100 倍以上との非典型的ピークの発生率には差が無かったことから、当該ピークの検出と希釈率には関係が無いことが示された。なお、本研究班では、EHEC 菌株を用いた精度管理試験を実施したが、原因不明の非典型的ピークの発生は見られなかったため、菌株分離から DNA 抽出まで工程における当該ピークの発生原因は分析できなかった。

MLVA 法の精度管理試験で把握した情報を基に作成したトラブルシューティング集は、地衛研の検査精度の向上に有効だろう。本トラブルシューティング集の共有は、精度管理試験に正解した施設は勿論のこと、試験に未参加の施設にも有益だろう。本試験で不正解となった 2 施設の参加者の経験年数は 1 年以下であり、これは異動による検査技術・知識の承継問題の表れと言える。本トラブルシューティング集は実際の事例を示して、原因や解決法を解説しており、初心者にも分かり易く構成されている。地衛研全体の MLVA 法の検査精度向上のためにも、また、経験年数が少ない担当者への技術・知識伝達のためにも、今後、トラブルシューティング集を用いた研修を行う予定である。

牛糞便由来 EHEC 36 株のうち 0157:H7 が 33 株であったことから、牛糞便に含まれる EHEC は、血清型 0157:H7 が多くを占めるこ

とが示唆された。また、同一 MLVA 型の株が異なる月にまたがって 2 回以上分離されたことから、異なる牛が同一 MLVA 型の EHEC 株に汚染されている可能性が示唆された。さらに、牛糞便由来 EHEC 株が保有する Stx サブタイプは、強力な下痢原性を有する stx1a および stx2a が多かったことから、牛糞便由来 EHEC 株の食中毒リスクは高いと考えられる。加えて、牛糞便由来 EHEC にこれまでの食品由来株や食中毒患者分離株等から報告がなかった 10 種類の新規 MLVA 型の株が含まれていたことから、広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株のみならず牛糞便由来株等の食品生産現場での汚染可能性が示唆される株の MLVA 型およびゲノムデータもデータベースに蓄積していくことが有用であると考えられた。

食中毒アラートシステムの改良においては、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发事例を広域事例として探知する仕組みを整えた。探知頻度とのバランスを考慮しつつ、より迅速な探知を目指した基準値設定を検討する。疑い事例の早期探知と情報共有により、事例発生時の調査及び介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上大きな貢献が期待出来る。迅速探知により調査開始を早めることで、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調整についても検討する。2023 年度はアラートの頻度は増加し、COVID-19 パンデミックの影響が低下してきた状況を示唆する。公衆衛生対応に有用なアラートの発出について検討していく、それらをガイドラインに含めていく。

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。

E. 結論

コロナ禍において報告数の減少がみられた EHEC 感染症を含む食中毒、食品由来感染症もコロナ収束とともに増加へ転じている。EHEC 菌株の解析精緻化、迅速化が原因究明の要となることから、本研究で開発、改良している解析パイプラインや現行型別法である MLVA 法の精度管理をすすめると共に、これまで以上に幅広い対象物より EHEC 菌株を分離し、その遺伝学的性状を明らかにすることは、迅速な食中毒アラートの発出に有用であることは自明であり、さらに研究開発を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. Lee K., Iguchi A., Terano C., Hataya H., Isobe J., Seto K., Ishijima N., Akeda Y., Ohnishi M., and Iyoda S. Combined usage of serodiagnosis and O antigen typing to isolate Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O76:H7 from a hemolytic uremic syndrome case and genomic insights from the isolate. 2024. Microbiology spectrum 12:e0235523.
2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2022 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 44 巻、72-73、2023 年 5 月
3. Kakita T, Lee K, Morita M, Okuno M, Kyan H, Okano S, Maeshiro N, Ishizu M,

Kudeken T, Taira H, Teruya M, Ogura Y, Akeda Y, Ohnishi M, Isolation and whole-genome sequencing analysis of *Escherichia fergusonii* harboring a heat-labile enterotoxin gene from retail chicken meat in Okinawa, Japan. Microbiol Immunol 2024, 68 115-121. Epub 2024 Jan 20.

2) 学会発表等

1. 李 謙一. 病原細菌における全ゲノム配列解析の基礎. 衛生微生物技術協議会第 43 回研究会. 岐阜, 2023.
2. 李 謙一. EHEC における WGS 解析. 令和 5 年度 北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者研修会. 岩手県、2024.
3. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析（2022 年）。第 44 回日本食品微生物学会学術総会、2023 年 9 月、大阪府堺市。
4. 泉谷秀昌：2023 年 EHEC の状況まとめ。令和 5 年度北海道東北新潟ブロック 腸管出血性大腸菌検査担当者研修会、2024 年 1 月、岩手県盛岡市。
5. 沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真 第 52 回沖縄県獣医学会（2023 年 7 月）
6. 沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮

城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真、令和5年度獣医学術九州地区学会（2023年9月）

7. 柿田徹也、李謙一、森田昌知、奥野未来、喜屋武向子、岡野祥、眞栄城徳之、石津桃子、久手堅剛、平良遥乃、照屋盛実、小椋義俊、大西真沖縄県産鶏肉における易熱性エンテロトキシン保有 *Escherichia fergusonii* 汚染実態及びゲノム解析、第44回日本食品微生物学会学術総会（2023年9月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
「広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した
調査法の確立に資する研究」
(23KA0501)
研究分担報告書

分担研究課題

「2023 年度 EHEC 検出状況と EHEC の WGS 解析パイプライン構築」

研究分担者 明田幸宏（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

柿田徹也（沖縄県衛生環境研究所）

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-number 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。MLVA 法により解析した 2023 年分離株は 2923 株であった。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 型の付与を実施した。今年度データを解析し型名を付与した株は約 1500 であった。

広域食中毒の調査に全ゲノム配列解析を用いるためには、標準的な解析法の整備が必要である。しかし、単一塩基多型（SNP）解析等の情報解析手法の共有化には、プログラムの依存関係等の問題があった。そこで、docker というプラットフォームを用いて、異なる OS 環境でも容易に使用するプログラム群をインストール可能な docker コンテナを構築した。同コンテナを用いることで、データのクオリティチェックから系統樹解析までを容易に実行可能なパイプラインを構築した。

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」

(2023 年 6 月 28 日再周知) により、反復配列多型解析 (multi-locus variable-number 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。

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は広域食中毒の原因となるため、現在国内では分子疫学手法を用いたサーベイランスが行われている。分子疫学手法としては、8 種の O 群 (O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165、O91) では multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) が、その他の O 群ではパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法が用いられている。近年、高速シーケンサー (NGS) の実用化により、集団感染等の調査に全ゲノム配列 (whole-genome sequence : WGS) を用いた解析が取り入れられつつある。実際の解析時には、NGS で WGS を解読した後に、生データのクオリティチェック (quality check, QC) を行い、その後 single nucleotide polymorphism (SNP) 解析等を行う必要がある。そのために用いるソフトウェアや解析サーバーは数多く存在するが、使用方法やデータの評価基準等が記された体系的なマニュアルは存在せず、精度管理上の課題がある。さらに、Linux OS で動作するソフトウェアの場合、端末によってインストールが困難な場合がある。このため本分担研究では、地方自治体等における集団感染調査の際に特に必要とされる、データの QC、アセンブルおよび SNP

解析を自動で行える解析パイプラインの構築と、同パイプラインの docker コンテナ化を目的とした。

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 2023 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 ゲノム解析パイプライン (データ QC、アセンブル、SNP 解析パイプラインの構築)

これまでに感染研・細菌第一部で使用実績のあるプログラムを中心に、解析パイプラインの構築を行った。アセンブリに関しては、Guide to bacterial genome assembly

(<https://github.com/rrwick/Tracycler/wiki/Guide-to-bacterial-genome-assembly>) を参考に、広く用いられている SPAdes と SKESA の両方を使用可能とした。QC に関しては、CDC PulseNet が公表している SOP

(https://www.aphl.org/programs/food_safety/Pages/PulseNet-International-SOPs.aspx) を参考に、カバレッジやコンタミネーシ

ョン等をチェックする機能を加えた。SNP 解析に関しては、高精度な解析プログラムである BactSNP と、迅速な再解析が可能な Snippy を組み合わせた新たなパイプライン (SNPcaster) を構築した。加えて、遺伝子組換えについて検出できる Gubbins も使用できるようにした。

上記の解析パイプラインについて、docker コンテナ化を行った。Docker は、アプリケーションを開発、配布、実行するためのプラットフォームである。コンテナと呼ばれる仮想化技術を利用して、アプリケーションとその依存関係をパッケージ (コンテナ) 化することで、異なる OS 環境でも同じプログラムを実行できるようになる。上記解析パイプラインについて、docker コンテナ化を行うと共に、インストールおよび操作マニュアルの作製を行った。

地衛研におけるゲノム解析

沖縄県において 2006 年から 2024 年までに収集された腸管出血性大腸菌株のうち、NESID 情報が取得可能な菌株を対象とした。ゲノム DNA は DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) にて抽出し、Qiaseq FX DNA library kit (Qiagen) にてライブラリを作成した。iSeq 及び Novaseq (外部委託) にてペアエンドシーケンシングを実施した。得られたリードについて、shovill にてアセンブルを実施した。

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、3308 株について分子型別解析を実施した。このう

ち 2923 株について MLVA 法による解析を実施した。解析依頼施設数は延べ 94 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 862、O26 が 148、O111 が 72、O103 が 62、O121 が 16、O145 が 12、O165 が 3、O91 が 38 であった。得られたデータは 2024 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、48 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約 1500 株であった。

2023 年度は 55 施設から約 1500 株分のデータについて照会があり、感染研で精度確認を行った (上記型名付与を行った株のデータを含む)。全遺伝子座における正解率 (平均値) は約 98% であった。株毎の正解率 (平均値) は約 89% であった。

EHEC 菌株解析パイプライン (データ QC、アセンブル、SNP 解析パイプラインの構築)

解析パイプラインについては、感染研・細菌第一部内および九州大学 中村佳司博士の協力のもと、機能の評価や改善を行った。その結果、事前に設定した値 (カバレッジやコンタミネーションの割合等) に対して自動的に QC を行い結果を表示する機能を追加した (表 1)。また、SNP 解析に関しては、結果の評価に必要なコアゲノムサイズ等を自動的に計算してレポートを出力する機能を追加した (図 2)。

構築したパイプラインについて、docker コンテナ化を行った。Windows および Linux 環境下でインストールおよび

動作確認を行った。通常インストールにはエラー対応を含め数時間を要するが、**docker** を利用した場合には一時間程度でインストール可能であった。プログラムの実行には、**JupyterLab** を利用した。**JupyterLab** は、ウェブブラウザ上で動作するため、OS に関わらず利用可能である。また、ノートブックと呼ばれるファイル内ではコードの編集、実行および結果の表示が可能である。**JupyterLab** のノートブック上でマニュアルと解析コードを一体化したファイルを作製することで、情報解析初心者でも容易に実行可能な環境が構築された (図 3)。

地衛研における EHEC 菌株のゲノム解析

R5 年度において沖縄県で分離され、NESID 情報が付加されている腸管出血性大腸菌株 322 株についてゲノム配列を取得した。アセンブル方法を検討するため、**shovill** にて 22 株のアセンブルを実施した。completeness 99.93 以上、contamination 0.43%以下の良好な結果を得た。これらの 22 株のドラフトゲノム配列は DDBJ に登録した。

D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年より約 28%と大幅に増加した。解析結果は定期的あるいは不定期に厚生労働省 NESFD に MLVA リストとして掲載された。地方衛生研究所から型名付与のために送付された MLVA データは約 1500 株に上った。感染研で行った精度確認では菌株ベースで 89%、遺伝子座ベースで 98%一致しており、多くの地衛研において

技術的な問題が解消されつつあると考えられた。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。

食中毒事例等の集団感染等の調査で WGS 解析を用いるの情報解析手法は、正確かつ他機関でも利用・検証可能であることが望ましい。SNP 解析に用いるプログラムは数多く利用可能であるが、標準的な解析手法は現在までに確立されていない。その理由としては、SNP 解析には、参照配列におけるリピート配列の検出、コアゲノムサイズの同定や、組換え領域の検出・除去等の複数の解析過程が存在することが挙げられる。これらについて、一度に行えるプログラムは利用可能でなかった。また、プログラム間の依存関係のために、インストールが困難な場合も存在した。本研究では、生データ (WGS リードデータ) の QC から SNP 解析、系統解析までを行えるプログラムを、単一の **docker** コンテナに含めることで、インストール時の課題を解決することができた。今後、地方衛生研究所等に試験的に配布し、評価を行うことで、プログラムおよびマニュアルの改善を行う予定である。

一方で、感染研細菌第一部の協力のもと、地方衛生研究所の協力研究者が自力で DDBJ まで登録できたことは大きな成果であり、この取り組みを更に拡大する試みを進める。

E. 結論

主に SNP 解析を目的とした、WGS 解析プログラムを確立し、OS に依らずイン

ストール可能な docker コンテナ化を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Lee K., Iguchi A., Terano C., Hataya H., Isobe J., Seto K., Ishijima N., Akeda Y., Ohnishi M., and Iyoda S. Combined usage of serodiagnosis and O antigen typing to isolate Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O76:H7 from a hemolytic uremic syndrome case and genomic insights from the isolate. 2024. Microbiology spectrum 12:e0235523.

2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2022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44巻、72-73、2023年5月

3. Kakita T, Lee K, Morita M, Okuno M, Kyan H, Okano S, Maeshiro N, Ishizu M, Kudeken T, Taira H, Teruya M, Ogura Y, Akeda Y, Ohnishi M, Isolation and whole-genome sequencing analysis of *Escherichia fergusonii* harboring a heat-labile enterotoxin gene from retail chicken meat in Okinawa, Japan. Microbiol Immunol 2024, 68 115-121. Epub 2024 Jan 20.

2) 学会発表

1. 李 謙一. 病原細菌における全ゲ

ノム配列解析の基礎. 衛生微生物技術協議会第43回研究会. 岐阜, 2023.

2. 李 謙一. EHECにおけるWGS解析. 令和5年度 北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者研修会. 岩手県、2024.

3. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析（2022 年）。第 44 回日本食品微生物学会学術総会、2023 年 9 月、大阪府堺市。

4. 泉谷秀昌：2023 年 EHEC の状況まとめ。令和 5 年度北海道東北新潟ブロック 腸管出血性大腸菌検査担当者研修会、2024 年 1 月、岩手県盛岡市。

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

表 1 自動クオリティチェック (QC) 評価の結果例

strain	no.of_reads	total_read_length	coverage	#contigs	Largest_contig	Total_length	Marker_lineage	Completeness	Contamination	qc_results	qc_coverage	qc.#_contigs	qc.Total_length	qc.Completeness	qc.Contamination
DRR147067	1,154,412	335,803,419	61.1	181	434,806	5,120,788	f_Enterobacteriaceae (UID5162)	99.93	0.31	PASS	pass	pass	pass	pass	pass
DRR147069	1,250,569	364,082,817	66.2	204	434,985	5,186,658	f_Enterobacteriaceae (UID5162)	99.93	0.36	PASS	pass	pass	pass	pass	pass
DRR147075	1,032,502	299,954,394	54.5	189	435,066	5,185,030	f_Enterobacteriaceae (UID5162)	99.93	0.36	PASS	pass	pass	pass	pass	pass
DRR147079	1,172,467	341,279,434	62.1	227	435,066	5,361,884	f_Enterobacteriaceae (UID5162)	99.93	0.51	PASS	pass	pass	pass	pass	pass

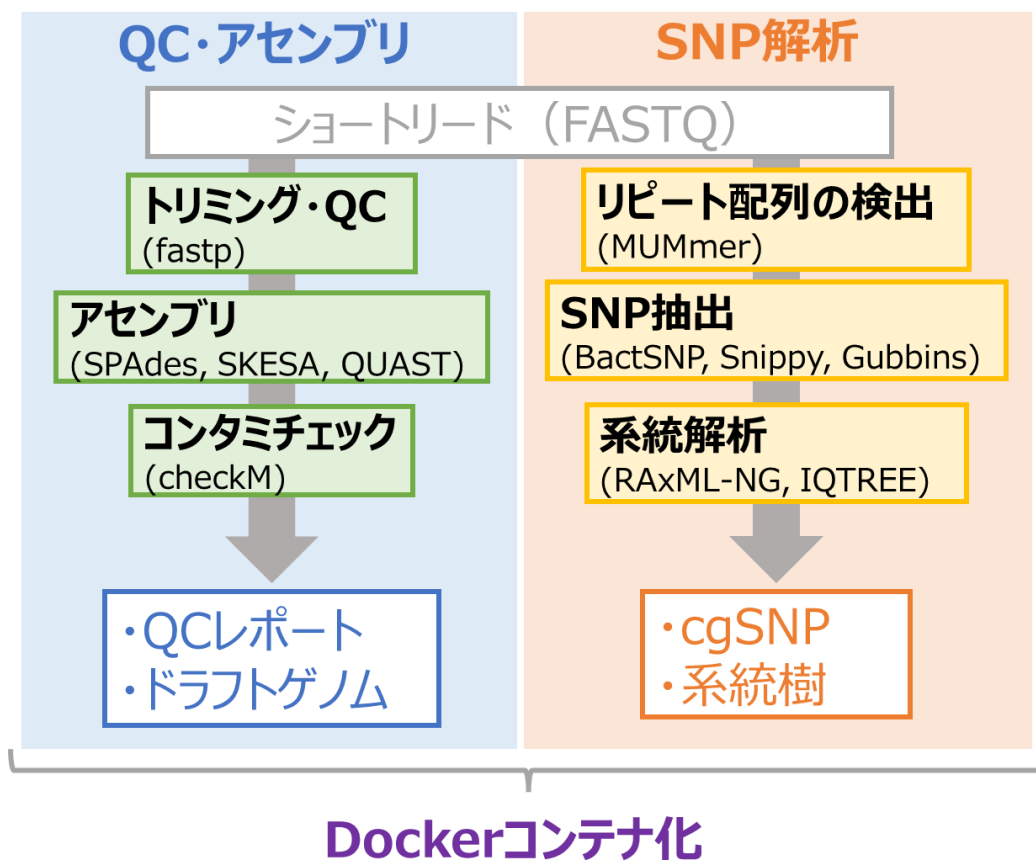


図 1. 解析パイプラインの概要
括弧内は主要なプログラム名を示す。

This is SNPcaster
version :2023-06-05
list_name : list_test
repeats_file_name : repeats.tsv
Reference file name : Sakai_BA000007.fas
Clustered SNP removal (bp) : 10
Recombinogenic region detection (Gubbins) : ON

Removed SNPs in repeat region : 2928
Removed SNPs in recombinogenic region : 3136
Number of informative site before Gubbins : 35781
Number of informative site after Gubbins : 32645
Core_genome size before Gubbins (bp) : 4012769
Core_genome size after Gubbins (bp) : 3803669

図 2. SNPcaster プログラムでの結果レポートの例

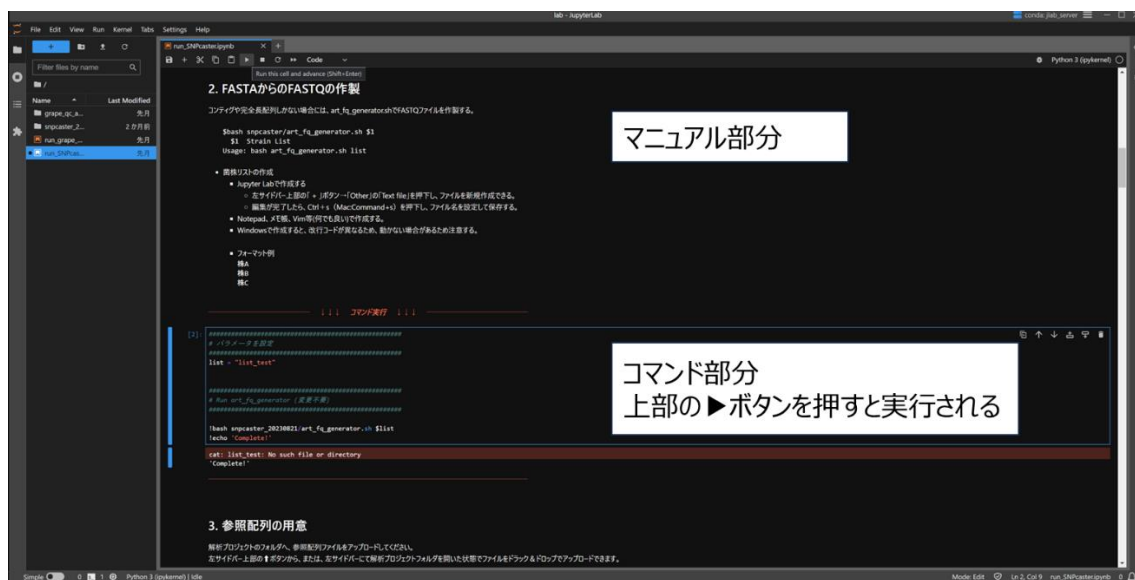


図 3. JupyterLab ノートブック例

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

広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究

研究分担者 中村 佳司 九州大学大学院医学研究院・講師

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の事例調査のための分子型別法として、反復配列多型解析法（MLVA法）が迅速性等に優れていることから、国内では本法が主に用いられてきた。前身の研究班では、MLVA法によるEHEC菌株の全国的な分子疫学的解析に加えて、EHEC菌株の全ゲノム配列のデータベース化を行った。その結果、ゲノム情報を利用してEHEC集団感染を早期探知するための基本的な情報基盤が構築でき、これを実際的なEHEC集団感染探知に利用できる段階に来ている。本研究班では、1) MLVA法運用の効率化・迅速化・精度向上およびMLVA型別データと発生動向を利用したEHEC食中毒アラート検出システムの構築、2) EHECの全ゲノム配列（WGS）のデータベースの拡充化によるMLVA法との優劣性の解明およびWGS解析パイプラインの構築、3) 離島でのコホート研究によるEHEC感染症発生とその原因の関連性の評価、を行うことを目的としている。分担者は、研究代表者とともに2)の課題を担当するとともに、3)の課題で行われる動物分離菌株の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、研究代表者と連携して、大腸菌の全ゲノム配列を用いた解析パイプラインを構築するとともに、集団感染感知の基準となる指標について検討した。また、臨床あるいは動物（牛）由来のEHEC菌株および健康牛から排菌される大腸菌の全ゲノム配列データ（ドラフトゲノム配列）の取得を行なった。

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と相まって日本の食中毒として最も警戒が必要な食中毒となっている。本感染症の事例調査のため分子型別法として、反復配列多型解析法（MLVA法）が迅速性等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。前身の研究班では、MLVA法によるEHEC菌株の全国的な分子疫学的解析に加えて、EHEC菌株の全ゲノム配列（WGS）のデータベース化を行った。その結果、ゲノム情報を利用してEHEC集団感染を早期探知するための基本的な情報基盤が構築でき、これを実際的なEHEC集団感染探知に利用できる段階に来ている。分担者は、本研究の柱の1つである、「EHECなどの検査のためのWGS解析法の確立に関する検討とEHEC株のWGSデータベースの拡充」を担当している。

本分担課題は、国際整合性の観点を考慮しつつ、研究代表者と連携して、EHEC食中毒探知の最前線である地方衛生研究所等で利用可能なゲノム解析パイプラインを構築することを目指している。このために、これまでに蓄積された国内分離株のゲノムデータに、EHEC感染症集団発生事例に由来する国内あるいは海外の菌株のデータを加えて、研究代表者のグループが開発したゲノム解析パイプラインによる解析を行い、このパイプラインの検証・解析結果を踏まえて、国際的に整合性のある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、これと並行して、新たに分離されたEHEC国内株のWGSデータを取得することで、前身の研究班から培われてきたEHECのWGS情報データベースをさらに拡充することも目的となる。これらに加え、本研究班では、MLVA及びWGS解析から得られたデータを利用して感染源や感染経路等に関する後方視的な疫学解析を行う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、動物（牛）由来株のWGSデータ収集を随時サポートし、必要に応じて、上記のWGS情報データベースに組み込んで解析する役割も担っている。

B. 研究方法

(1) 研究代表者が開発したゲノム解析パイプライン（SNPcaster）による一塩基多型（SNPs）の検出条件について、海外のEHEC感染症集団発生事例に由来する菌株のデータを用いて、i) 解析対象の配列に対する参照配列の設定、ii) 同一クローンの判定基準となるSNPs数の閾値を検証した。公共データベース（NCBIデータベース）からEHECの集団感染に関するデータセットのリストを抽出後、同一事例内に3株以上登録されているEHECのWGSデータをダウンロードし、合計5事例（イタリア1事例、フランス2事例、アメリカ2事例）のWGSデータを取得した。

(2) 研究代表者のグループが収集した、2021年・2022年に国内で発生したEHEC集団感染事例（5

検体以上の事例；分離源のヒトが全て無症状であった事例も含む）の分離株（計426株）のうち、226菌株のWGS情報を取得した。また、離島コホート研究の過程で収集された、2つの離島で飼育されている牛から分離された病原大腸菌（EHECおよび腸管病原性大腸菌（EPEC））および大腸菌群スクリーニング用の培地（XM-G培地）あるいは主要EHECの推定鑑別培地（CHROMagar STEC）から釣菌した細菌のWGS情報も取得した。WGS情報の取得には、イルミナ社のNovaSeqを利用し、ショートリード配列を取得した。離島コホート研究の分離菌については、shovillプログラムを用いて作成したドラフトゲノム配列の品質を、checkMプログラムを用いて評価した。その後、ECTyperプログラムを用いて菌種推定と大腸菌の血清型別を行うとともに、志賀毒素（*stx*）遺伝子およびエンチミン（*eae*）遺伝子の保有の有無を解析した。

（倫理面への配慮）

該当しない

C. 研究結果

（1）SNPcasterパイプラインの活用法についての検討：

i) 解析対象の配列に対する参照配列の設定：SNPcasterで行われるSNP解析には、BactSNPプログラムが採用されている。このプログラムでは、解析したい菌株のWGSをそれぞれ参照配列にアラインメントし、参照配列を含む全ての解析対象株に共通するゲノム領域（コアゲノム配列）に存在するSNPsを抽出する。EHEC血清型間にはゲノム多様性があることから、解析対象と遺伝的に近縁でない（例えば、異なる血清型の）菌株のゲノム配列を参照配列として設定すると、コアゲノム配列が縮小され、菌株間のSNPs数が過小評価される可能性がある。本研究で収集した海外5事例のEHEC血清型はO157（2事例）あるいはO26（3事例）であった。O157の菌株の解析にO26菌株のゲノムを、O26の菌株の解析にO157菌株のゲノムをそれぞれ参照配列とした場合、血清型が一致している場合と比較して、コアゲノム配列が0.3~0.4 Mb縮小され、抽出SNPsも最大で3 SNPs少なくなった。本研究では解析の解像度を最大にするため、解析対象の菌株の血清型と同一の血清型のゲノム（O157の場合はSakai株、O26の場合は11368株）を参照配列として、SNP解析を行なった。

ii) 同一クローンの判定基準となるSNPs数の閾値の検証：NCBIに登録されている菌株セットの管理ID（BioProject ID）のうち、イタリアおよびフランスの事例（計3事例、全てO26 EHEC）の管理ID内には、それぞれ単一事例に由来するEHEC菌株のWGSデータが登録されており、菌株間の最大SNPs数はいずれの事例においても5 SNPs以下であった。アメリカのO157による2事例のうち、1事例（BioProject ID: PRJNA517910）には、2018年の大規模集団事例時にウィスコンシン州で分離された菌株のWGSデータが登録されており、菌株同士の疫学的関連性が不明であったため、本解析から除外した。残りの1事例（BioProject ID: PRJNA215830）についても、複数の事例に由来する菌株のWGSデータが登録されていたが、菌株の疫学情報が論文報告されていた（Turabelidze G, et al. J Clin Microbiol, 2020）ため、菌株同士の疫学的関連性と遺伝的距離（菌株間のSNPs数）の対応を精査した。その結果、同一感染事例の原因と考えられる菌株同士の遺伝的距離は、1つの菌株を除いて5 SNPs以内であり、例外の1株とその他の菌株の遺伝的距離は11~12 SNPsであった。また、互いに疫学的関連性のない菌株同士の遺伝的距離は13 SNPsよりも大きくなることが分かった。これらの結果は、海外のEHEC集団感染事例において、5 SNPsが同一クローン判定のひとつの基準となることを示唆している。

（2）国内分離株のWGSデータの収集：

計226の臨床由来EHEC菌株に関して、平均740 Mb（387~1,368 Mb）のショートリード配列を取得した。代表的なEHEC菌株であるO157 Sakai株ゲノムの全長（5.6 Mb）に対し、平均132xカバレッジ（69x~244x）のデータ量であったことから、WGS解析に十分なデータ量がいずれの菌株においても取得されていると考えられた。

離島コホート研究から分離された計155の牛由来の菌株に関して、平均806 Mb（560~1,225 Mb）のショートリード配列を取得した。ショートリード配列をアセンブルして得たドラフトゲノム配列のうち、8つについては複数の菌株のゲノム配列が含まれていると判断した。残りの147株のうち、XM-G培地で分離された菌株は122株含まれており、そのうち119株が大腸菌であることがWGSを用いた解析から推定された。CHROMagarで分離された9菌株は全て大腸菌であり、そのうち2株は*eae*遺伝子陽性であった。離島コホート研究を担当する研究者が事前に行なったPCR解析（*stx*, *eae*, およびEHEC主要O血清群）により、EHECあるいはEPECであると推定された16菌株のうち、15株は*stx*と*eae*遺伝子のどちらか、あるいは両方が陽性であった。残りの1株の血清型はO121:H11であり、O血清型はEHEC主要血清型のひとつであるO121:H19と共通するが、H血清型は異なっていた。

D. 考察

（1）SNPcasterパイプラインの活用法についての検討：

前身の研究班から既に報告されているとおり、WGS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。従って、国内で使用するべき解析パイプラインに関して、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く、WGSの幅広い活用のために独自のパイプラインを構築する必要がある。今回、研究代表者のグループが開発したSNPcasterプログラム（試用版）では、参照配列をユーザー自身が指定することになっている

が、参照配列はSNPs数に直接影響することが今回の解析で明らかになったため、国内でのクローンの判定基準を統一するために、参照配列は指定しておくべきであると考えられる。国内で集団感染を引き起こすEHEC血清型は主に、O157:H7, O26:H11, O111:H8であることから、少なくともこれらの血清型については、代表菌株の参照配列を予め用意する必要がある。この3つの血清型以外の病原大腸菌に関しては、解析対象の菌株のうちのひとつのWGSを参照配列とすることによって、予め参照配列を指定したEHEC血清型と同様の判定を行うことができると考えられるが、同一クローン判定の基準を上記の3つの血清型と同じにして問題がないかどうかは、実際の事例の解析を通じて検討していく必要がある。

海外の集団発生事例に由来するEHEC菌株のWGS解析から、同一クローン判定の基準（5 SNPs）を明らかにした。この結果は、研究代表者が行なった国内のEHEC菌株の解析結果とほぼ一致しており、少なくともSNPcasterパイプラインを用いた場合にまず考慮すべき基準であると思われる。一方、アメリカの事例において、疫学的関連性がある菌株の間にも12 SNPsの遺伝的距離があり、疫学的関連性のない菌株同士であっても遺伝的距離が13 SNPsとなったことは、WGS解析の判定において、同一クローン判定の基準によっては無関係な事例の菌株同士を結びつける可能性があるという点で、注意すべき結果である。従って、今後国内株のWGS配列を用いて、同一のEHEC血清型であるが、疫学的関連性のない菌株同士の遺伝的距離の情報も蓄積していく必要があると考えられる。

