

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6年度 総括研究報告書

研究代表者 明田 幸宏

令和7(2025)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	研究代表者 明田幸宏
II. 分担研究報告	
1. 2024年度EHEC検出状況とEHECのWGS解析パイプライン構築	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）	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	砂川富正
4. 食品関連サンプル由来株の収集、解析	廣瀬昌平
5. 反復配列多型解析法の研修会の実施、及びトラブルシューティング集の改訂	平井晋一郎
6. 離島コホート研究	大西 真
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	

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6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） 土橋 西紀（国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 加藤 博史（国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 八幡裕一郎（国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 高橋 佑紀（国立感染症研究所 実地疫学研究センターFETP） 後藤 滉平（国立感染症研究所 実地疫学研究センターFETP） 高橋 琢理（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） 佐藤 梢（国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター） 小野 論子（長野県環境保全研究所 感染症部） 松山 満貴（長野県環境保全研究所 感染症部） 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、複数の地方衛生研究所等での試用、フィードバックを得た。その試用を通じた評価および改良から次年度には全国地方衛生研究所への配布を進める予定である。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。またカンピロバクター感染症が原因と推定されるギランバレー症候群（GBS）の発生と食中毒事例の関連性についても事例集積の観点から解析を進めた。

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際の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。また本年度は、高知県で確認された GBS 集積とカンピロバクター食中毒事例について、その関連性を明らかにする目的で解析を実施した。

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目指す。本年度はゲノム解析パイプラインマニュアル作成、複数の

地方衛生研究所等へのゲノム解析パイプラインの試験的配布、そのフィードバック収集を実施し、ゲノム解析パイプラインの精緻化を進める。またゲノム解析パイプラインにおける一塩基多型(SNPs)の検出条件についても検討をおこなった。前年度に研究代表者と共に WGS データを取得した、2021 年および 2022 年に分離された集団食中毒由来の EHEC 菌株のうち、疫学的関連性がある菌株を 3 株以上含む集団(合計 39 集団; 合計 402 菌株)を解析の対象とした。各集団内の菌株間の SNPs の数を以下に示す SNPcaster の標準設定で算出した: i) 参照配列として、EHEC O157:H7 Sakai 株のリピート領域を除いたゲノム配列を指定 ii) 組み替え領域を検出し解析対象から除外する Gubbins プログラム(Croucher NJ, et al. Nucleic Acids Res, 2015) を使用。次に、i) の参照配列を大腸菌 K-12 (MG1655 株) に変更し、MG1655 株のリピート配列を除去しない配列を参照配列として解析を行なった。さらに、ii) Gubbins プログラムを使用しない条件で、Sakai 株あるいは MG1655 株を参照配列として解析を行った。以上の計 4 条件(Sakai 株参照配列・Gubbins 有;MG1655 株参照配列・Gubbins 有;Sakai 株参照配列・Gubbins 無;MG1655 株参照配列・Gubbins 無)で解析した SNPcaster の結果を比較することで、EHEC 菌株に対する SNPcaster の解析基準の検討を行った。

さらに近年、ロングリードシーケンサーが高精度化してきており、その広域食中毒解析における有用性について検討を進めた。公共データベースに完全長ゲノム配列が登録されている O157:H7 Sakai 株 (Accession No. ASM886v2) を対象として、

Sanderson ら (Sanderson ND, et al. Microb Genom, 2024) の方法に従い、ナノポアシーケンサで得られたリード配列のみを用いて、Sakai 株のゲノム配列を決定した。その後、MUMmer (Kurtz S, et al. Genome Biol, 2004) にパッケージされている dnadiff プログラムを用いて、決定した配列を公共データベース上の Sakai 株の配列と比較し、両配列間の差異を確認した。また、高精度なゲノム配列構築に必要なデータ量の検討のため、Rasusa プログラム (doi:10.5281/zenodo.3731394) を用いて、取得した塩基配列データをランダムに抽出した。抽出したデータを用いて、再度ゲノム配列を構築し、公共データベース上の配列との比較を行った。

EHEC 菌株のゲノム配列決定法の効率化を目的として、Sanderson らの方法で用いられていた DNA 抽出キット (Qiagen Genomic Tip 100/G; Genomic-tip) を Promega 社の Wizard® HMW DNA Extraction Kit (HMW kit) に変更し、DNA 精製を行った。DNA 精製過程において、RNA を RNase によって分解する必要があるが、HMW kit に同梱されている RNase では、RNA の分解が不十分であることが明らかとなったため、Invitrogen 社の RNase Cocktail Enzyme Mix を代わりに使用した。また、ゲノム配列構築に用いるプログラムを Hybracter パイプライン (Bouras G, et al. Microb Genom, 2024) に変更した。以上の改良プロトコルを用いて、Sakai 株の DNA を抽出後、ナノポアシーケンシングを行い、得られたリード配列を用いてゲノム配列を構築した。

(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。

本年度においては、前年度および今年度の離島コホート研究によって分離された EHEC および EPEC (計 43 株) を解析対象とした。各菌株を LB 培地で 37℃、一晚培養後、Genomic Tip 20/G (Qiagen) を用いて DNA を精製した。Rapid Sequencing Kit V14 (Oxford Nanopore Technologies; ONT) を用いて DNA ライブラリを調製後、MinION Flow Cell R10.4.1 (ONT) によるナノポアシーケンシングを行った。シーケンシングによって得られた波形データを Dorado v.0.8.3 (ONT; Super accuracy basecalling mode および DNA model v.5.0.0 を使用) を用いて塩基配列に変換 (ベースコール) した。生成された塩基配列データ (リード配列データ) から、Hybracter パイプラインを用いて、ゲノム配列を構築した。43 株のうち 2 株については、NanoFilt v2.8.0 (De Coster W, et al. Bioinformatics, 2018) プログラムを用いて、Quality score (Q score) が 8 あるいは 20 を越えるリード配列を抽出し、ゲノム配列構築に利用した。構築したゲノム配列を用いて、ECTyper v.1.0.0 (Bessonov K, et al. Microb Genom, 2021) プログラムお

よび mlst program v2.23.0 (<https://github.com/tseemann/mlst>; Achtman のスキームを使用)によって各菌株の血清型および Sequence type (ST)を決定するとともに、BLASTN に基づいた方法 (Nakamura K, et al. PLoS Pathog, 2021) によって、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。