(2) 国内分離株のWGSデータの収集：

計226の臨床由来EHEC菌株について、WGSデータを収集することができたため、今後、研究代表者と連携して、上述のSNPcasterパイプラインの検証にこのデータを活用するとともに、EHECデータベースのアップデートを行う。離島コホート研究によって牛から分離されたEHEC菌株、特にEHEC主要血清型ではないが、stx遺伝子陽性の菌株に関しては、参照配列あるいはlandmarkとなりうると考えられるため、完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備するとともに、分担者が独自に開発した定量系を用いて、Stxの産生量を測定する予定である。牛から分離されたnon-EHEC菌株は、EHECデータベースの拡充には直接関連しないが、牛の腸管内でEHECと共存している可能性があるという点で重要であるため、典型的なEHEC菌株との系統関係を解析するとともに、離島コホート研究を分担する研究者とともに今後の研究方針を議論していく予定である。

E. 結論

国内独自のパイプラインであるSNPcasterについて、海外のEHEC集団感染事例のWGSデータを用いて、本パイプラインの使用に必要な参照配列の検討と集団感染事例に由来する菌株同士の遺伝的距離の決定を行い、SNPcasterにおける同一クローン判定基準を決定した。

WGS情報データベースの構築に関しては、2021年と2022年にEHEC集団感染事例の分離株と離島で飼育されている牛由来の分離株のWGSデータを収集した。さらに、EHECのリザーバーである牛の腸管内に存在する大腸菌のWGSデータも取得した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立
に資する研究（23KA1005）」
分担研究報告書

分担課題名 食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析

研究分担者： 砂川 富正
所属（令和5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 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来より指摘されている。

感染症発生動向調査（NESID）の患者情報・病原体情報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、統合したデータの効果的な活用方法について検討する。具体的には、集団発生、広域食中毒事例、散发事例にわけて基本的な記述疫学を行い、異常（特異的な集積や分布の蚊偏り等）探知への活用の検討、地理情報システム（GIS）を用いた発生状況の空間疫学的解析等を実施する。

EHEC 広域事例早期探知システムによる異常の探知を行い、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）、2023 年（3 回／3 回）であった。2023 年の厚生労働省への情報提供回数は 3 回で、2022 年と並び 2019 年に次ぐ多さであった。厚生労働省への情報提供を行う仕組みを構築すべく法令の見直しを行い、2017 年に編成した「広域食中毒発生時の疫学調査に関するガイドライン」の更新作業の準備に取り組んだ。一つの目標として掲げてきた農林水産部局との連携は行えなかった。

研究協力者（令和 5 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。厚生労働省への情報提供を行う仕組みを構築すべく法令の見直しを行い、2017 年に編成した「広域食中毒発生時の疫学調査に関するガイドライン」の更新作業の準備に取り組むこととした。

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2023年までの情報について列挙する。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）、2023年（3回／3回）であった。2023年の厚生労働省への情報提供回数は3回で、2022年と並び2019年に次ぐ多さであった。2023年のEHEC症例報告数は2011～2019年の報告数と同等の水準まで増加していたが、アラート検知回数は2019年より少なかった。

2023年のアラート情報の1回については、リアルタイムな監視の状況（2023年33-34週）として、O157VT2が東日本で多い等の疫学的な偏りを認めた。2023年8月22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2023年33週から34週にかけて、NESID上では例年を上回るO157VT2症例数の増加を認め、特に診断・週34週にかけては、明らかにO157VT2に起因するイベント数の増加がみられた（過去平均+2SD以上となり、またイベント数20以上で推移したことからレベル4相当）。

- ・O157VT2症例群は、女性に多いが、年齢層は幅広い。

- ・HUS症例が発生しており、重症例発生への注意が必要。

- ・O157VT2症例群は、地理的分布としては東北地方、関東地方などの東日本が多い。

O157VT2症例群は、喫食歴や地理分布等の情報も併せ、多くの症例が単独の汚染原因によるものであると考えられた。

- ・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、新型コロナウイルスによるパンデミックの状況が落ち着き、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。

さらに、2017年に編成した「広域食中毒発生時の疫学調査に関するガイドライン」の更新作業の準備に取り組んだ。

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)、2023 年 (3 回/3 回) であった。2023 年の厚生労働省への情報提供回数は 3 回で、2022 年と並び 2019 年に次ぐ多さであった。COVID-19 がパンデミックとなった 2020 年からの 2022 年までの回数の減少は明らかであったが、2023 年における増加は、COVID-19 パンデミックの一応の減衰に伴い、アラート発生頻度の再興という状況になっているものと考えられる。パンデミック中には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・試行が必要であると考えられたが、その後の急速な状況の回復は、対応がより複雑であることを示唆する。厚生労働省への情報提供については、単なるアラートを上回る発生状況のみならず、質的な判断も加味することが重要である。探知のみについては、いわゆる Event-based surveillance (EBS) の活用が食品衛生行政にもどの程度有用かを検討することの意義があるかもしれない。主眼である MLVA 情報に患者情報の突合情報を、今後効果的・効率的に用いることが出来る体制の構築について、今後、よりテクニカルに検討していく必要がある。それらの情報を

加味したガイドラインの改訂は目標である。

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。探知頻度とのバランスを考慮しつつ、より迅速な探知を目指した基準値設定を検討する。疑い事例の早期探知と情報共有により、事例発生時の調査及び介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上大きな貢献が期待出来る。迅速探知により調査開始を早めることで、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調整についても検討する。2023 年度はアラートの頻度は増加し、COVID-19 パンデミックの影響が低下してきた状況を示唆する。公衆衛生対応に有用なアラートの発出について検討していき、それらをガイドラインに含めていく。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5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

食品関連サンプル由来株の収集、解析

研究分担者 廣瀬昌平 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究では、2016年から2021年までの間に国内の食肉処理施設に搬入された牛から分離された腸管出血性大腸菌(EHEC)36株の血清型、MLVA型およびStxサブタイプを解析した。牛糞便由来EHEC株の血清型は、0157:H7が33株、026:H11が2株および0111:HUTが1株であり、MLVA型は、EHEC 0157が18種類、EHEC 026が2種類、EHEC 0111が1種類に分類された。10種類のMLVA型は、本課題で新規に報告された型であった。また、同一MLVA型の株が異なる時期に2回以上分離されたことから、牛個体間での同一MLVA型EHECの汚染が示唆された。多くの牛糞便由来EHEC株は、*stx1a*および*stx2a*を保有しており、食肉処理過程での牛枝肉の糞便汚染が重要な食中毒リスクであると考えられた。広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株に加えて牛糞便由来株等の食品生産現場由来株のゲノムデータも蓄積していくことが有用であると考えられた。

研究協力者

国立感染症研究所

泉谷 秀昌

国立医薬品食品衛生研究所

工藤 由起子

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。

EHEC 食中毒の原因として特定された原因食品としては、牛肉、牛レバー、チーズなど牛に関連する食品が多い。EHEC の主な生息場所は、ほ乳動物や鳥類の腸管内とされており、家畜の中では特に牛の腸管や糞便からの分離が多く報告されている。そのため、糞便を介した牛肉の汚染やその調理品に残存した EHEC の食中毒への関連が疑われている。そこで、本研究では、食肉処理施設に搬入された牛の糞便由来 EHEC 株を収集し、食品関連サンプル由来株として MLVA 型およびゲノムデータを蓄積することで、疫学情報を活用した次世代早期食中毒アラートシステム構築に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1) 菌株

2016 年から 2021 年に国内食肉処理施設 A に搬入された牛の糞便から分離された EHEC 36 株を供試した。

2) DNA 抽出

カジトン培地に保存した牛糞便由来株を 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) *stx* および *eae* の保有の確認ならびに O 血清群の決定

stx および *eae* の保有ならびに主要 7 血清遺伝子型 (026、045、0103、0111、0121、0145、0157) をマルチプレックスリアルタイム PCR によって判定した。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。いずれかの O 遺伝子型のプライマーで陽性と判定された株は、陽性となった O 群の抗血清を用いて O 血清群を決定した。

4) H 血清型の決定

H-genotyping PCR (Banjo ら、2018) を用いて H 遺伝子型を決定し、陽性となった H 遺伝子型の抗

血清を用いて H 血清型を決定した。

5) 運動性試験

カジトン培地に保存した EHEC 36 株を LIM 培地に接種し、37℃で 24 時間培養し、運動性を確認した。

6) 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)。牛糞便由来 EHEC 株の抽出 DNA を鋳型として供試し、ProFlex PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック)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ピート数を決定した。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基に MLVA 型を決定し、過去

に同一 MLVA 型が報告されているかを確認した。

7) 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、牛糞便由来 EHEC 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。2)で抽出した DNA を鋳型として供試し、機器は ProFlex PCR System 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)。

C. 研究結果

1) 牛糞便由来 EHEC 株の血清型および MLVA 型

牛糞便由来株 36 株は、すべて *stx* および *eae* 陽性であり、血清型は 0157:H7 が 33 株、026:H11 が 2 株 0111:HUT が 1 株であった (表 4)。MLVA 型は、EHEC 0157 が 18 種類 (13m0154、13m0177、13m0662、13m0694、15m0180、16m0206、16m0516、17m0097、17m0134、17m0320、17m0512、18m0297、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629、20m0450 および 21m0465)、EHEC 026 が 2 種類

(17m2226 および 21m2145)、EHEC 0111 が 1 種類 (16m3038) に分類された。EHEC 0157 の MLVA 型 18 種類のうち、7 種類 (16m0516、17m0512、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629 および 21m0465) は本課題で新規に報告された型であり、残りの 11 種類は過去に報告された型と同一であった。EHEC 026 の MLVA 型 2 種類および EHEC 0111 の MLVA 型 1 種類は、本課題で新規に報告された型であった。13m0177、15m0180 および 18m0616 は、異なる月にまたがって 2 回以上分離された。また、EHEC 0157 および EHEC 026 全株は運動性を示したが、EHEC 0111 は運動性を示さなかった。

2) 牛糞便由来 EHEC 株が保有する Stx サブタイプパターン

保有する Stx サブタイプのパターンは、EHEC 0157 では *stx2a* 単独、*stx2c* 単独、*stx1a* および *stx2c* ならびに *stx1a* および *stx2a* の 4 種類、EHEC 026 では *stx1a* 単独の 1 種類、EHEC 0111 で *stx1a* および *stx2a* の 1 種類であった (表 5)。

D. 考察

牛糞便由来 EHEC 36 株のうち 0157:H7 が 33 株であったことか

ら、牛糞便に含まれる EHEC は、血清型 0157:H7 が多くを占めることが示唆された。また、同一 MLVA 型の株が異なる月にまたがって 2 回以上分離されたことから、異なる牛が同一 MLVA 型の EHEC 株に汚染されている可能性が示唆された。さらに、牛糞便由来 EHEC 株が保有する Stx サブタイプは、強力な下痢原性を有する *stx1a* および *stx2a* が多かったことから、牛糞便由来 EHEC 株の食中毒リスクは高いと考えられる。加えて、牛糞便由来 EHEC にこれまでの食品由来株や食中毒患者分離株等から報告がなかった 10 種類の新規 MLVA 型の株が含まれていたことから、広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株のみならず牛糞便由来株等の食品生産現場での汚染可能性が示唆される株の MLVA 型およびゲノムデータもデータベースに蓄積していくことが有用であると考えられた。

E. 結論

牛糞便由来 EHEC 株は血清型 0157:H7 が多くを占め、複数の新規 MLVA 型の株が含まれていた。また、多くの牛糞便由来 EHEC 株は、強力な下痢原性を有する Stx サブ

タイプを保有しており、食中毒リスクは高いと考えられた。広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株に加えて牛糞便由来株等の食品生産現場由来株のゲノムデータも蓄積していくことが有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

・廣瀬昌平，泉谷秀昌，佐々木貴正，明田幸宏，工藤由起子：同一食品検体における腸管出血性大腸菌分離株の MLVA 型多様性・病原因子関連遺伝子・薬剤感受性の解析，第 44 回日本食品微生物学会学術総会，2023（R5）年 9 月 21-22 日，堺市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 腸管出血性大腸菌検出用プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせと配列

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
Assay1	<i>stx</i>	Stx-F	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG	USDA
		Stx-R	CCCCAGTTCARWGTAGRTCMACDTC	
		Stx1-P	CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	
		Stx2-P	TCGTCAGGCACTGTCTGAACTGCTCC	
	<i>eaeA</i>	Eae-F	CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA	USDA
		Eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTM	
		Eae-P	ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	
Assay2	16S rRNA gene	16S rRNA-F	CCTCTTGCCATCGGATGTG	USDA
		16S rRNA-R	GGCTGGTCATCCTCTCAGACC	
		16S rRNA-P	GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC	
	RfbEO157	RfbE O157-F	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA	EFSA
		RfbE O157-R	CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT	
		RfbE O157-P	AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	
Assay3	WzxO26	Wzx O26-F	GTATCGCTGAAATTAGAAGCGC	USDA
		Wzx O26-R	AGTTGAAACACCCGTAATGGC	
		Wzx O26-P	TGGTTCGGTTGGATTGTCCATAAGAGGG	
	WbdIO111	WbdI O111-F	TGTTCCAGGTGGTAGGATTCTG	USDA
		WbdI O111-R	TCACGATGTTGATCATCTGGG	
		WbdI O111-P	TGAAGGCGAGGCAACACATTATATAGTGC	
Assay4	WzxO45	Wzx O45-F	CGTTGTGCATGGTGGCAT	USDA
		Wzx O45-R	TGGCCAAACCAACTATGAACTG	
		Wzx O45-P	ATTTTTTGCTGCAAGTGGGCTGTCCA	
	WzxO121	Wzx O121-F	AGGCGCTGTTTGGTCTCTTAGA	USDA
		Wzx O121-R	GAACCGAAATGATGGGTGCT	
		Wzx O121-P	CGCTATCATGGCGGACAATGACAGTGC	
Assay5	WzxO103	Wzx O103-F	TTGGAGCGTTAACTGGACCT	USDA
		Wzx O103-R	ATATTCGCTATATCTTCTTGCGGC	
		Wzx O103-P	AGGCTTATCTGGCTGTTCTTACTACGGC	
	WzxO145	Wzx O145-F	AAACTGGGATTGGACGTGG	USDA
		Wzx O145-R	CCCAAACTTCTAGGCCCG	
		Wzx O145-P	TGCTAATTGCAGCCCTTGCACTACGAGGC	

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

EFSA: EFSA Journal. 11:3138, 2013

表 2. MLVA 解析用プライマーミックス

プライマー ミックス	遺伝子座	Dye	Forward	Reverse
Mix1	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAATATTTTTG
	O157-9			GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
	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	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTAATTG	GAACAACCTAAACCCGCTCGCCATCG
Mix2	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
	EH26-7	PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGATGTTT	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	CCTTGTCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-36	NED	GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	GGGTTTCCATTTTCTTTACCTTCAGG

表 3. Stx サブタイプ型別用プライマー配列

遺伝子	Foward	Reverse
<i>stx1a</i>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGT	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG
<i>stx1c</i>	CCTTTCCTGGTACAACAGCGGT	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA
<i>stx1d</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA
<i>stx2a</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG GCCACCTTCACTGTGAATGTG
<i>stx2b</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	CAGCAAATCCTGAACCTGACG
<i>stx2c</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA
<i>stx2d</i>	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG GCCTGATGCACAGGTAAGTGGAC
<i>stx2e</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT
<i>stx2f</i>	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	TAATGGCCGCCCTGTCTCC
<i>stx2g</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT

表 4. 牛糞便由来 EHEC 株の分離年月、血清型および MLVA 型

菌株名	分離年月	血清型	MLVA型
菌株1	2016年6月	O157:H7	13m0154
菌株2	2016年6月	O111:HUT	16m3038*
菌株3	2016年9月	O157:H7	15m0180
菌株4	2016年9月	O157:H7	15m0180
菌株5	2016年11月	O157:H7	13m0694
菌株6	2016年11月	O157:H7	13m0694
菌株7	2016年7月	O157:H7	16m0516*
菌株8	2016年8月	O157:H7	17m0320
菌株9	2016年8月	O157:H7	17m0320
菌株10	2017年5月	O157:H7	17m0134
菌株11	2017年5月	O157:H7	17m0134
菌株12	2017年5月	O157:H7	15m0180
菌株13	2017年7月	O157:H7	17m0097
菌株14	2017年7月	O26:H11	17m2226*
菌株15	2017年7月	O157:H7	17m0512*
菌株16	2017年7月	O157:H7	17m0512*
菌株17	2017年7月	O157:H7	17m0512*
菌株18	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株19	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株20	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株21	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株22	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株23	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株24	2018年7月	O157:H7	13m0662
菌株25	2018年8月	O157:H7	18m0616*
菌株26	2018年9月	O157:H7	18m0616*
菌株27	2019年7月	O157:H7	19m0628*
菌株28	2019年8月	O157:H7	19m0629*
菌株29	2019年8月	O157:H7	16m0206
菌株30	2018年8月	O157:H7	18m0617*
菌株31	2019年12月	O157:H7	13m0177
菌株32	2020年2月	O157:H7	18m0297
菌株33	2020年2月	O157:H7	18m0297
菌株34	2020年9月	O157:H7	20m0450
菌株35	2021年7月	O26:H11	21m2145*
菌株36	2021年10月	O157:H7	21m0465*

*本課題で新たに報告された MLVA 型

表5. 牛糞便由来 EHEC 株の保有 Stx サブタイプ

菌株名	血清型	保有Stxサブタイプ
菌株1	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株2	O111:HUT	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株3	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株4	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株5	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株6	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株7	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株8	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株9	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株10	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株11	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株12	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株13	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株14	O26:H11	<i>stx1a</i>
菌株15	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株16	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株17	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株18	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株19	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株20	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株21	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株22	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株23	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株24	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株25	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株26	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株27	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株28	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株29	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株30	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株31	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株32	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株33	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株34	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株35	O26:H11	<i>stx1a</i>
菌株36	O157:H7	<i>stx1a, stx2c</i>

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）
分担研究報告書

「広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究」

反復配列多型解析法の精度管理、及び性能の評価

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
研究協力者	島袋 梢	国立感染症研究所	感染症危機管理研究センター

我々は地方衛生研究所（地衛研）における腸管出血性大腸菌の反復配列多型解析（MLVA）法の検査精度を担保するために、精度管理試験を実施してきたが、一部の施設では基本的な検査工程を正しく行えていなかった。現時点で、未参加の地衛研もあり、今後も試験の実施が必要である。精度管理試験は本法で起こり得るトラブルを把握する絶好の機会である。過去の試験で、幾つかの施設で原因不明の非典型的ピークが発生した。今後、参加施設の電気泳動データを解析し、原因特定が必要である。また、精度管理試験で把握したトラブル事例とその解決法を地衛研と共有できれば、検査精度の全国的な向上が図れる。

本研究では、全国の地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験の参加依頼をしたところ、国立感染症研究所から1日に発送できる菌株検体数を超える申し込みがあった。そこで、過去試験に未参加の施設や本法の導入歴が少ない施設を中心に21施設を参加施設として選んだ。試験の結果、全体的に高い検査精度にあったが、2施設が回答を誤った。2施設に検査工程を照会したところ、解析ファイルのBin設定が適切でなかったこと、及びタンデムリピート（TR）領域の増幅ピークに釣られて立ち上がったノイズをTRと判定したこと等、基本的な工程を正しくできていなかった。次に、過去の精度管理試験で得られた電気泳動データを収集し、機器や試薬の情報に基づき分析したところ、非典型的ピークの発生を抑えるには、特異性が高いMaster mixの使用が有効と分かった。最後に、これまでの精度管理試験で把握した情報を基にトラブルシューティング集を作成した。今後、この資料を用いた研修会を行うことで、地衛研全体のMLVA法の検査精度の向上を図るつもりである。

A. 研究目的

全国の地方衛生研究所（地衛研）では腸管出血性大腸菌（EHEC）の食中毒を早期に探知するために、分子疫学的解析法として反復配列多型解析（MLVA）によるサーベイランスが行われている¹⁾。本法は、特定の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²⁾。MLVA法の分離能は非常に高く、ゴールドスタンダードだったパルスフィールドゲル電気泳動法と同程度以上と報告されている³⁾。MLVA法は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であり、近年に頻発している広域な食中毒への対応にも適している⁴⁾。この様に分子疫学的解析法として優れたMLVA法の能力を公衆衛生分野で活かすには、地衛研での検査

精度を高く保つ必要がある。

前身の研究班では地衛研でのMLVA法の検査精度を担保するために、DNA検体を用いた精度管理試験を実施してきた。試験の結果、受験施設の大半は高い精度で本法を実施していたが、一部の施設では基本的な検査工程を正しく行えていなかった⁵⁾。地方衛生研究所全国協議会に加盟する地衛研の内、約30%の施設が前研究班で実施した試験に未参加であり⁵⁾、地衛研の検査精度の把握は十分と言えない。また、試験の際に実施したアンケートでは菌株分離からDNA抽出まで工程も様々あり⁵⁾、この工程の検査精度も評価できていない。今後、菌株検体を用いた本法の精度管理試験の実施が必要だろう。

地衛研のMLVA法検査精度を向上させるために、前研究班では、精度管理試験で不正解だった施設に対し、原因を特定し、改善策を提示してきた。しかし、ある施設に

において非典型的ピークをTR数と間違えたため、その施設に検査工程を照会したが、当該ピークの発生原因が分からなかった。非典型的ピークをTR領域の遺伝子増幅と捉えるかは個人差があり、全参加施設で起きていたのかもしれない。しかし、配布前の確認試験では非典型的ピークは見られなかったため、試薬や機器等の検査工程の条件により発生したことも考えられる。いずれにしても、試験に正解した施設からも電気泳動データを収集し、分析する必要がある。

地衛研の検査精度を上げる手段として、試験に不正解だった施設への改善策の提示のみでは不十分であろう。これまでは、試験に不正解の施設に個別に対応してきたが、その効果は1施設に限定される。現在、地衛研では人事異動が盛んであり、検査技術・知識の承継が大きな課題となっている⁶⁾。そこで、地衛研の検査精度の向上を効果的・継続的に図るには、試験で把握したトラブルを基に解決事例集を作成し、地衛研と共有することが有効だろう。

本研究では、地衛研のMLVA法の検査精度をより詳細に把握するために、菌株検体を用いた精度管理試験を実施した。次に、前研究班での精度管理試験で解決できなかった非典型的ピークの発生原因の特定と改善法の提言のために、参加施設から電気泳動データを取集し、アンケート結果を基に分析した。最後に、これまでに実施してきた精度管理試験で把握した情報を基に、トラブルシューティング集を作成した。

B. 研究方法

1. MLVA法の精度管理試験の参加施設の選定

地方衛生研究所全国協議会に加盟している地衛研等の施設から、都道府県及び政令指定都市に属する66施設に参加の依頼をした。施設からの申込みの際、「MLVA法導入後の年数」及び「参加希望者の経験年数」についてアンケートを行った。国立感染症研究所 村山庁舎から1日に発送できる菌株検体数は約20施設程度である。申込み施設が多数の場合、次の(1)～(4)の基準で参加施設を選定した。(1)熟練施設として、MLVA法の導入歴が5年以上の施設を除外する。(2)前身の研究班で実施した精度管理試験に未参加施設を優先的に選ぶ。(3)前研究班での試験で不正解の検体があった施設を優先的に選ぶ。(4)MLVA法の導入歴が2年以下、参加希望者の経験年数が1年未満の施設を優先的に選ぶ。2023年10月24日(火)から11月17日(金)まで申込期間を設け、11月24日(金)に申込みがあった施設に参加可否の連絡をした。

2. 精度管理試験での問題内容

参加施設に共通の菌株検体を配布した。検体は令和2年度の前研究班で候補としたEHEC菌株の内、過去の精度管理試験で用いられていない菌株を選んだ⁵⁾。これら菌株についてMLVA法を行い、保存中にTR数が変化していなかった3菌株を検体とした(表1)。問題内容として、3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)。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、検査工程に関するアンケートを行った。菌株検体であるため、TR数の変化やTR領域を含むプラスミドの脱落もあり得るが、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。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。

3. 精度管理試験の実施工程

2024年1月17日(水)に、各参加施設に菌株検体1～3をゆうパック常温便にて発送した。同日、各参加施設の担当者に回答用紙のエクセルファイル(図1)をメールにて送付した。回答締切りを2024年2月29日(木)とした。

4. MLVA法の非典型的ピークの発生原因の特定と改善法の提言

前研究班で実施したMLVA法精度管理試験において解決できなかった非典型的ピークの発生原因の特定を試みた(図2)⁵⁾。前研究班では、ある参加施設は検体2において143 bp程度の特異的ピークが発生した。検体2の領域0157-37は正しいTRは-2であるが、この施設はTRs = 10と判定した。そこで、当該施設から電気泳動データを収取し、検査工程を照会したが原因が分からなかった。

本研究では、前研究班の精度管理試験に参加した38施設に対して、検体2の領域0157-37が含まれる電気泳動データの送付を依頼した。受領した電気泳動ファイルを解析ソフトGeneMapper Ver. 6.0 (Thermo Fisher Scientific)で解析し、135～150 bpに強度50以上で、領域0157-37の標識蛍光と同じPETのピークがあった場合、非典型的ピークと判定した。また、試験の際に実施したアンケートを基に、PCR時のDNA希釈率、Master Mixの種類、電気泳動時の希釈率、PCRの温度・時間、シーケンサーの種類を電気泳動データと紐付けた。

本研究で実施する精度管理試験において非典型的ピークの発生が起きた場合も同様の手順で原因特定を試みた。今回の試験では菌株検体を用いるため、電気泳動データと紐づける情報にコロニー分離の有無やDNA抽出法を含めた。

5. トラブルシューティング集の作成

前研究班及び本研究班の精度管理試験の結果を基にトラブルシューティング集を作成した。全体の構成として、大分類をトラブルの種類（例えば、ピークが出ない、Binにピークが入らない）にし、小分類を原因（例えば、電気泳動時のPCR産物の添加ミス、Binファイルの調整不足）にした。各トラブルについて、「1. トラブル概要」、「2. トラブルの原因と解決法」及び「3. 実際の事例」の順で解説した。また、トラブルシューティング集の作成に当たり、足りない情報について試験参加者に照会した。

C. 研究結果

1. MLVA法の精度管理試験の参加施設の選定

地方衛生研究所全国協議会に加盟している66施設の地衛研に精度管理試験の参加依頼をしたところ、7割以上に当たる49施設から申込みがあった（表2）。国立感染症研究所 村山庁舎から1日に発送できる菌株検体数を大きく超えたため、事前に定めた基準(1)～(4)で選定した（表3）。(2)として過去の試験に未参加の10施設、(3)として過去の試験で不正解の検体があった6施設、(4)としてMLVA法の施設導入後2年以下、または担当者の経験年数1年未満の5施設の合計21地衛研を参加施設とした。

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21施設の内、19施設が全3検体に正解し、2施設が1つ以上の検体で不正解だった（表4）。不正解があった2施設は選定基準(4)のMLVA法の施設導入後の年数、または担当者の経験年数が少ない施設として選ばれていた。

施設Aは検体2及び検体3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、両検体の回答を間違えた原因はGeneMapperのBinファイルの調整不足だった（図3（A））。施設Aは同じ機種である日立DS3000でMLVA法を行っている他の地衛研から提供されたBinファイルを使用していた。このBinファイルで解析すると、検体2及び検体3の領域0157-19はTRs = 2となるが、国立感染症研究所 細菌第一部が作成したファイルで解析するとTR = 1と正しく算出された。これは泳動時の遺伝子増幅産物の移動度の変化ではなく、Binファイルの調整不足を示している。なお、照会の結果、施設Aが使用していたBinファイルは、ある研究施設で作成されたことが判明した。施設Aに提供した地衛研は当該ファイルを使っておらず、国立感染症研究所 細菌第一部が配布したBinファイルを使っていることも明らかになっ

た。

施設Bは検体3の領域0157-17のTR数を正しくは-2であるところ、6と誤った（表4、表5（B））。検査工程を照会し、泳動ファイルを取り寄せたところ、不正解の原因は、領域EH111-14でTRs = 1にピークが立ったことで、釣られて立ち上がった小さなピークをTRと判定したことと判明した（図3（B））。

3. MLVA法の不典型的ピークの発生原因特定と改善法の提言

前研究班の精度管理試験に参加した38施設に電気泳動データの送付を依頼したところ、30施設から提供があった。データをGeneMapperで解析した結果、不典型的のピークが発生した地衛研は14施設であり、ピークは4つに分類された。141 bp程度に発生し、領域0157-37のTRs = 10のBinに入る不典型的のピークであり、これをピーク1と定義した（図2）。また、142～145 bp、つまり領域0157-37のTRs = 10及び11のBinの間に入る不典型的のピークが発生しており、これをピーク2とした（図2（A））。さらに、領域0157-37のTRs = 11及び12のBinに入る不典型的のピークであり、これらそれぞれピーク3及びピーク4と定義した（図4（B）及び（C））。ピーク1、ピーク2、ピーク3及びピーク4が発生した地衛研は、それぞれ2施設、3施設、8施設及び1施設だった。

各電気泳動データと検査工程の情報を結び付け、不典型的のピークの発生とPCR工程の関係を調査した。PCR時にDNAを希釈した地衛研は4施設だった（表6（A））。検体はNanodrop（Thermo Fisher Scientific）で20～25 ng/μLに調製されたDNAだったが、4施設は1.5～12.5倍に希釈していた。希釈の有無に関わらず、およそ半数の施設でいずれかの不典型的のピークが起きていた。次に、PCRの際、T社試薬、Q社試薬A及びQ社試薬BのMaster Mixを使用した地衛研は、それぞれ9施設、14施設及び7施設だった（表6（B））。Q社試薬Bを使用した7施設ではピーク1、ピーク2及びピーク4が起きず、合計に占める不典型的のピークの無しの割合が最も低かった。また、PCRの条件については、「腸管出血性大腸菌 MLVAハンドブック（0157、026、0111編）⁷⁾」に基づかない条件で反応を行っていた地衛研は6施設あり、ハンドブックの条件との違いは各ステップの温度ではなく、時間だった（表6（C））。first denature及びlast extensionの時間の違い以外では、denatureを20秒から30秒に延長した施設が4施設あった。ハンドブック及びそれ以外の条件のどちらも約半数の施設でいずれかの不典型的のピークが起きていた。

次に、不典型的のピークの発生と電気泳動の関係を調査したところ、サンガーシーケンサーとしてT社機種A、T社機種B、T社機種C、T社機種D及びH社機種を使用した地衛研はそれぞれ1施設、16施設、4施設、

8施設及び1施設だった(表6 (D))。T社機種Dではいずれの非典型的ピークも起きていなかった。機種を構成する要素としてポリマーとキャピラリーがある。ポリマーはT社機種DではPOP-1を、それ以外の機種ではPOP-7を使用していた。T社機種Dでは28 cm、H社機種では36 cm、それ以外の機種では50 cmのキャピラリーを使用していた。なお、T社機種Dは試薬及びキャピラリーがカートリッジ式である。また、電気泳動時のPCR産物を50倍未満と100倍以上に希釈した地衛研はそれぞれ14施設で、合計に占める非典型的ピークの発生率は同じだった(表6 (E))。

本研究で実施した精度管理試験では明らかな非典型的ピークの発生は起きなかった。1施設において全3検体で「ノイズであるかの判断に迷うピークがあり、シングルPCRをしたら解決した。」と回答があった。この施設から電気泳動データを取り寄せて確認したところ、マルチプレックスPCR後に電気泳動した際、他の標識蛍光のピークが立ったことで、釣られて立ち上がったノイズが判断を迷わせた原因と判明した。

4. トラブルシューティング集の作成

前研究班及び本研究班での精度管理試験で把握したトラブル事例を大分類及び小分類に基づき分類した後(図5 (A))、各分類について解決法を示した。使用者にとってより分かり易くするために、実際の事例を挙げて解説した(図5 (B))。

D. 考察

本研究班ではEHECの菌株検体を用いたMLVA法の精度管理試験を行ったところ、参加施設は全体として高い検査精度を持っていた。我々が精度管理試験を実施する目的は、検査精度の把握に加えて、不正解があった施設に検査工程の問題点を特定し、改善法を提言することである。前身の研究班で実施した精度管理試験で不正解の検体があった6施設が本試験にも参加したが、これら施設は全検体に正解した。これは我々が実施してきた精度管理試験により、地衛研の検査能力を向上させられたことを示唆している。一方で、今回の精度管理試験では2施設が1検体以上で不正解だったが、1施設はMLVA法の施設導入年数が2年、参加者の経験年数が1年であり、もう1施設は導入年数も経験年数も0年だった。これは、今後も、MLVA法の地衛研への普及と検査精度向上の必要性を示している。

本研究では、精度管理試験で不正解の検体があった施設に対して改善法を提案できた。施設Aが検体2及び検体3で不正解だった原因はBinファイルの調整不足だったので、細菌第一部が作成したBinの使用を勧めた。施設Aには、TR算出の際の注

意点として、TRのサイズは理論上の数値と電気泳動での測定値が異なること、測定値はシーケンサーの機種等の影響を受けることを伝えた。さらに、TR数によってオフセット部分が変化する領域もあるため、各施設でBinファイルを設定する際は、TRが分かっているサンプルを流してBinを調整する必要性も伝えた。今回、施設Aが回答を誤った領域0157-19では、TR数が2-3のBinの間隔(約3 bp)は、他のTR数のBinの間隔(6 bp)より狭いという特徴を持つ。この理由は、TRs = 1または2を持つ菌株は、それ以外のTR数を持つ菌株とオフセット部分が異なるためである。

施設Bが検体3で不正解となった原因は、非典型的ピークをTRと判定したためだったことから、判定のコツを伝えた。具体的には、4種の蛍光標識の波長はPET-NED-VI C-FAMの順に近く、ある蛍光のピークが立った時、波長に近い他の蛍光は釣られて検出され易いことを念頭に置く必要があると説明した。釣られて検出されるピーク解決法として、シングルPCRによる1領域の電気泳動を行うと当該ピークを防げると伝えた。さらに、血清型によってはほぼ全ての菌株がTRを持たない(つまり、-2)領域もあるので^{3,8)}、血清型もノイズであるかの判定の役に立つと教えた。検体3の菌株の血清型は0111であり、施設Bはこの検体の領域0157-17のTR数を6と回答したが、一般的に0111はこの領域にTRを持たない³⁾。

本研究では、MLVA法の電気泳動データと検査工程の情報を結び付け、非典型的ピークの発生原因を探ったところ、明確な発生原因を見付けられなかったが、幾つかの知見が得られた。最初に、非典型的ピークが発生した施設は全体の約半数だったことから、発生原因は検体固有ではなく、検査工程にあると思われた。また、分析した電気泳動データは、DNA検体を用いた精度管理試験由来であることから、発生要因はPCR以降の過程にもあることが分かった。次に、T社試薬BのMaster Mixを使った施設では、非典型的ピークの発生率が他試薬より低かった。試薬Bは試薬Aの改良版であり、特異性が高いPCRを行える特徴を持つため、非典型的ピークの発生率が低くなったと思われた。さらに、電気泳動にT社機種Dを用いた地衛研は8施設あったが、非典型的ピークは起きていなかった。機種Dは、試薬及びキャピラリーがカートリッジ式であり、利便性が高いと言う利点があるが、その反面、試薬やキャピラリーの種類を変えられない。ポリマーとしてT社機種DではPOP-1が採用されており、それ以外の機種ではPOP-7が使われていた。機種Dのキャピラリーは28 cmであり、それ以外の機種のキャピラリーより短かった。しかし、メーカーのT社が公開している情報では、ポリマーやキャピラリーの種類と非典型的ピーク発生との因果関係は示されていない。また、機

種Dにノイズの検出を抑える機能があるとは示されておらず、機種Dで非典型的ピークが観察されなかった原因は不明である。また、サンガーシーケンサーで電気泳動した際、ピークの高さでPCR産物の定量はできないが、産物量が多い程、ピークが高くなる傾向にある。PCR産物の希釈率が50倍未満と100倍以上との非典型的ピークの発生率には差が無かったことから、当該ピークの検出と希釈率には関係が無いことが示された。なお、本研究班では、EHEC菌株を用いた精度管理試験を実施したが、原因不明の非典型的ピークの発生は見られなかったため、菌株分離からDNA抽出まで工程における当該ピークの発生原因は分析できなかった。

MLVA法の精度管理試験で把握した情報を基に作成したトラブルシューティング集は、地衛研の検査精度の向上に有効だろう。本トラブルシューティング集の共有は、精度管理試験に正解した施設は勿論のこと、試験に未参加の施設にも有益だろう。本試験で不正解となった2施設の参加者の経験年数は1年以下であり、これは異動による検査技術・知識の承継問題の表れと言える。本トラブルシューティング集は実際の事例を示して、原因や解決法を解説しており、初心者にも分かり易く構成されている。地衛研全体のMLVA法の検査精度向上のためにも、また、経験年数が少ない担当者への技術・知識伝達のためにも、今後、トラブルシューティング集を用いた研修を行う予定である。

E. 結論

EHEC菌株を用いた精度管理試験を実施したことで、MLVA法を正しく実施できていなかった一部の施設に対して改善法を提案できた。次に、精度管理試験で得られた電気泳動データを、検査情報を基に分析したところ、非典型的ピークの発生に関する要因を推測できた。最後に、精度管理試験で把握した情報を基に作成したトラブルシューティング集は、地衛研の検査精度の向上に有効なコンテンツである。

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) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 3) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 4) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40(5): 83-85, 2019
- 5) 明田ら, 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)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」, 43-62, 2023
- 6) 高崎ら, 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)総括研究報告書「地方衛生研究所における感染症等による健康危機の対応体制強化に向けた研究」, 1-5, 2022
- 7) 秋田ら, 腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック(0157、026、0111編), 1-3, 2018
- 8) 国立感染症研究所 細菌第一部, 参考資料: 腸管出血性大腸菌感染症調査のためのMLVA法の活用 MLVAの説明、効果、意義、精度等, 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会, 13 March 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

別紙 1

所属：
 担当者：

1. 問題及び回答

検体1～3は腸管出血性大腸菌O157、O26またはO111の菌株です。

検体1～3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数を算出できる遺伝子増幅が見られず、TR数を算出できない非典型的な遺伝子増幅が確認された場合、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。

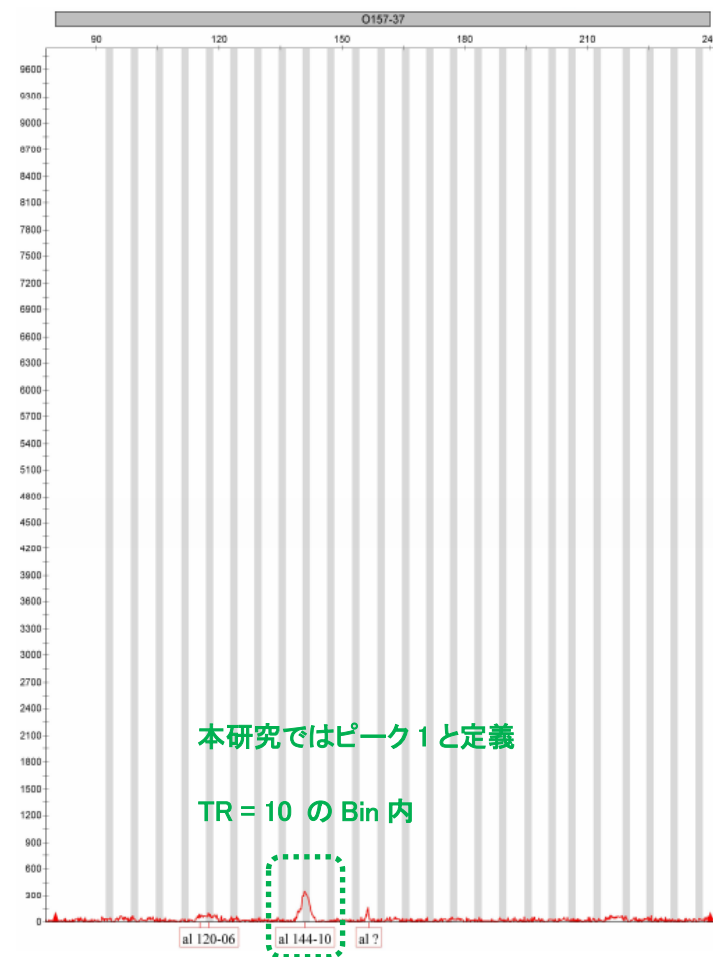
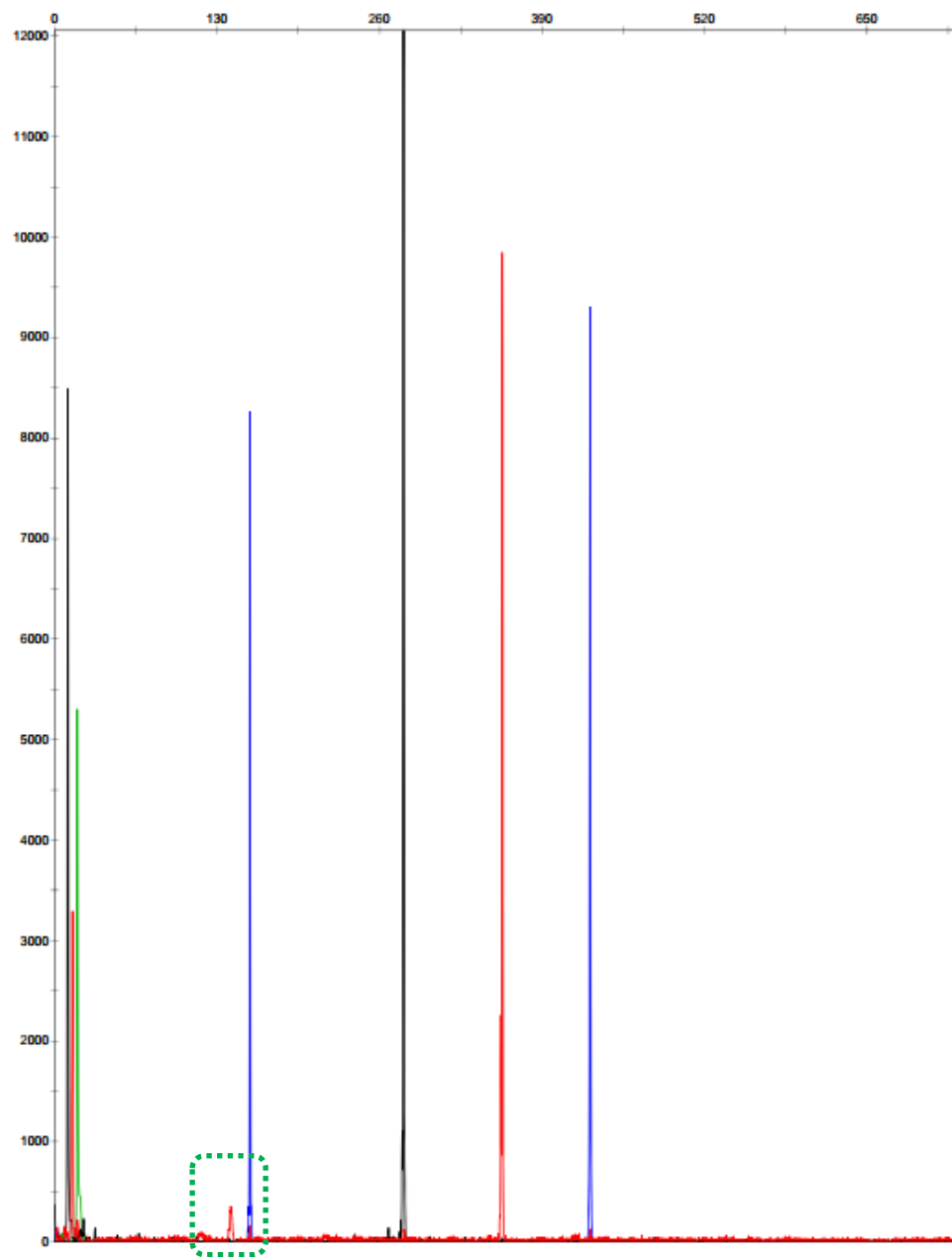
各検体の結果について、詳細に説明したい事がある場合は備考欄にご記入ください。

検体名	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																	

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



本研究ではピーク 1 と定義

TR = 10 の Bin 内

図 2 前身の研究班で実施した MLVA 法精度管理試験において解決できなかった非典型的ピーク

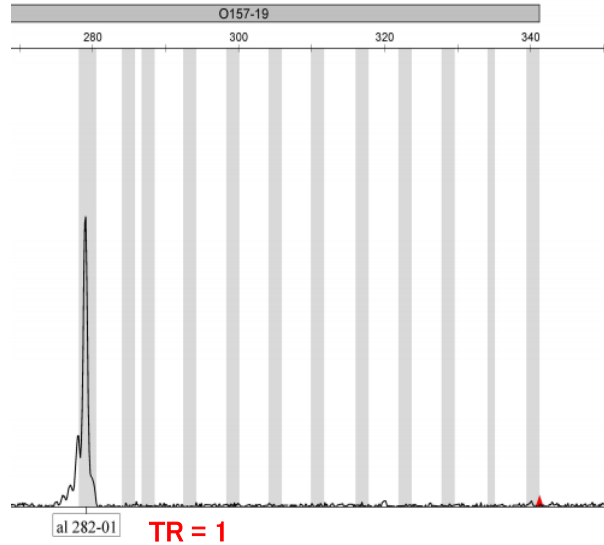
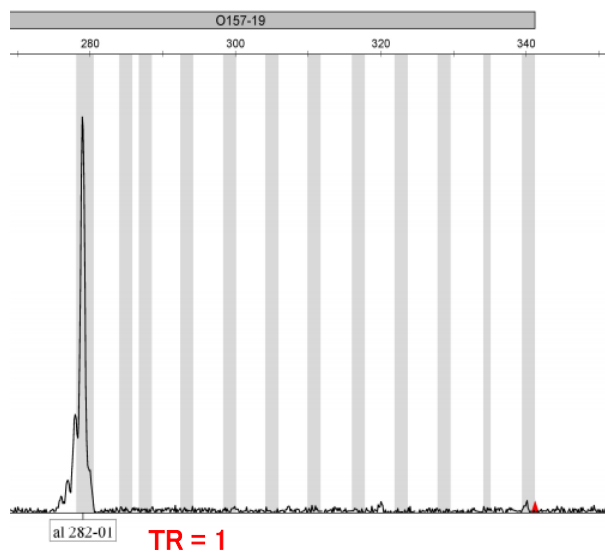
(A) 施設 A