(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、地衛研の MLVA 法における検査精度向上を知識及び技術の両面から支援するため、研修会を実施した。また、研修会参加者を対象として、MLVA 法を日常検査で運用する中で生じた質問や問題点を事前に募集し、トラブルシューティング集の拡充を図った。

(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、その分離率が低いとため、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分離された EHEC 菌株について性状解析、遺伝学的解析を進めた。

(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 2023 年に引き続き、沖縄県における人口あたり EHEC 報告数及びウシ飼養数の多い 2 つの離島地域に焦点をあて 2024

年4月から9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。なお、2023年にも同数の検体を収集しており、累計で200検体となった。

加えて、2023年に主に子ウシ舎での業務にあっていた従業員がEHEC感染症(O26, *stxI*)に罹患した農場において、子ウシからの糞便30検体を収集した。その後、検体の増菌培養、リアルタイムPCRによるベロ毒素遺伝子(*stx*)スクリーニング、EHEC分離、*stx*, *eae*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。

*stx*もしくはO抗原遺伝子陽性となった菌株については患者との遺伝的関連を確認するため、MLVA法を実施した。

2023年、2024年に分離された株については、本研究班分担研究者の中村(九州大学)へ送付し、Nanoporeシーケンサーによりゲノム解析を実施し、血清型、*stx* subtype, *eae* typeを決定した。

(食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析)

広域食中毒アラートを検出し、具体的な発出する方法としては、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。

(ギラン・バレー症候群(GBS)とカンピロバクター食中毒事例の関連性評価)

GBS については、2023 年の高知県内における GBS 症例集積事例の全体像の把握や原因の特定を目的に、高知県、国立感染症研究所（感染研）実地疫学専門家養成コース（FETP）、実地疫学研究センターおよび細菌第一部が実地疫学調査および菌株解析を実施し、方法については、まず症例定義を 2020 年 1 月～2023 年 12 月に、高知県内の 4 医療機関において GBS の診断基準である「Brighton の診断基準（レベル 3 以上）」に合致する者とした。各医療機関において後ろ向きに症例情報を収集し、記述解析を行った。また、自治体（保健所・地方衛生研究所）担当者と GBS 症例を診療した医師等へ聞き取り調査を実施した。さらに、上記 GBS 症例と高知県内のカンピロバクター食中毒事例の症例から得られた便検体から高知県衛生環境研究所および高知市保健所で *C. jejuni* 菌株を分離し、感染研細菌第一部で遺伝子解析を実施した。

C. 研究結果

1. ゲノム解析パイプライン構築、評価
ゲノム解析パイプライン（SNPcaster）の解析条件の検討として、2021 年および 2022 年に発生した EHEC 集団食中毒事例から分離された菌株を対象として、SNPcaster 解析を行った。解析セットには、EHEC 主要血清型の 0157:H7 による事例（n=21）のほか、non-0157 として、026:H11（n=8）、0111:H-（n=3）、0103:H2（n=3）などによる事例が含まれていた。SNPcaster の解析では、参照配列（Reference）を含む全ての解析対象株に共通するゲノム領域（core region）に存在する SNPs を抽出する。SNPcaster の標準設定（図 1 左上）において、0157 による事例を解析し

た場合には、事例内の菌株間の core region が 4.2~4.4 Mb であったのに対し、non-0157 による事例では、core region が 3.6~3.8 Mb となったことから、0157 と non-0157 では core region に明らかな差が見られることがわかった。この一方で、参照配列として K-12 MG1655 株を用いた場合、0157 および non-0157 事例における core region の間に著しい差は見られなかった。core region に含まれる組み替え領域を推定し、これを除去する Gubbins プログラムが core region に与える影響を調べた。参照株に 0157 Sakai 株を用いた場合、血清型が同一の 0157 による事例の core region は 1 事例を除いて全く変化しなかったが、non-0157 による事例では、core region に 0.2 Mb 程度の違いが見られた。参照配列として K-12 MG1655 株を用いた場合は、事例にかかわらず、Gubbins を使用することで core region が 0.2 Mb 程度低下した。このことから、SNPcaster で参照株として標準設定されている菌株と血清型のレベルで同一ではない菌株による事例では、参照株と解析株との間に組み替え領域と判定される領域（0.2 Mb 程度）が core region から除去されていることが明らかとなった。

ゲノム解析パイプライン使用マニュアル作成では、コマンド操作の基本、Docker Desktop のインストールを含め、情報解析初心者であってもインストールおよび使用可能なものとした。また、Windows、Mac および Linux 別にソフトのインストール方法を記載し、使用する解析端末の OS を問わず利用可能なマニュアルとなった。これとともに解析パイプラインを、16 自治体および 4 研究機関に配布した。これらの機関は四国・中国地方を除く全ての地方に位置していた。

その使用に関して講習会を対面および Zoom でのハイブリッド形式で開催した。参加者は 14 の機関から、対面で 7 名、オンラインで 20 名以上であった。当日は解析パイプラインのインストール・使用方法に加えて、docker および conda の有償化条件や対処法についての情報提供を行った。また、追加機能の要望などの意見が出された。アンケートは 11 機関から回答を得られた。用いる情報解析端末については、多くの機関 (n = 6) では用いる情報解析端末はプロキシ設定が不要であったが、一部機関で設定が必要であった。そのため、プロキシの設定についても詳細に記述する必要があると考えられた。インストールについては、多くの機関ではマニュアルのみでインストールが可能であった (n = 7)。一方、自力でインストールできなかった機関では、docker のインストールが許可されない設定の解析端末を用いていたことが原因であった。同機関では、docker のインストールするために解析端末を購入した企業のサポートを受ける必要があった。また、メモリやプロキシの確認方法について調査する必要があった機関が存在した。プログラムについては、大部分の機関で全てのプログラムが動作しているとの回答が得られた (n = 8)。1 機関では checkM が動作しない事例が報告された。調査の結果、Windows 上で docker を動作させる際のメモリの割り当てを設定する必要があることが判明した。機能については、全ての機関から必要な機能が揃っていたとの回答が得られた。マニュアルについては、7 機関から「分かりやすかった」との回答が得られた。追加機能については、BLAST 解析や、菌株のリスト化などのプログラムの要望が得られた。

講習会、アンケートおよび個別の問い合わせから、配布プログラムのバグが何点か同定された。そのため、バグ等の情報を Github (https://github.com/leech-rr/SNPcaster/blob/main/SNPcaster_bugs.md) 上で公開し、利用者との情報共有に努めた。

講習会およびアンケート等で得られた意見をもとに、プログラムの修正を行った。まず、上記のバグについての修正を行った。次に、Docker Desktop の有償化に伴い、無償で利用できるソフトウェアとして Rancher Desktop および Docker Engine を標準のソフトウェアとし、マニュアルの改正を行った。また、ソフトウェアのバージョンによって解析結果が異なることから、全てのソフトウェアのバージョンを指定することで、使用端末を問わず同一の結果が得られるようにした。その他に、利用者から要望のあった昨日の修正や追加を行った。

ゲノム解析パイプライン構築と並行して現行のゲノム解析について地方衛生研究所に支援を行った。具体的には、分担研究者(大西)の所属する沖縄県衛生環境研究所を訪問した。当所では解析 PC や使用する主要な解析プログラムの設定は終了していたので、所属研究員にゲノム解析における注意点、具体的には煩雑になる菌株のデータ管理の効率化についてアイデアを提案するとともに、個々の解析プログラムの使用方法や結果の解釈などを、研究員の疑問に答える形で説明した。また、九州地方の衛生研究所の研究員を対象として開催された、ゲノム配列解析の研修会に参加し、「病原細菌の全ゲノム解析とゲノム研究の概要」というタイトルで講演を行なった。研修会に参加したのはゲノム解

析の設備が整っていない研究所に所属する、ゲノム解析の経験のほとんどない研究員であったため、講演では病原細菌のゲノム解析に必要な設備や、将来的な SNPcaster の配布を想定したゲノム解析に関する基礎知識の解説に焦点を当てた。講演終了後にそれぞれの研究員と個別に相談する機会を得ることができたため、ゲノム解析環境構築前の地方衛生研究所の状況に関する情報を収集した。

ロングリードシーケンサーによる解析検討では、サンプル作成から解析に供試できるかの検討を行い、実際にシーケンスデータの質について、ショートリードシーケンサーからのデータと比較した。その結果、解析プログラムの選択が重要とはなるものの概ね染色体およびプラスミドが問題なく構築されていることを確認した。このことから、ナノポアリードを用いたゲノム配列構築において Hybracter パイプラインが利用可能であると考えられた。

2. ゲノム情報収集、データベース拡充化

離島コホート研究によって分離された計 43 の EHEC および EPEC 菌株の完全長ゲノム配列を決定した。DNA 精製に関しては、HMW kit の検討中であったため、Genomic-tip を使用した。この菌株セットには、25 種類の血清型あるいは 24 種の ST の大腸菌が含まれていた。染色体のゲノムサイズは 4.8-5.8 Mb であった。プラスミドを保有していない菌株は存在しておらず、1 つの菌株あたりの保有プラスミド数は 1-11 であった。以上のことから、今回の菌株セットは多様な病原大腸菌を含んでいることが明らかとなり、少なくとも病原大腸菌においては、今回のプロトコルでほぼ確実に完全長ゲノム配列の構築が可

能であることが示唆された。また MLVA 型別とそのデータ蓄積において 3,074 株について分子型別解析を実施した。このうち 2,573 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 97 施設であった。各血清群において同定された型数は、0157 が 810、026 が 169、0111 が 90、0103 が 62、0121 が 15、0145 が 19、0165 が 8、091 が 40 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、延べ 44 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 1300 株であった。

2024 年度は 55 施設から約 1200 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 87%であった。

3. MLVA 法の精度管理

全国の地衛研を対象に MLVA 法研修会を実施した。22 施設の地衛研及び 2 施設の中核市の検査機関から応募があり、選考の結果、最終的に 11 施設から研修会への参加があった。

研修会は予定通り実施され、実習では、Panel 及び Bin ファイルのインポート、ピークのサイジング、Bin の修正、電気泳動データの解析、さらにトラブル事例由来のデータの解釈を行った。研修会の最後には、事前に募集した日常検査における質問や問題点について、全て解説を行ったが、寄せられた質問等は、「ダブルピーク等の複数ピークの判定」、「Bin から外れたピークの判定」、「蛍光強度が低いピークの判定」及び「その他」

の4つに大別された。研修会終了後、研修生全員からのアンケート結果をまとめたところ、「開催時期」及び「Zoomによる講義視聴環境」について、90%以上の評価が得られた。一方で、「MLVA法の新任者として業務を始め、疑問や課題が生じ始めた夏頃の開催でも良かった」との意見もあった。「日数」については、4名が「短い」と回答し、3名が「カリキュラムの変更」を要望した。これら7名の内、6名は、自由記載欄で「GeneMapperによるデータ解析（区分：実習④）等の実習の時間が不足している」と回答した。残る1名からは、「MLVA法の結果を保健所へ適切に説明する方法など、結果の活用方法に関する講義を加えてほしい」との要望があった。

各講義・実習に対する評価では、全ての講義及び実習において、「理解度」及び「業務への活用」について「理解できた」以上の回答が100%、またはほぼ100%だった。その他、各講義・実習について、幾つかの要望があり、講師にフィードバックした。

録画した講義については、編集後に動画配信サイトへのアップロードを予定し、全ての応募施設が視聴できる環境を整える予定である。また昨年度に作成したトラブルシューティング集について、3つの事例及び解決法の追加を行い改訂を実施した。

4. 食品関連サンプル由来EHEC株の収集、解析

食肉処理施設Bから収集された牛糞便由来株9株は、すべて*stx*および*eae*陽性であり、血清型はO157:H7が8株、O182:H2が1株であった（表4）。MLVA型は21m0152、22m0067、22m0603、22m0604、22m0605および24m0510の6種類に分類された。22m

0603および24m0510は、同一農場由来の異なる個体から分離された。O157株のTSIおよびLIM培地での生化学性状判定結果は、一般的な大腸菌と同様に乳糖および白糖分解（+）、ガス産生（+）、リジン（+）、インドール（+）および運動性（+）であった。O182株は、運動性（-）であり、その他の性状はO157株と同じであった。