Bin ファイル

検体 2

検体 3

細菌第一部作成



施設 A が使用

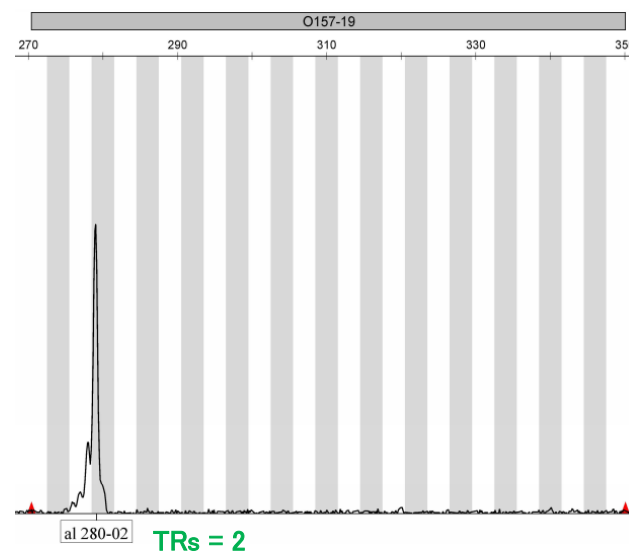
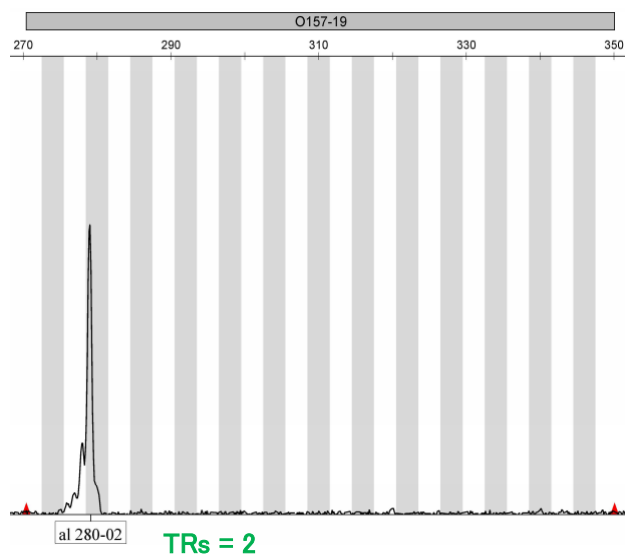


図 3 MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(B) 施設 B

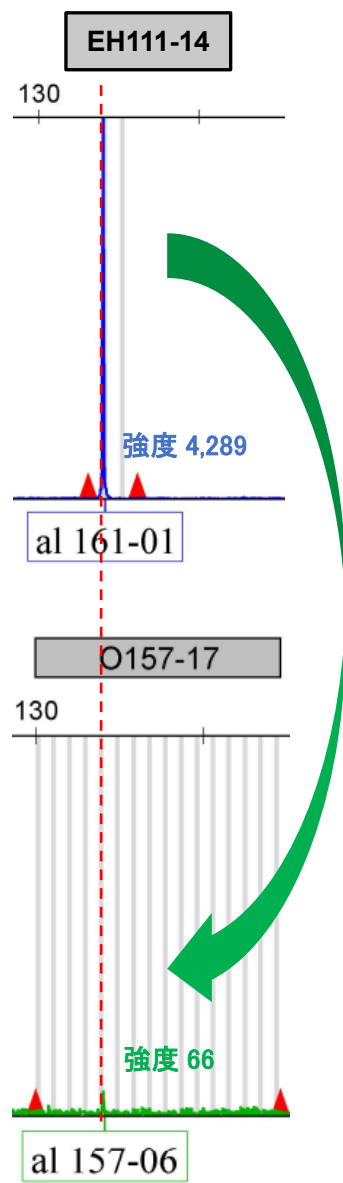


図 3(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(A) 非典型的ピーク 2 の例

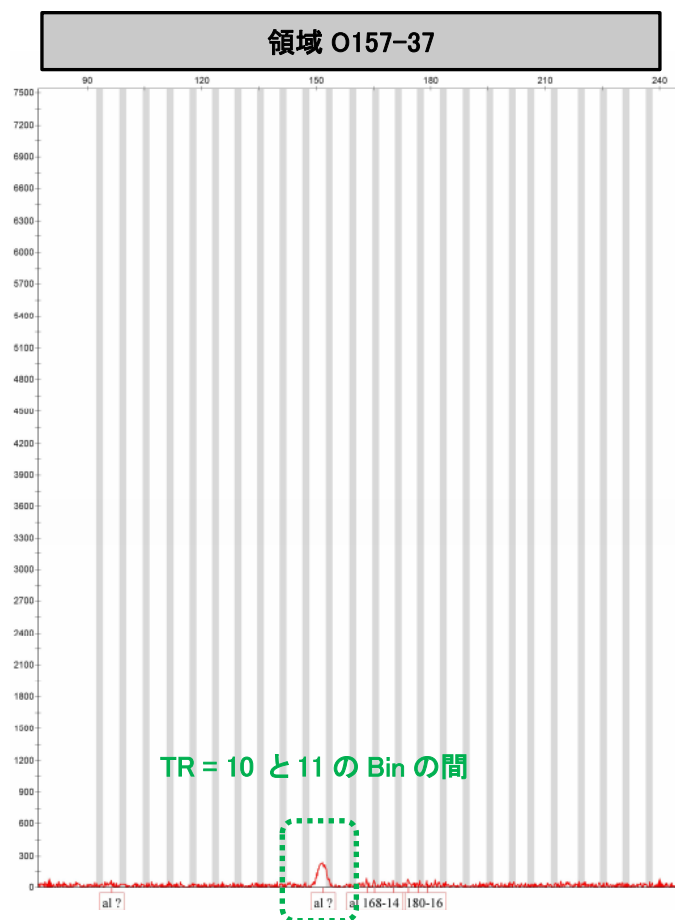
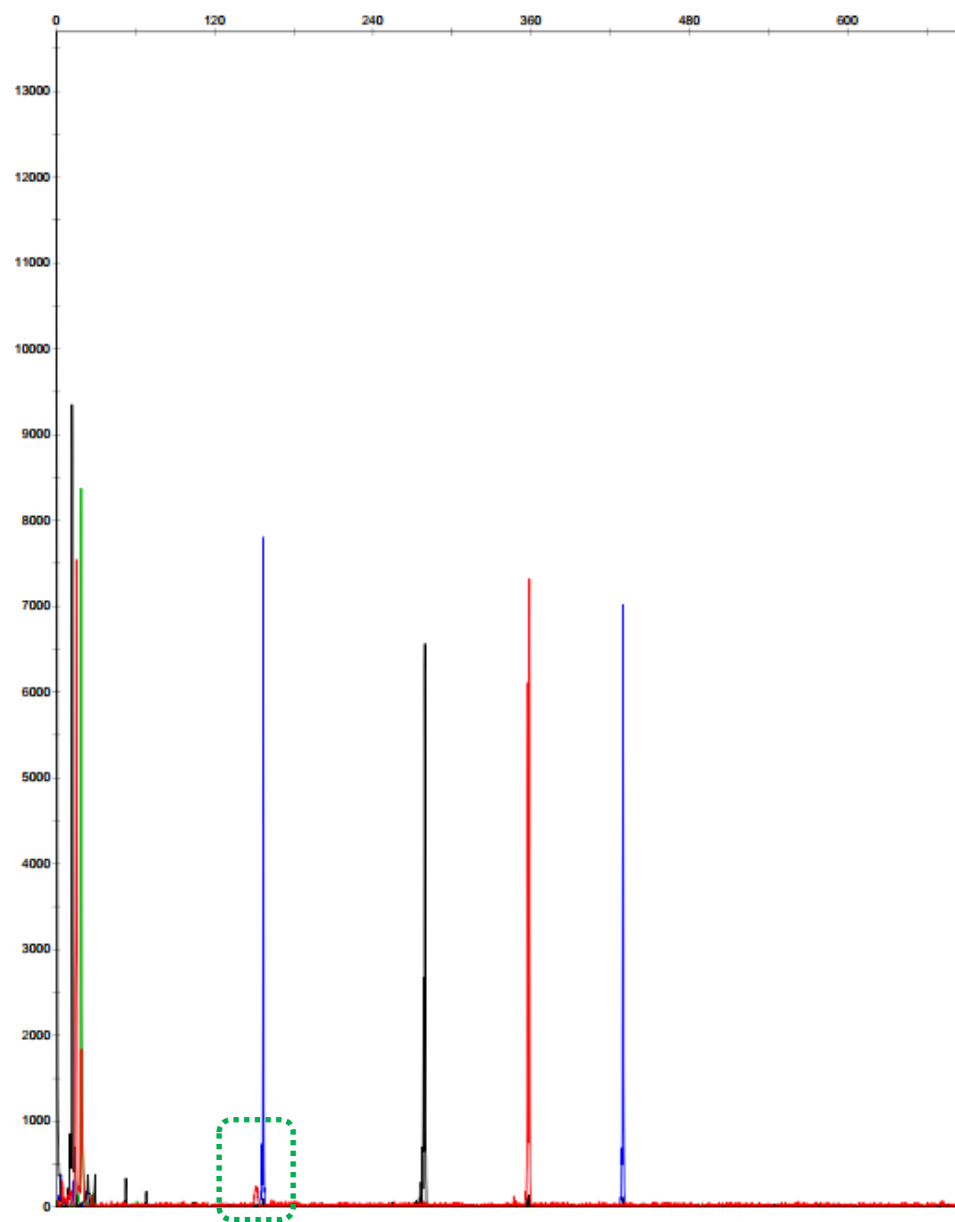


図 4 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

(B) 非典型的ピーク 3 の例

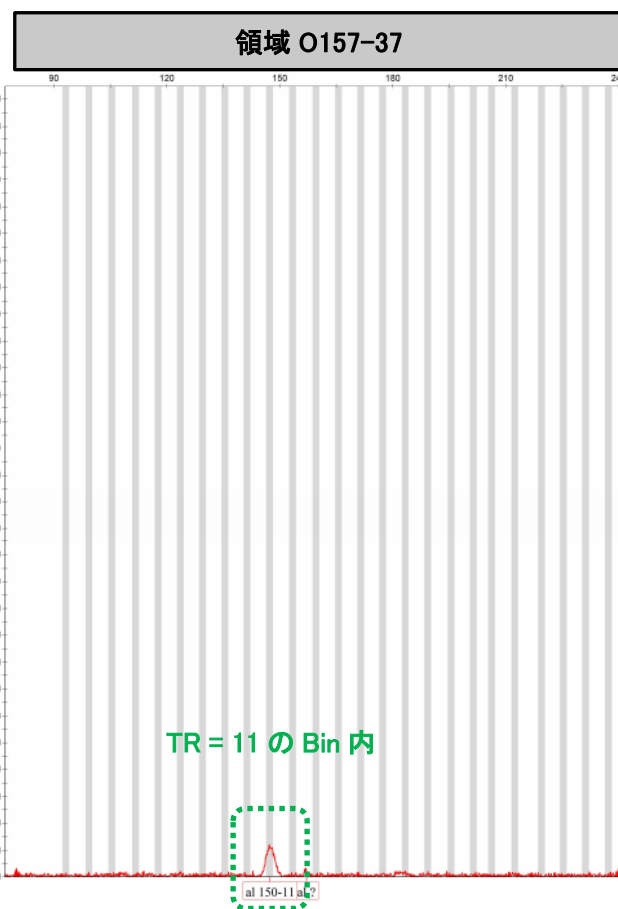
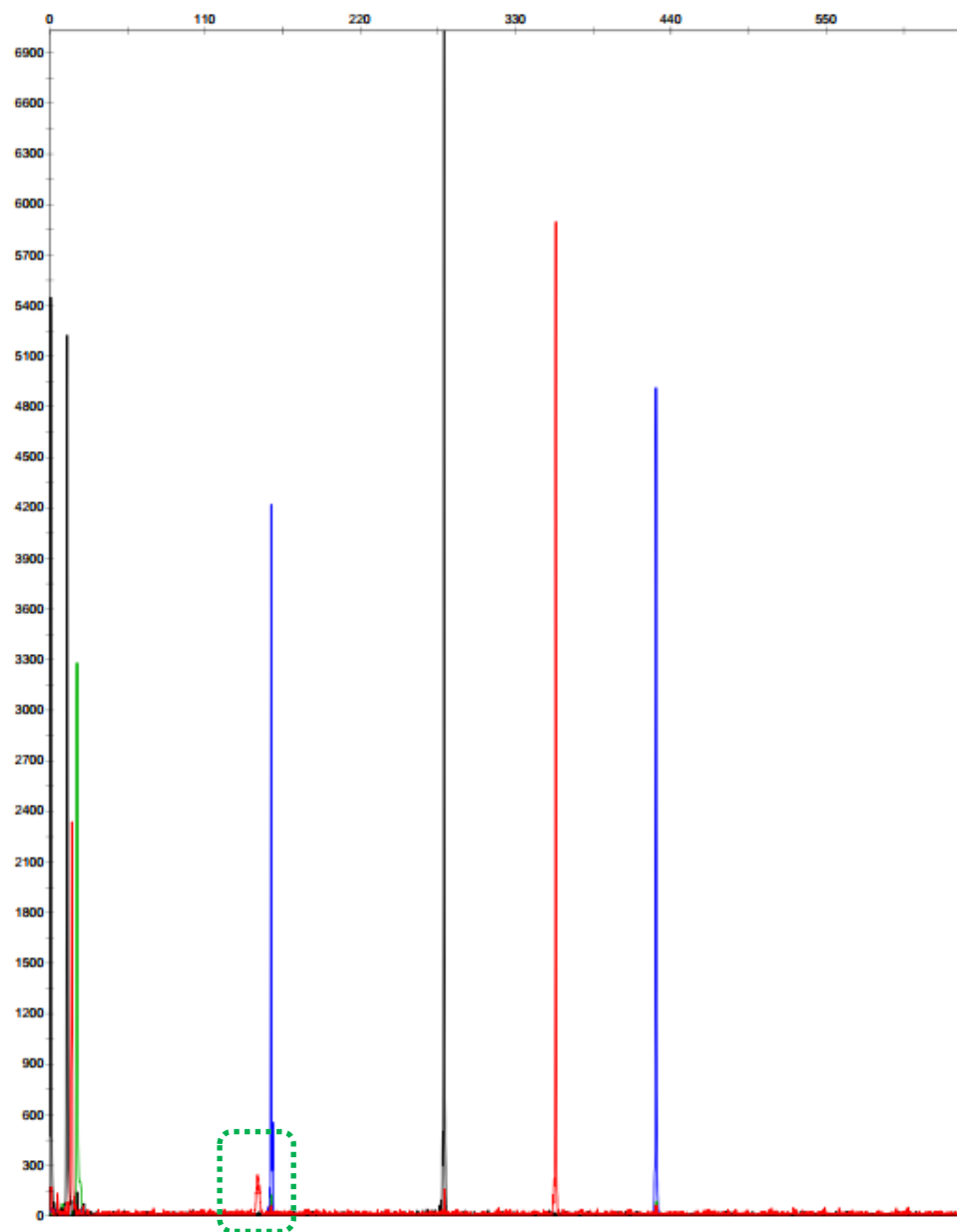