また牛糞便由来EHEC株が保有するStxサブタイプ遺伝子パターン解析では、保有するStxサブタイプ遺伝子は、O157株では全て*stx2c*単独保有であり、O182株は*stx1a*単独保有であった。食肉処理施設間での菌株の比較では、食肉処理施設A由来EHEC O157株および食肉処理施設B由来EHEC O157株は概ね別のクラスターを形成した。しかし、菌株13および菌株36など一部の菌株はクラスターを超えて混在した。

5. 離島コホート研究

（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培地を用いて培養した増菌液からDNAを抽出し、*stx*検出リアルタイムPCRを実施した結果、2024年に収集した100検体中19検体で*stx*が検出された。*stx*陽性となった検体はすべてB市で収集された検体だった。*stx*陽性検体から*stx*保有菌株の分離を試みたところ、9株のEHECが分離された。2023年と2024年を合わせると、*stx*陽性は、A市100検体中6検体、B市100検体中45検体であり、A市からは2株、B市からは22株が分離された。その内訳を表1に示した。0-genotypingについての結果としては、2024年は、Og157が2株分離されたが、7株

はシグナルを得ることができず、MP1 Plus で推定できる 0 群以外であると判定した (0gNT)。2023 年の結果と合わせると 24 株中 19 株が 0gNT、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。

stx1 陽性株が 2 株 (22.2%)、*stx2* 陽性株が 8 株 (88.9%)、うち両毒素遺伝子陽性株は 1 株であった。*eae* 陽性株は 3 株 (33.3%) 存在した。2023 年と 2024 年の分離株のゲノム解析を実施したところ、0gNT だった 19 株は 13 種類の血清型に分けられ、2 株は 0 型別不能 (OUT) だった。

(EHEC 陽性患者が従事した農場の子ウシの EHEC 保有率とヒト由来株との遺伝的関連) ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いて培養した増菌液から DNA を抽出し、*stx* 検出リアルタイム PCR を実施した結果、30 検体中 22 検体 (73.3%) で *stx* が検出された。*stx* 陽性検体から *stx* 保有菌株の分離を試みたところ、14 検体 (46.7%) から 15 株の EHEC が分離された。その内訳は 0gNT, *stx2* 陽性が 11 株、0gNT, *stx1*, *eae* 陽性が 3 株、0g26, *stx1*, *eae* 陽性が 1 株だった。ゲノム解析を実施したところ、0gNT だった 14 株は 7 種類の血清型に分けられ、0116:H16, *stx2a* 陽性が 7 株だった。なお、0gNT, *stx2* 陽性だった 1 株は現在再度ゲノム解析中である。

このうち、026:H16, *stx1a* について、MLVA を実施したところ、当該農場の子ウシ舎で業務していた EHEC 陽性患者と 17 loci 中 16 loci が一致し、不一致だった loci (0157-9) は 1 リピート違いだった。

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

広域食中毒アラート発出に関する研究について 2019 年から 2024 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)、2024 年 (3／4 回) であった。2024 年の厚生労働省への情報提供回数は 3 回で、2022 年、2023 年と並ぶ件数であった。2024 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。

2024 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 (2024 年 37-38 週) として、0157VT2 が海外渡航者で多い等の疫学的な偏りを認めた。2024 年 9 月 25 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 2024 年 37 週から 38 週にかけて、感染症サーベイランスシステム上では例年を上回る 0157VT2 症例数の増加を認め、特に診断・週 38 週にかけては、明らかに 0157VT2 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)。

7. ギラン・バレー症候群 (GBS) とカンピロバクター食中毒事例の関連性評価

・高知県 GBS 症例の調査結果

2020 年 1 月～2023 年 12 月に計 25 例 (2020 年: 3 例、2021 年: 5 例、2022 年: 4 例、2023 年: 13 例) の GBS 症例が確認された (図)。症例の年齢中央値は 66.0 歳 (範囲: 14-90 歳)、男性が 15 人 (60%) であった。症例 25 例のうち 3 例 (12%) に人工呼吸器装

着が確認され、観察できうる範囲で死亡例は確認されなかった。

2023 年において、幡多保健所管内を除く県内 5 保健所管内で、GBS 症例が確認された。2023 年は 2020～2022 年の症例と比較して、先行症状に胃腸炎を有する者の割合が高く [92% (12/13) vs 50% (6/12)]、*C. jejuni* 便培養陽性もしくは抗体陽性の割合が高く [54% (7/13) [69% (9/13) →54% (7/13) に変更] vs 33% (4/12)]、さらに鶏肉喫食歴（生および加熱不十分な状態の鶏肉を喫食したかどうかまでは不明）を有する割合も高かった [38% (5/13) vs 8% (1/12)]。また、便培養陽性患者（1 例）から採取された菌株の解析から、MLST (multilocus sequence typing) の sequence type (以下 ST とする) -22 であることが判明した。

・高知県内食中毒事例の調査結果

2023 年の食中毒 8 事例 [9 事例 →8 事例に変更] (疑い事例含む) の *C. jejuni* 便培養陽性症例から採取された菌株を解析した結果、6 事例 (75%) [7 事例 (78%) →6 事例 (75%) に変更] の菌株から *C. jejuni* (ST-22) が検出され、これらの事例は県内 4 保健所所管区域内 (安芸・中央西・中央東・高知市) で発生していた。

自治体 (保健所・地方衛生研究所) への聞き取り調査では、*C. jejuni* を含めて、食中毒事例の増加および GBS を引き起こす感染症の流行やイベント等は確認できる範囲で認められなかった。ただし、2023 年に例年と比較して *C. jejuni* による胃腸炎患者数が増加した医療機関が確認された。

D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年より

約 12%減少した。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。この中には食中毒事例関連株、有症苦情関連株も含まれ、厚労省及び各自治体における対応に活用された。

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 1300 株に上った。感染研で行った精度確認では菌株ベースで 87%、遺伝子座ベースで 98%一致しており、昨年度とほぼ同レベルで推移した。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。