図 4(続き) 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

(C) 非典型的ピーク 4 の例

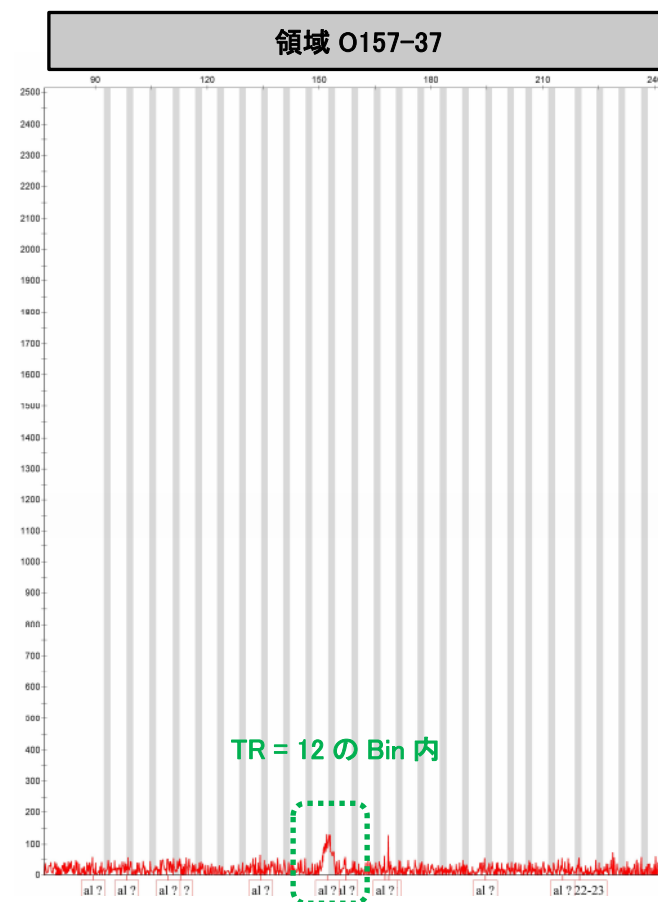
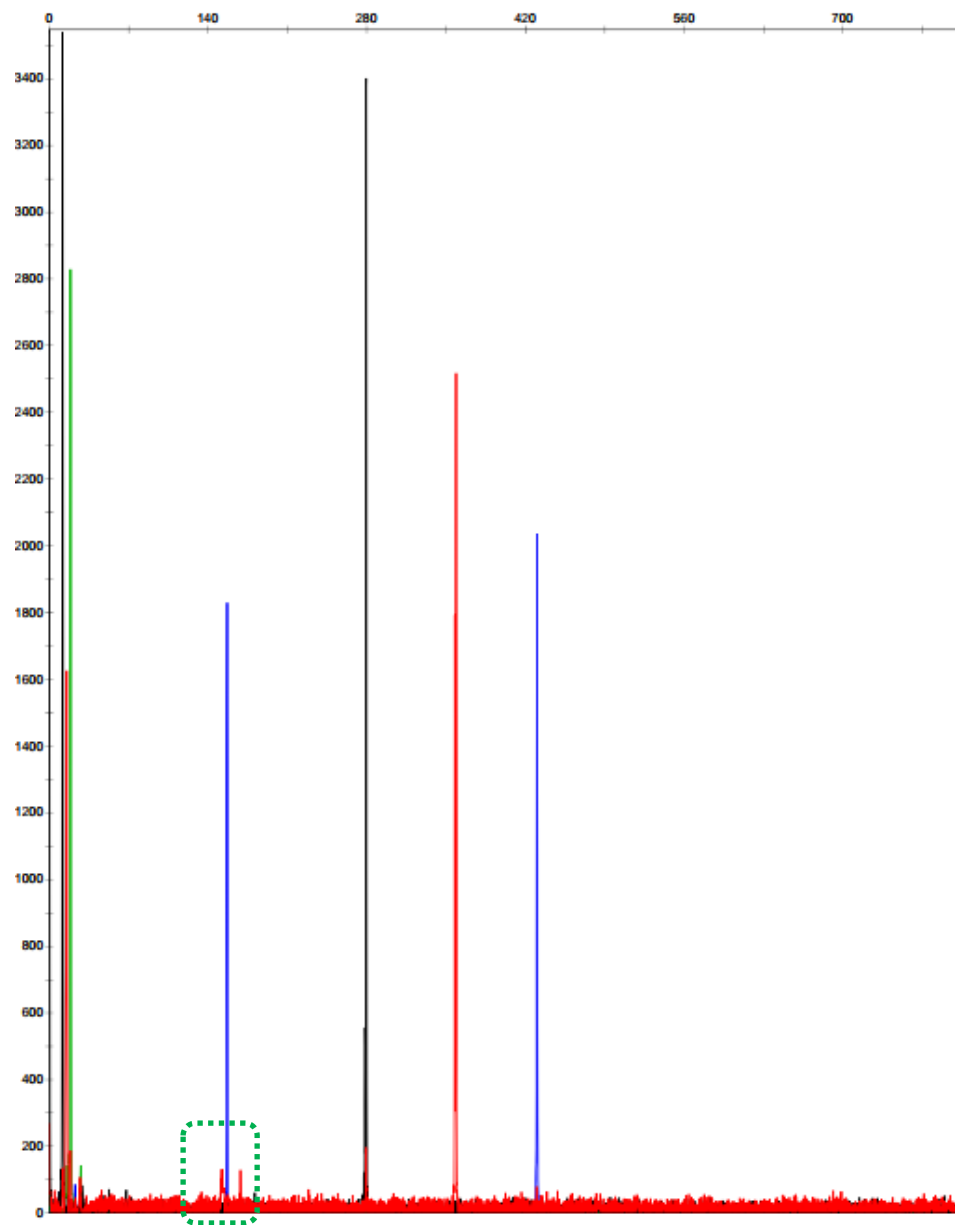


図 4(続き) 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

目次

A : ピークが出ない

- 1 : 電気泳動時のPCR産物の添加ミス/ PCRミクスチャーへの蛍光標識プライマーの添加ミス
- 2 : PCRの失敗

B : Binにピークが入らない

- 1 : Binファイルの調整不足
- 2 : 電気泳動での移動度の変化
- 3 : タンデムリピート(TR)領域のインデル
- 4 : テイルドプライマーの使用

C : 一部のピークが低い

- 1 : プライマーミクスチャーの状態が悪い

D : 非典型的ピークの出現

- 1 : 他の蛍光標識の影響
- 2 : 原因不明

E : 疫学的関連性がない菌株間でのMLVA型の一致

- 1 : 蔓延菌株

図 5 トラブルシューティング集の一部

(B) トラブル事例の解説の例

A-1. 電気泳動時のPCR産物の追加ミス/PCRミクスチャーへの蛍光標識プライマーの追加ミス

1. トラブル概要

PCR産物をシーケンサーで電気泳動すると、ピークが全く検出されなかった。

2. トラブルの原因と解決法

①電気泳動の際、Hi-DHにPCR産物の追加忘れが原因。または、②PCRミクスチャーへの蛍光標識プライマーの追加ミスが原因。
PCRで反応しなかった蛍光標識プライマーのピークが検出されないことから①または②と判断できる。潜水型電気泳動装置 (Mupid等) で電気泳動しても通伝子増幅を確認できれば①で、確認できれば②。

3. 実際の事例

PCRのMixture 1で検出される全てのピークが検出されなかった。

赤字:正しい結果

検体名	TR数(上段)、TR数が判定不能場合の通伝子増幅産物のbp数(下段)																
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH25-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
不正解	2	1	-2	-2	3	-2	-2	-2	5	-2	-2	-2	-2	-2	1	-2	7
正解	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	7

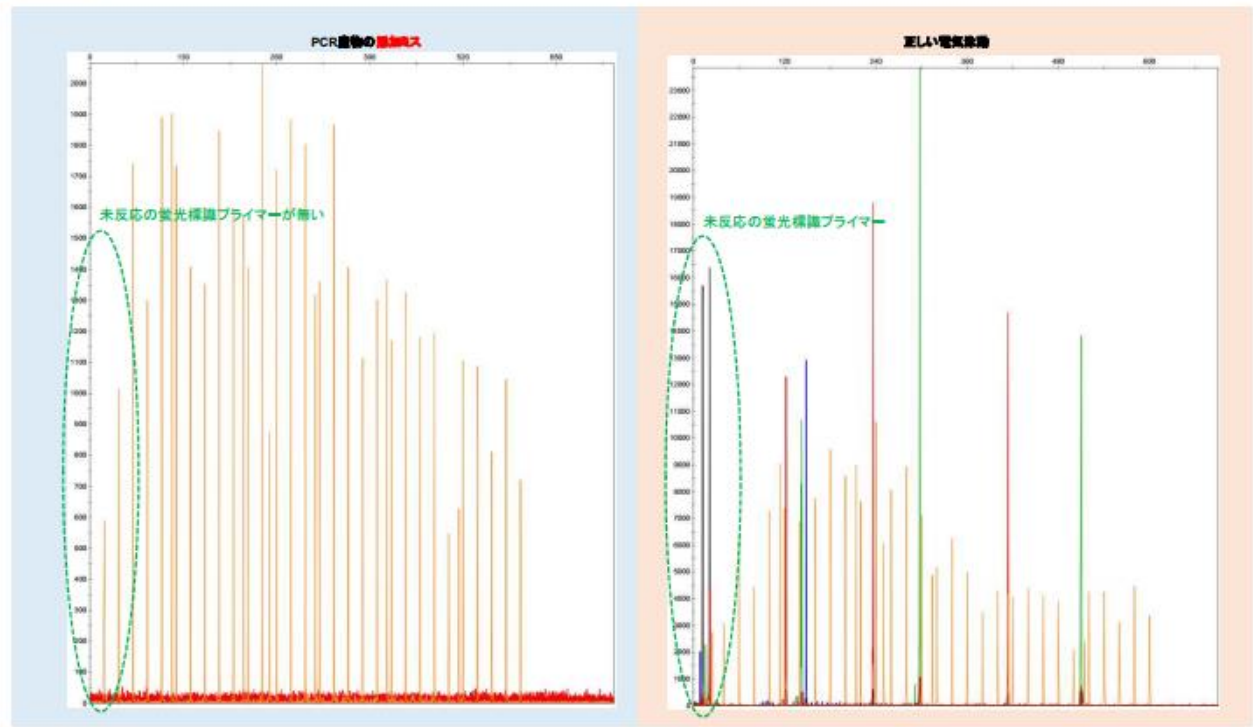


図 5(続き) トラブルシューティング集の一部

表1 本研究で用いたEHEC菌株のMLVA法におけるTRパターン

検体	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	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	5	4	7	9	6
2	O26	2	1	1	2	3	9	16	2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
3	O111	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	9

表2 MLVA法の精度管理試験への申込み状況

支部 ^a	施設 総数 ^b	申込 施設数	申込率(%)
北海道・東北・新潟地区	11	8	72.7
関東・甲・信・静地区	17	15	88.2
東海・北陸地区	7	5	71.4
近畿地区	9	6	66.7
中国・四国地区	11	7	63.6
九州地区	11	8	72.7
全国	66	49	74.2

^a 地方衛生研究所全国協議会の支部。

^b 地方衛生研究所(地衛研)の総数。つまり、都道府県及び政令市の施設数を示す。

表3 MLVA法の精度管理試験の参加施設

支部	受験 施設数	選定条件			受験率(%) ^d
		過去試験に 未参加 ^a	過去試験で 不正解 ^b	導入歴・経 験年数 ^c	
北海道・東北・新潟地区	2	1	0	1	18.2
関東・甲・信・静地区	7	4	3	0	41.2
東海・北陸地区	2	1	1	0	28.6
近畿地区	3	2	0	1	33.3
中国・四国地区	2	1	1	0	18.2
九州地区	5	1	1	3	45.5
全国	21	10	6	5	31.8

^a 前研究班で実施した精度管理試験に未参加であるために選ばれた施設数。

^b 前研究班で実施した精度管理試験で不正解の検体があったために選ばれた施設数。

^c MLVA法の導入歴が2年以下、または参加希望者の経験年数が1年未満だったために選ばれた施設数。

^d 表2の施設総数に対する受験施設数の割合。

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	受験 施設数	正解 施設数	不正解 施設数	不正解施設名 (不正解検体 No.)	不正解施設の MLVA 法 の導入歴 ^a (経験年数 ^b)
北海道・東北・新潟地区	2	1	1	施設 A(2、3)	0(0)
関東・甲・信・静地区	7	7	0	-	-
東海・北陸地区	2	2	0	-	-
近畿地区	3	3	0	-	-
中国・四国地区	2	2	0	-	-
九州地区	5	4	1	施設 B(3)	2(1)
全国	21	19	2	-	-

^a 不正解の検体があった施設におけるMLVA法の導入年数。

^b 不正解の検体があった施設からの精度管理試験参加者の経験年数。

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
2	2	1	1	2	3	9	16	2	-2	-2	1	9	2	-2	<u>2</u>	-2	-2
3	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	<u>2</u>	-2	9

^a 不正解の回答を下線で表示した。

(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
3	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	<u>6</u>	1	-2	9

^a 不正解の回答を下線で表示した。

表6 非典型的ピークの発生と検査工程の関係

(A) PCR 時の DNA の希釈

DNA 希釈	非典型的ピーク ^a					合計 (発生率(%) ^b)
	1	2	3	4	無し	
希釈有り	0	0	2	0	2	4(50.0)
希釈無し	2	3	6	1	14	26(46.2)

^a いずれかの非典型的ピークが発生した施設数、またはいずれも発生しなかった施設数。

^b 合計に対する非典型的ピークが発生した施設

(B) PCR での Master Mix の種類

Master Mix	非典型的ピーク					合計 (発生率(%))
	1	2	3	4	無し	
T 社試薬	1	1	3	0	4	9(55.6)
Q 社試薬 A	1	2	3	1	7	14(50.0)
Q 社試薬 B ^a	0	0	2	0	5	7(28.6)

^a Q 社試薬 A の改良版の試薬。

(C) PCR の条件変更

PCR 条件	非典型的ピーク					合計 (発生率(%))
	1	2	3	4	無し	
ハンドブック ^a	2	3	5	1	13	24(45.8)
それ以外	0	0	3	0	3	6(50.0)

^a 腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック(O157、O26、O111 編)の PCR 条件 ⁷⁾。

表6(続き) 非典型的ピークの発生と検査工程の関係

(D) サンガーシーケンサーの種類

シーケンサー	非典型的ピーク ^a					合計 (発生率(%) ^b)
	1	2	3	4	無し	
T 社機種 A ^{c, d}	0	1	0	0	0	1(100.0)
T 社機種 B ^{c, d}	2	2	4	1	7	16(56.3)
T 社機種 C ^{c, d}	0	0	3	0	1	4(75.0)
T 社機種 D ^e	0	0	0	0	8	8(0.0)
H 社機種 ^f	0	0	1	0	0	1(100.0)

^a いずれかの非典型的ピークが発生した施設数、またはいずれも発生しなかった施設数。

^b 合計に対する非典型的ピークが発生した施設の割合。

^c 機種 B は機種 A の上位機種であり、機種 C は機種 B のさらに上位の機種。

^d 参加施設では POP-7 ポリマー及び 50 cm キャピラリーを使用していた。

^e 試薬及びキャピラリーがカートリッジ式であり、利便性が高い機種。POP-1 ポリマー及び 28 cm キャピラリーが採用されている。

^f 参加施設では POP-7 ポリマー及び 36 cm キャピラリーを使用。

(E) 電気泳動時の PCR 産物の希釈率

PCR 産物の希釈率	非典型的ピーク					合計 (発生率(%)
	1	2	3	4	無し	
50 倍未満	1	1	4	0	8	14(42.9)
50 倍以上 - 100 倍未満	0	0	1	1	0	2(100.0)
100 倍以上	1	2	3	0	8	14(42.9)

別紙 3

厚生労働科学研究費（食品の安全確保推進研究事業）

広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究

離島コホート研究

研究分担者 大西 真 沖縄県衛生環境研究所 感染症研究センター 室長

協力 沖縄県衛生環境研究所 久手堅 剛、平良 遥乃

研究要旨

沖縄県の EHEC 感染症の発生動向の詳細分析を行った。市町村ごとに詳細に解析することで沖縄県 EHEC 感染症の発生頻度が高い市町村を見出した。それら市町村のウシ飼養頭数およびウシ飼養戸数との関連から、地域におけるウシ飼養と EHEC 感染症とのなんらかの関連がある可能性が示唆された。EHEC 感染症高頻度市町村のうち 2 地域を選定し、それぞれの地域のウシ糞便を収集する体制を整えた。まず、1 地域各 50 検体を収集し増菌培養後 VT 遺伝子陽性率を求めた（A 市 12%、B 市 52%）。VT 遺伝子陽性 32 検体から計 13 株の EHEC 株が分離された。ウシ糞便検体は研究班内で共有し、自施設と共通して 7 株が分離された。6 株は自施設のみで分離された。一方で我々が分離できなかった 4 株が国立感染症研究所および宮崎大学で分離された。検体の共有化により、分離率が向上することが認められた。引き続きウシ分離株を収集し、ヒト由来株のゲノム比較解析を進めていくことで沖縄県の EHEC の原因分析につながる可能性がある。