病原細菌の WGS 解析では、標準的な解析マニュアルやソフトウェアが存在しないため、用いる手法やソフトウェアの選択に専門知識が必要な場合があった。また、ソフトウェアのインストールや依存関係の解消には、専門知識や手間がかかることが多く、情報解析初心者には困難な場合がある。本研究では、それらを解消するために、docker を利用した解析パイプラインを開発し、試験的な配布を行った。その結果、アンケートの回答が得られた全ての機関でプログラムのインストールや動作が確認された。一方で、マニュアルだけではインストールできなかった事例や、得られた結果の細部が異なっている事例も認められた。いずれの事例についても、原因を特定し、プログラムおよびマニュアルの修正を行うことができた。これらの修正を反映させたプログラムおよびマニュアルについては、次年度 (2025 年度) 中に一般公開を行い、地方自治体の担当者に周知を行う予定である。

細菌の進化の過程では、ファージなどの可

動性遺伝因子の獲得や、染色体内において互いに類似した配列間で相同組み替えが起こることがある。これらに起因する SNPs は突然変異に由来する SNPs とは本質的に異なることから、系統解析において細菌を区別する情報として利用されない。ゲノム解析パイプライン (SNPcaster) で行われる SNP 解析においても、標準設定では、解析対象株に共通するゲノム領域 (コアゲノム配列) から、可動性遺伝因子領域と、Gubbins プログラムを用いて推定された組み替え領域を除去している。しかしながら、様々な年代に、様々な由来から分離された細菌を解析セットに含めることが多い系統解析とは異なり、集団食中毒事例に由来する菌株間の異同を判定する場合は、原因 (食品など) から分離された菌株と患者から分離された菌株の間は遺伝的に著しく近縁であるという仮定に基づいて解析するため、これらの分離菌株間で、可動性遺伝因子の獲得や相同組み替え発生による違いが発生する可能性は低い。実際に、病院内の同一患者から継続的に分離された菌株のセットを用いた解析により、可動性遺伝因子領域や組み替え領域は菌株間の異同の判定に影響をほとんど及ぼさないことが報告されている (Gorrie CL, et al. Lancet Microbe, 2021)。国内の EHEC 集団感染事例の菌株を用いた今回の解析においても、菌株間の最大 SNPs 数は Gubbins プログラム使用の影響を受けなかった。Gubbins プログラムでは複雑な計算が行われるため、解析に使用する PC に与える負担が他のプログラムと比較して大きく、そのため結果の出力に要する時間に著しく影響することがある。地方衛生研究所での用いられる PC の性能によっては、Gubbins プログラムが解析の負担となる可

能性もあるため、SNPcaster 配布時に Gubbins プログラムに関する正確な情報提供が必要であると考えられた。今回、可動性遺伝因子の影響は検討しなかったが、SNPcaster では Sakai 株以外の参照配列を使用する場合は、ユーザー自身が除去すべき領域として可動性遺伝因子を指定することになるため、こちらに関しても可動性遺伝因子領域指定の必要性に関しての状況説明が必要であると思われる。

SNPcaster では、解析したい菌株の WGS をアラインメントするための参照配列が必要であり、標準設定では 0157:H7 Sakai 株が指定されている。今回の解析により、Sakai 株を標準株に選んだ場合に、0157 と non-0157 の集団事例の間で、SNPcaster 解析の出力結果のひとつである core region のサイズに大きな違いがあることが明らかとなった。これは、Sakai 株が 0157 EHEC であることから、Sakai 株と同一血清型の 0157 菌株を解析する場合には、Sakai 株と解析株の間に共有される領域が広がるため、結果的に core region のサイズが大きくなることに起因している。一方、MG1655 を用いた場合には、0157 と non-0157 の core region サイズは大差がなかった。MG1655 は大腸菌の一般的な実験用の株で、非病原性であり、病原性大腸菌とは遺伝的に異なる。このため、今回の解析対象株のいずれとも、同程度の core region (おそらく大腸菌株を SNPcaster で解析した場合の最低限の領域) を確保したと考えられる。プログラムのオプション設定を除けば、参照配列株はユーザーが唯一指定しなければいけないパラメータであり、実際に、九州の衛生研究所職員を対象とした研修会において、参照株には何を選択するべきかと

いう質問を受けた。Sakai 株を設定した場合、解析対象が O157 かそれ以外かで、少なくとも core region のサイズの標準値が異なる。これに対し、MG1655 株では、ほとんどの解析対象で類似した core region となると予想され、その標準値から大きく異なる値が出力された場合は、何らかのエラーを推測できる。また、菌株同士の異同の判定基準となる最大 SNPs について、今回の解析セットでは、Sakai 株と MG1655 株の間に明確な差は確認できなかった。従って、大腸菌に関しては MG1655 株を参照株に設定することをオプションの一つとして提案できると考えられた。

国内の合計 39 の集団事例を用いた解析の結果、疫学的関連性のある菌株間の SNPs 数は 8 以内に収まることが明らかとなった。前年度行った海外事例（計 5 事例）の菌株を用いた解析では、5 SNPs が同一クローン判定のひとつの基準となることが示唆されていた。また、前年度の解析により、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も明らかとなっている。これらのことから、国際的に整合性のある同一クローンの判定基準の候補として、10 SNPs はある程度妥当な数値であると考えられた。

ナノポアシーケンサによって得られる配列はロングリード配列と言われ、イルミナシーケンサによるショートリード配列と比較して、リードあたりの情報量が飛躍的に増加するため、細菌の染色体およびプラスミドのゲノム配列を完全に構築する点において、非常に有用となる。この一方で、ナノポアリードの塩基配列の精度が課題となり、ナノポアリードを使用してゲノム配列を決定する場合にはイルミナリードと併用する必要がある。

しかしながら、近年の技術革新により、ナノポアリードのみで細菌の高精度な完全長ゲノム配列を構築可能であることが報告されている（Sanderson ND, et al. Microb Genom, 2024）。ナノポアシーケンスのための設備に係る費用は、地方衛生研究所に配備されているイルミナシーケンサ (iSeq 100) よりも圧倒的に安価である（現時点の価格で約 150 万円程度）。また、iSeq 100 の販売は 2025 年 9 月末で終了し、システムサポートは 2029 年末で終了することが告知されている。このことから、将来的なイルミナからナノポアへの切り替えの可能性を想定し、ナノポアシーケンサを用いたゲノム配列決定プロトコルを構築しておくことは重要であると考えられる。本研究により、大腸菌に関しては、ナノポアシーケンスのみで精度の高いゲノム配列を安定して構築できることが明らかとなった。DNA 精製において特に多検体を処理する必要がある場合は、HMW kit を利用することで作業を効率的に進めることが可能となるが、Genomic-tip 使用時と同様のゲノム配列を常に構築できるかどうかは、Sakai 株以外の様々な EHEC 菌株を用いて検証する必要がある。また、先述の通り、ナノポアシーケンスには長鎖 DNA が必要であり、長鎖 DNA をいかに調製するかがシーケンスの成否に大きく影響する。長鎖 DNA の調製法は菌種によって異なることが予想されるため、大腸菌以外の食中毒起因菌に関しては WGS データベースの構築に加えて、ナノポアシーケンスを利用する場合は DNA 精製方法を最適化することが将来的な課題のひとつであると考えられる。

本年度の MLVA 法研修会では、参加対象

を明確に定めたことで、ニーズの高い研修を実施することができた。講義及び実習を通じて、学習効果の高い指導が行われたが、一部の实習では時間が不足していたとの意見が見られた。そこで、研修終了後にはデータと模範回答を送付する等のアフターフォローを実施し、理解の定着を図った。これらの結果を踏まえ、時間配分や構成を見直し、今後の研修会に向けた改良版カリキュラムを構築した。

研修会に対して高いニーズの根拠として、全国の地衛研等から 24 施設の応募があった点が挙げられる。参加条件として、MLVA 法の実施経験が 3 年以内の職員を対象としたが、それにも関わらず多数の応募があったことは、地衛研における人事異動が頻繁に行われている実態を反映している。これは、MLVA 法の継続的な技術習得支援が求められていることを示している。本研究班では、GeneMapper の操作や MLVA 法における解析上の課題に対応するため、トラブルシューティング集を作成してきた。これらは実技を伴わないため、技術習得という観点では実習に劣るものの、解析ソフトや機器といったハード面での制約を受けずに活用できる点で、検査精度の向上に有用な教育資材である。特に、地衛研等においては人事異動が頻繁に発生し、経験年数の少ない職員が多く配置される現状がある。そのような状況下では、現場で遭遇するトラブルを自らの経験として蓄積することが難しく、あらかじめ事例と対応策が整理された教材の活用が重要となる。

食品由来株の解析では、国内の食肉処理施設 B から収集された牛糞便由来 EHEC 株 9 株について、血清型、Stx サブタイプ、MLVA 解

析を実施し、施設 A 由来株との類縁関係を明らかにした。施設 B 由来の EHEC 株は主に O157:H7 であり、特に Stx サブタイプ *stx2c* を保有することが特徴であった。一方で、O182:H2 という異なる血清型および Stx サブタイプ *stx1a* を保有する株も確認され、多様な EHEC 株が存在することが示唆された。MLVA 解析結果から、施設 B 由来の EHEC 株は 6 つの MLVA 型に分類され、一部の MLVA 型 (22m0603 および 24m0510) は同一農場由来の異なる個体から分離されていることから、特定の農場において複数の個体間で同一または近縁な株が広がっている可能性が示唆された。MST を用いた MLVA 型の比較では、施設 A と施設 B の EHEC O157 株が概ね別のクラスターを形成したことから、施設の地域あるいは農場ごとに偏りがある可能性が推察された。しかし、一部の株が施設を超えて混在していたことから、MLVA のみの情報で分離地域を特定することは困難であると推察された。

離島コホート研究においては、2024 年は、100 頭のウシ糞便検体から 9 株の EHEC (STEC) が分離され、2023 年の 15 株と合わせて累計 24 株の分離に成功した。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中村 (九州大学) 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 (九州大学) と共有した。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。

EHEC 患者が従事していた農場における子ウシ糞便の *stx* 陽性率は 73.3% と非常に高かった。2023 年に分離されたヒト患者由来株と 2024 年に分離された子ウシ由来株 (O26:H16, *stx1a* 陽性は近縁な系統であることが MLVA により明らかとなり、当該患者はウシから感染したことが疑われた。これらの結果を当該農場主、農場管理獣医師、保健所へ情報共有し、農場従業員へ EHEC 感染症の注意喚起を行った。また、約一年間近縁な系統が農場で維持されていたことから、今後、同農場で、母ウシおよび子ウシから EHEC を分離し、遺伝的系統を比較することで、EHEC の農場内汚染実態の把握と、感染経路の推定を行い、具体的な対策に活かす予定である。

沖縄県のヒトの EHEC 感染症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。

広域食中毒アラート発出は、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。本研究班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する。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、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、2023～2024 年は特筆すべき事例発生としては、2024 年の韓国渡航歴のある生肉喫食に関連した症例であったと考えられた (IASR vol146, No. 5: p17-18)。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) 2024 年 (3 回／4 回) 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、その後回復したものの、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は今後必要である。

今回新たな研究として解析が進められた高知県 GBS 事例とカンピロバクター食中毒

の関連性解析では、2023 年は、GBS 症例が幡多地域を除く高知県内広域で報告された。症例調査から、先行症状に胃腸炎を呈している割合、*C. jejuni* 抗体もしくは便培養が陽性である割合、鶏肉喫食歴（生および加熱不十分な状態の鶏肉を喫食したかどうかまでは不明）を有する割合が 2020～2022 年と比較して高かった。これらの所見は、2023 年において、報告された患者らが GBS 発症に先行して *C. jejuni* に感染していた可能性を示唆している。菌株の遺伝子解析検査では、2023 年に回収された食中毒事例の便培養検体より、*C. jejuni* (ST-22) が高い割合かつ県内広域において確認され、GBS 症例の 1 例からも検出された。*C. jejuni* (ST-22) は、神経細胞表面のガングリオシド構造 (GM1、GD1a、GQ1b/GT1a 等) に対する自己抗体（抗 GM1、抗 GD1a 等）の産生を誘導する傾向のある、LOS (lipooligosaccharide) class A 遺伝子型を有することが多いため、GBS 発症リスクが高い菌株であると考えられている。調査結果より、GBS 発症リスクの高い *C. jejuni* (ST-22) が高知県内広域に分布していたことが、2023 年の県内 GBS 症例数が 2020～2022 年と比較して増加した可能性として考えられる。