A. 研究目的

EHEC 感染症、食中毒事例の原因となる EHEC 菌株の原因食材等の究明は、EHEC 感染症発症に必要な菌数が非常に少ないこと等から探索が困難である。そのため、EHEC 菌株の分離を伴う感染源の同定や発症と原因食材等との関係性など、明確な理解に至っていない。そこで、本分担研究では、沖縄県内の離島をフィールドとして離島コホート研究を実施する。

B. 研究方法

沖縄県の EHEC 感染症の発生動向の解析

2006 年から 2022 年に報告された EHEC 感染症について、発生届に記載された患者住所、分離 EHEC 血清群情報、備考等に基づいて、同一事例（家族、保育・養育施設、職場等）症例

を推定した。居住地情報に基づいて人口（2017 年人口）10 万人あたりの市町村の EHEC 感染症報告事例数を求めた。

ウシ飼養数と EHEC 感染症事例数との関連を検討するために、令和 3 年 12 月末家畜・家きん等の使用状況調査結果（沖縄県 H P 掲載）を利用し、各市町村人口 1000 人あたりのウシ飼養頭数、ウシ飼養戸数を求め利用した。

2 つの異なる離島において協力関係を構築後、2023 年 5 月から 10 月に A 地域及び B 地域において、ウシの糞便各 50 検体合計 100 検体を収集した。

検体の増菌培養：ウシの糞便 1 白金耳量を緩衝ペプトン水（BPW）および mEC 培地に接種し、それぞれ 37℃、42℃で一晩培養した。

リアルタイム PCR による VT（ベロ毒素）遺

伝子スクリーニング：培養液をボイルし DNA を抽出後、ペロ毒素検出リアルタイム PCR を実施した。

EHEC 分離：リアルタイム PCR で陽性となった培養液を X-MG 培地及びクロモアガー STEC 培地に接種し、増菌培養と同じ温度で一晩培養した。

発育したコロニーからアルカリ熱抽出により DNA を抽出し、ペロ毒素及び O 抗原遺伝子 (O157, O111, O103, O26, O145, O165, O121) 検出コンベンショナル PCR (MP1 Plus) を実施した。

ペロ毒素もしくは O 抗原遺伝子陽性となった菌株を LB 培地にて純培養し、グリセロール加 TSB にて -80°C で保存した。

(倫理面への配慮)

C. 研究成果

EHEC 感染症の発生頻度の市町村比較

2006 年から 2022 年の期間において、439 例の報告があった。散発例を含む事例数としては 270 事例であり、沖縄県の人口 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は 1.76 であった。沖縄県 41 市町村ごとの 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は、0-9.1 の範囲でばらつきが多かった。人口 4000 人未満の 12 町村では解析期間において報告はみられなかった。人口 4000 人以上の 29 市町村の 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は、中央値 0.58 (平均 1.29) であり、10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数が 1 未満の市町村が 29 のうち 22 存在した。平均値以上の値を示す市町村は 5 市町村と限定的であった (図 1)。これら 5 市町村はいずれも、沖縄島とは異なる離島に存在する市町村であった。

ウシ飼養数・飼養戸数の市町村比較

人口 2000 人以上の各市町村の人口 1000 人あたりウシ飼養数およびウシ飼養戸数と EHEC 感染症事例数 (人・年あたり) の関連を図 2 に示した。EHEC 感染症事例数が平均値以上の値を示す 5 市町村は、A 市を除いて EHEC 事例数の多い順に、人口あたりウシ飼養頭数が多かった。一方で、A 市も含めた 5 市町村は、ウシ飼養農家の人口あたりの戸数は多かった。

A 市および B 市で飼養されるウシの EHEC 保有率

ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いた増菌培養液から DNA を抽出し、ペロ毒素検出リアルタイム PCR を実施した結果、100 検体中 32 検体で VT 遺伝子が検出された。VT 遺伝子陽性検体から VT 保有菌株の分離を試みた。その結果、13 株の EHEC が分離された。A 市は 50 検体中 6 検体 (12%) が VT 遺伝子陽性、うち 2 検体から 2 株 (4%) の EHEC 株が分離された。B 市は 50 検体中 26 検体 (52%) が VT 遺伝子陽性、うち 11 検体から 11 株 (22%) の EHEC 株が分離された。その内訳を表 1 に示した。

O-genotyping についての結果としては、Og157 および Og111 が 3 株分離されたが、10 株は MP1 Plus を用いた PCR ではいずれの O 群陽性シグナルを得ることができず、Og- という判定となった。つまりヒトから分離される EHEC の頻度の高い 7 つの血清群ではないことが示された。

VT1 陽性株が 5 株 (46.2%)、VT2 陽性株が 9 株 (69.2%)、うち両毒素遺伝子陽性株は 1 株であった。eae 遺伝子陽性株は 6 株 (46.2%) 存在した。

ウシ糞便検体は国立感染症研究所 (伊豫田ら) ならびに宮崎大学 (井口ら) に供与し、それぞれ EHEC 分離を試みることで沖縄県衛生環境研究所における分離方法の妥当性を確認した。

その結果、沖縄県衛生環境研究所で分離された EHEC13 株のうち、7 株は国立感染症研究所あるいは宮崎大学において分離された。6 株については、沖縄県衛生環境研究所のみで分離された。一方で、国立感染症研究所あるいは宮崎大学で分離された 4 株は沖縄県衛生環境研究所では分離できていなかった。

D. 考察

沖縄県の 41 市町村のうち 15 市町村は離島に存在するが、人口 4000 人以上の離島は 5 市町村のみである。また、10 町村は人口 2000 人以下の町村である。日本の腸管出血性大腸菌感染症は年間 3000~4000 例発生していて、人口 10 万人あたり約 2.4~3.2 程度である。人口 2000 未満の自治体での EHEC 発生頻度は 50 年に 2~3 となると想定される。17 年間の解析においては、人口 2000 人未満の離島からの EHEC 発生報告がないのも人口が少ないことからくる可能性がある。しかしながら、これらの人口の少ない離島自治体のなかにも、ウシ飼養数、ウシ飼養戸数が多い自治体もあることから、それらの島のウシ飼養状態の把握が、今後のヒト症例が発生した際の迅速な対応のためには必要であると考えられた。

今回、人口あたりウシの飼養数および飼養戸数が多い市町村において EHEC 感染症の発生頻度が高い可能性が示された。ただし、その因果関係については不明である。

今回調査地域に選択した A 市、B 市は人口約 5 万人程度である。人口 10 万人・年あたりの EHEC 感染事例は A 市が 8.88、B 市が 3.1 であった。17 年間での平均値での比較であるため、より詳細な解析を R6 年度は実施する予定である。また、A 市と B 市におけるウシ飼養状況も異なる可能性がある。A 市と B 市ともに、肉用牛以外のウシ（乳用牛・闘牛・水牛）を飼養する農家は、肉用牛飼養戸数と比べて

極めて少ない（A 市 619 : 1、B 市 462 : 25）。B 市は 23000 頭以上の肉用牛が使用されていたが、A 市においては 9800 頭程度であった。つまり、B 市においては A 市よりも、1 農家あたりの飼養頭数が多い比較的大規模農家が多いことを示唆する。大規模飼養農家の設置場所と居住地域との関連についても検討する必要があると考えられた。

2023 年のヒト感染事例では B 市における牛舎での作業員（アルバイト）の感染事例が 2 例発生したが、必ずしもそのような事例が多い状況ではない。

今回 100 頭のウシ糞便検体から 17 株の EHEC（STEC）が分離された。これらの分離株は国立感染症研究所細菌第一部と共有し、それぞれの施設で保管することとした。また、ゲノム配列情報は、本研究班分担研究者である九州大学医学部中村らに依頼して取得してもらい、国立感染症研究所細菌第一部、中村ら（九州大学）での共有することにした。菌株およびゲノムデータは解析終了後速やかにナショナルバイオリソースプロジェクト 病原細菌拠点および公的データバンク（DDBJ）への登録を予定している。広く活用できるようにすることで、今後の領域発展に貢献できると考える。沖縄県の EHEC 感染事例由来の株のゲノムデータに関して、本研究班代表明田らと連携して取得を現在進めている。これらヒト由来 EHEC とウシ由来 EHEC との比較解析、さらには沖縄県以外でのヒト症例由来 EHEC との比較解析を同時に進めていく必要がある。

E. 結論

沖縄県の EHEC 感染症の実態の詳細分析を開始した。市町村ごとに詳細に解析することで沖縄県 EHEC 感染症の特徴の一端を明らかにした。また、ウシ糞便から EHEC 株の分離を試み 17%の検体から株分離に成功した。引き

続きウシ分離株を収集し、ヒト由来株のゲノム比較解析を進めていく。これらのデータから沖縄県の EHEC の原因分析につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 1 件

Isolation and whole-genome sequencing analysis of *Escherichia fergusonii* harboring a heat-labile enterotoxin gene from retail chicken meat in Okinawa, Japan. Kakita T, Lee K, Morita M, Okuno M, Kyan H, Okano S, Maeshiro N, Ishizu M, Kudeken T, Taira H, Teruya M, Ogura Y, Akeda Y, Ohnishi M, Microbiol Immunol 2024, 68 115-121. Epub 2024 Jan 20.

2. 学会発表 3 件

沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症

における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真 第 52 回沖縄県獣医学会（2023 年 7 月）

沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真、令和 5 年度獣医学術九州地区学会（2023 年 9 月）、

柿田徹也、李謙一、森田昌知、奥野未来、喜屋武向子、岡野祥、眞榮城徳之、石津桃子、久手堅剛、平良遥乃、照屋盛実、小椋義俊、大西真沖縄県産鶏肉における易熱性エンテロトキシン保有 *Escherichia fergusonii* 汚染実態及びゲノム解析、第 44 回日本食品微生物学会学術総会（2023 年 9 月）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

図1 沖縄県の腸管出血性大腸菌感染症（事例数）

2006 - 2022
n = 270

家族例、集団事例（保育園等）は1とカウントした

市町村ごとの腸管出血性大腸菌感染症報告数

人口10万人・年あたり

左から人口の大きい市町村から順番に並べた

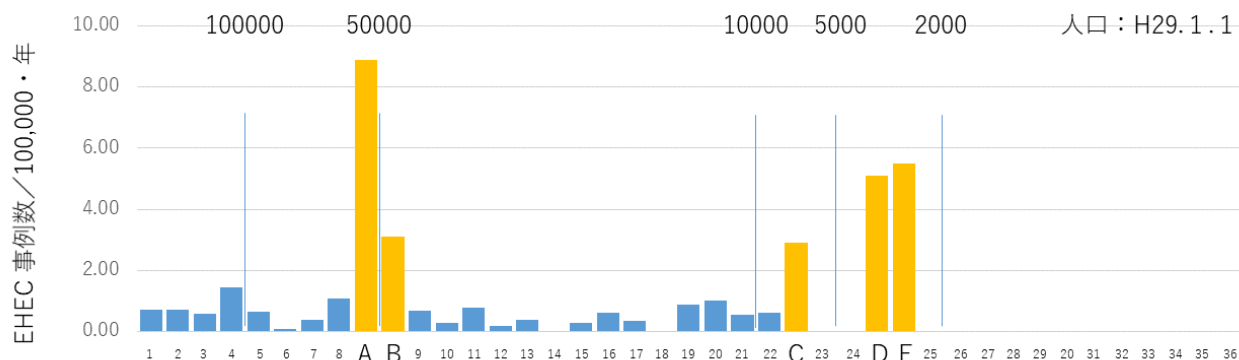


図2 沖縄県の腸管出血性大腸菌感染症（事例数）

市町村ごとの人口10万人・年あたりEHEC事例数と飼養頭数、飼養戸数との関連

人口2000人以上の30市町村

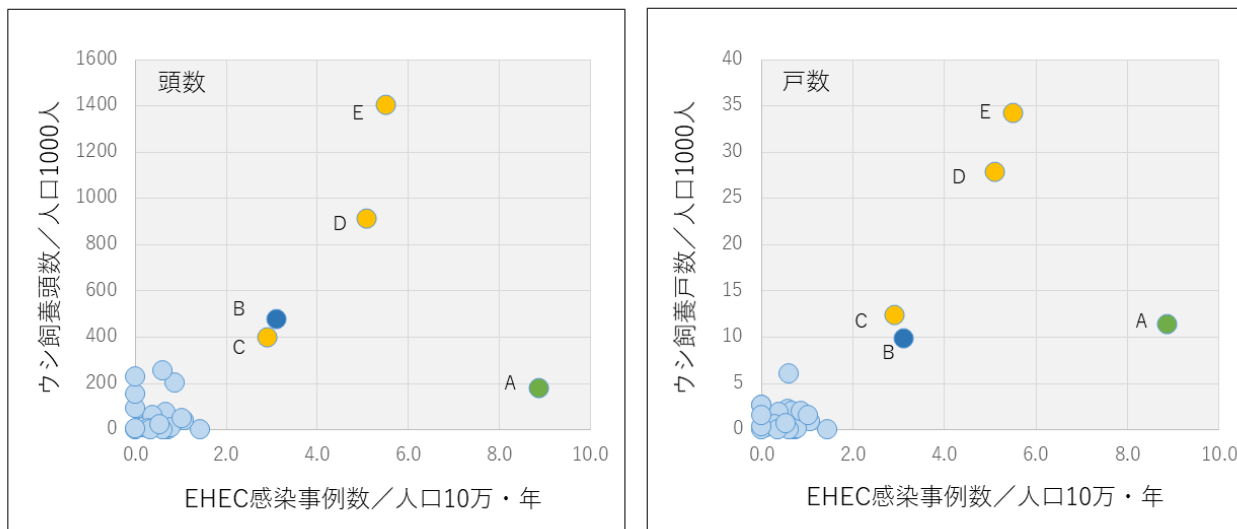


表1 ウシ由来 EHEC 分離株の性状

	O-genotyping	VT1	VT2	eae	No. isolates
A	Og-		VT2	eae	1
A	Og-	VT1		eae	1
B	Og157		VT2	eae	2
B	Og-		VT2		4
B	Og-		VT2	eae	1
B	Og-	VT1	VT2		1
B	Og-	VT1		eae	1
B	Og-	VT1			1
B	O111	VT1		eae	1
A	Og-		VT2		2
B	Og-		VT2		1
B	Og-	VT1			1

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

1. Lee K., Iguchi A., Terano C., Hataya H., Isobe J., Seto K., Ishijima N., Akeda Y., Ohnishi M., and Iyoda S. Combined usage of serodiagnosis and O antigen typing to isolate Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 076:H7 from a hemolytic uremic syndrome case and genomic insights from the isolate. 2024. *Microbiology spectrum* 12:e0235523.
2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2022 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 44 巻、72-73、2023 年 5 月。
3. Kakita T, Lee K, Morita M, Okuno M, Kyan H, Okano S, Maeshiro N, Ishizu M, Kudeken T, Taira H, Teruya M, Ogura Y, Akeda Y, Ohnishi M. Isolation and whole-genome sequencing analysis of *Escherichia fergusonii* harboring a heat-labile enterotoxin gene from retail chicken meat in Okinawa, Japan., *Microbiol Immunol* 2024, 68 115-121.

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5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 広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 細菌第一部・部長 明田 幸宏
- (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		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 6 年 3 月 31 日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 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 5 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 広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究(23KA1005)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究院・講師
- (氏名・フリガナ) 中村 佳司・ナカムラ ケイジ

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 C O I 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 C O I 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 C O I 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5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 広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究
- 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 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。

令和 6 年 3 月 4 日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 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 本間 正充

次の職員の令和5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 広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 廣瀬 昌平・ヒロセショウヘイ

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 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5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 広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 感染症危機管理研究センター・室長
(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)	☐	☒	☐		☐
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6年4月1日

厚生労働大臣 殿

機関名 沖縄県衛生環境研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 渡口 輝

次の職員の令和5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 広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 沖縄県衛生環境研究所・感染症研究センター・室長
(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)	☐	☒	☐		☐
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： COI 管理を委託しているため)
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： 国立感染症研究所)
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。