制限として、本調査が ecological study であり症例対照研究等は実施しておらず、鶏肉喫食歴については生および加熱不十分な状態の鶏肉を喫食したかどうか区別できていないため、本事例における鶏肉喫食と GBS 発症の因果関係は不明であることから解釈に注意が必要である。また、他のすべての GBS 発症要因を問診・検査等で除外できておらず、他の発症要因との関連性を十分に評価できていない。さらに、*C. jejuni* 感染症は感染症発生動向調査における届出疾患では

ないため、県内の *C. jejuni* 感染症の発生動向そのものが十全に把握されていない。(GBS 解析の上記内容については国立感染症研究所病原微生物検出情報 (IASR) にも掲載済み <https://id-info.jihs.go.jp/surveillance/iasr/45/535/article/040/index.html>)。

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は地方衛生研究所等への配布は目前となり、その普及が今後期待される。また現行型別法である MLVA 法の精度管理をすすめることで、ゲノム解析と比較してより迅速な事例間の関連性解析を進めることが理想的であろう。また、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、複雑な疫学的リンクを明らかにし、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) 誌上発表

1. Matsumoto Y., Lee K., Akasaka R., Honjo H., Koizumi M., Sato T., Kubomura A., Ishijima N., Akeda Y., Ohnishi M., and Iyoda S. Increased resistance against tellurite is

conferred by a mutation in the promoter region of uncommon tellurite resistance gene *tehB* in the *ter*-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7. 2024. Appl Environ Microbiol 90:e0228323.

2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2023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 45 巻、80-82、2024 年 5 月

2) 学会発表

1. 李 謙一、伊豫田 淳、泉谷秀昌、小泉充正、仙田 隆一、菅原 庸、菅井基行、明田幸宏。輸入馬刺しによる食中毒事例に関連した腸管出血性大腸菌 026:H11 の全ゲノム配列解析。第 26 回腸管出血性大腸菌感染症研究会。茨城、2024.

2. 鈴木麻友、瀬戸順次、的場洋平、池田辰也、水田克巳、大貫典子、李 謙一、泉谷秀昌。2023 年の馬刺しによる腸管出血性大腸菌食中毒の原因追究。令和 6 年度東北地区獣医師大会・令和 6 年度獣医学術東北地区学会。2024.

3. 李 謙一。腸管出血性大腸菌における全ゲノム配列解析のサーベイランス等への応用。第 167 回日本獣医学会学術集会。北海道、2024.

4. 李 謙一、伊豫田 淳、泉谷秀昌、小泉充正、仙田隆一、明田幸宏。輸入馬刺しによる食中毒事例株を含む腸管出血性大腸菌 026:H11 流行株の全ゲノム配列解析。第 167 回日本獣医学会学術集会。北海道、2024.

5. 鈴木麻友、瀬戸順次、的場洋平、

池田辰也、水田克巳、大貫典子、李 謙一、泉谷秀昌。2023 年の馬刺しによる腸管出血性大腸菌食中毒の原因追究。獣医学術学会年次大会。2024.

6. 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（2023 年）。第 45 回日本食品微生物学会学術総会、2024 年 9 月、青森県青森市。

7. 泉谷秀昌：細菌性食中毒の概要、発生动向、集団事例、広域事例等について。第 64 回東北ブロック 食品衛生・環境衛生監視員研修会、2024 年 9 月、岩手県盛岡市。

8. 泉谷秀昌：MLVA をはじめとした分子疫学解析と食中毒。令和 6 年度岐阜県食品衛生監視員等研修会、2024 年 11 月、岐阜県岐阜市。

9. 泉谷秀昌：外部精度管理事業（EHEC）。令和 5 年度希少感染症診断技術研修会、2024 年 12 月オンライン。

10. 泉谷秀昌：EHEC 0157、026、0111 の MLVA。令和 6 年度腸管出血の MLVA 研修会、2025 年 1 月、東京都

11. Shouhei Hirose, Hidemasa Izumiya, Yoshimasa Sasaki, Yukihiro Akeda and Yukiko Hara-Kudo: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis genotype diversity, pathogen-related genes and antimicrobial susceptibility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in the same food sample, International Association for Food Protection Annual Meeting 2024, 2024 (令和 6) 年 7 月 15 日、ロサンゼルス。

12. 高橋佑紀、後藤滉平、加藤博史、山本章治、濱田一功、八幡裕一郎、宮地美智子、松

岡智加、清岡有紀、小野邦桜、大森真貴子、
影山温子、下元かおり、泉谷秀昌、島田智恵、
松本一繁、山村展子、川内敦文、明田幸宏、
砂川富正. 高知県におけるギラン・バレー症
候群 (GBS) 症例の集積事例 (2023 年). カンピ
ロバクター研究会. 2024 年 11 月 19 日 (つ
くば市)

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

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

「2024 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 2024 年分離株は 2,573 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 1300 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。そこで、前年度に確立した解析パイプラインを docker プラットフォームを用いて試験的に配布し、評価を行った。地方自治体を主とする 20 機関に配布したところ、大部分の機関でマニュアルのみでインストールが可能であった。アンケートおよび講習会から得られたバグ等について修正を行い、次年度に一般公開を目指す。

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」

(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) 法が血清群統一手法として用いられている。

このような現状から、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。本分担研究では全国の 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、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解析パイプラインの確立と共有化を目的とした。本年度は、前年度に作製した解析パイプラインのマニュアル作製および試験的な配布を行った。

B. 研究方法

1. 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 2024 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 0157、026、0111 については 17 か所、0103、0121、0145、0165、091 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 0157、026、0111) も併せて解析を行った。

2. WGS 解析パイプラインのマニュアル作製および試験的配布

前年度に作製した解析パイプラインをインストールおよび操作するためのマニュアルを作製した。これらのマニュアル、解析パイプラインおよびサンプルデータセットを、希望する自治体等に配布した。

3. 講習会およびアンケートの実施

配布した解析パイプラインのインストールおよび操作方法の講習会を、2024 年 11 月 27 日に国立感染症研究所 戸山庁舎にておこなった。

また解析パイプラインの配布時に同時に配布したアンケート結果の取りまとめを行った。アンケートは、解析に使用した情報解析端末のスペック (OS、CPU 等)、インストールや使用の可否等についての質問を設けた (図 3)。

4. プログラム修正

講習会等での意見交換やアンケートでの回答を踏まえて、解析パイプラインおよびマニュアルの修正を行った。

C. 研究結果

1. 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、3,074 株について分子型別解析を実施した。このうち 2,573 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 97 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 810、O26 が 169、O111 が 90、O103 が 62、O121 が 15、O145 が 19、O165 が 8、O91 が 40 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、延べ 44 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 1300 株であった。

2024 年度は 55 施設から約 1200 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 87%であった。

2. WGS 解析パイプラインのマニュアル作製および試験的配布

マニュアルでは、コマンド操作の基本、Docker Desktop のインストールを含め、情報解析初心者であってもインストールおよび使用可能なものとした（図 1、図 2）。また、Windows、Mac および Linux

別にソフトのインストール方法を記載し、使用する解析端末の OS を問わず利用可能なマニュアルとなった。

解析パイプラインは、16 自治体および 4 研究機関に配布した。これらの機関は四国・中国地方を除く全ての地方に位置していた。

3. 講習会およびアンケートの実施

講習会は対面および Zoom でのハイブリッド形式で行い、参加者は 14 の機関から、対面で 7 名、オンラインで 20 名以上であった。当日は解析パイプラインのインストール・使用方法に加えて、docker および conda の有償化条件や対処法についての情報提供を行った。また、追加機能の要望などの意見が出された。

アンケートは 11 機関から回答を得られた（図 3）。用いる情報解析端末については、多くの機関（n=6）では用いる情報解析端末はプロキシ設定が不要であったが、一部機関で設定が必要であった。そのため、プロキシの設定についても詳細に記述する必要があると考えられた。インストールについては、多くの機関ではマニュアルのみでインストールが可能であった（n=7）。一方、自力でインストールできなかった機関では、docker のインストールが許可されない設定の解析端末を用いていたことが原因であった。同機関では、docker のインストールするために解析端末を購入した企業のサポートを受ける必要があった。また、メモリやプロキシの確認方法について調査する必要があった機関が存在した。プログラムについては、大部分の機関で全てのプログラ

ムが動作しているとの回答が得られた (n = 8)。1 機関では **checkM** が動作しない事例が報告された。調査の結果、Windows 上で **docker** を動作させる際のメモリの割り当てを設定する必要があることが判明した。機能については、全ての機関から必要な機能が揃っていたとの回答が得られた。マニュアルについては、7 機関から「分かりやすかった」との回答が得られた。追加機能については、BLAST 解析や、菌株のリスト化などのプログラムの要望が得られた。

4. プログラム修正

講習会、アンケートおよび個別の問い合わせから、配布プログラムのバグが何点か同定された。そのため、バグ等の情報を Github (https://github.com/leechrr/SNPcaster/blob/main/SNPcaster_bugs.md) 上で公開し、利用者との情報共有に努めた。

講習会およびアンケート等で得られた意見をもとに、プログラムの修正を行った。まず、上記のバグについての修正を行った。次に、Docker Desktop の有償化に伴い、無償で利用できるソフトウェアとして Rancher Desktop および Docker Engine を標準のソフトウェアとし、マニュアルの改正を行った。また、ソフトウェアのバージョンによって解析結果が異なることから、全てのソフトウェアのバージョンを指定することで、使用端末を問わず同一の結果が得られるようにした。その他に、利用者から要望のあった昨日の修正や追加を行った。

D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年より約 12%減少した。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。の中には食中毒事例関連株、有症苦情関連株も含まれ、厚労省及び各自治体における対応に活用された。

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 1300 株に上った。感染研で行った精度確認では菌株ベースで 87%、遺伝子座ベースで 98%一致しており、昨年度とほぼ同レベルで推移した。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。

病原細菌の WGS 解析では、標準的な解析マニュアルやソフトウェアが存在しないため、用いる手法やソフトウェアの選択に専門知識が必要な場合があった。また、ソフトウェアのインストールや依存関係の解消には、専門知識や手間がかかることが多く、情報解析初心者には困難な場合がある。本研究では、それらを解消するために、**docker** を利用した解析パイプラインを開発し、試験的な配布を行った。その結果、アンケートの回答が得られた全ての機関でプログラムのインストールや動作が確認された。

一方で、マニュアルだけではインストールできなかった事例や、得られた結果の細部が異なっている事例も認められた。いずれの事例についても、原因を特定し、プログラムおよびマニュアルの修正を行うことができた。これらの修正を反

映させたプログラムおよびマニュアルについては、次年度（2025 年度）中に一般公開を行い、地方自治体の担当者に周知を行う予定である。

E. 結論

MLVA の導入によって、迅速な菌株情報の集約が実現可能となってきた。食中毒事例等への対応には、MLVA を実施する地衛研での精度維持向上、並びに地衛研―感染研―厚労省―自治体間の連携が不可欠である。

前年度に確立した WGS 解析パイプラインを試験的に配布し、評価を行った。地方自治体でもインストールおよび動作が確認され、本パイプラインの有用性が示された。地方自治体から得られたアンケート等をもとにプログラムを修正し、次年度に本格的な配布を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Matsumoto Y., Lee K., Akasaka R., Honjo H., Koizumi M., Sato T., Kubomura A., Ishijima N., Akeda Y., Ohnishi M., and Iyoda S. Increased resistance against tellurite is conferred by a mutation in the promoter region of uncommon tellurite resistance gene *tehB* in the *ter*-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. 2024. Appl

Environ Microbiol 90:e0228323.

2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2023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45巻、80-82、2024年5月

2) 学会発表

1. 李 謙一、伊豫田 淳、泉谷秀昌、小泉充正、仙田 隆一、菅原 庸、菅井基行、明田幸宏. 輸入馬刺しによる食中毒事例に関連した腸管出血性大腸菌O26:H11の全ゲノム配列解析. 第 26 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 茨城, 2024.

2. 鈴木麻友、瀬戸順次、的場洋平、池田辰也、水田克巳、大貫典子、李 謙一、泉谷秀昌. 2023年の馬刺しによる腸管出血性大腸菌食中毒の原因追究. 令和6年度東北地区獣医師大会・令和6年度獣医学術東北地区学会. 2024.

3. 李 謙一. 腸管出血性大腸菌における全ゲノム配列解析のサーベイランス等への応用. 第167回日本獣医学会学術集会. 北海道, 2024.

4. 李 謙一、伊豫田 淳、泉谷秀昌、小泉充正、仙田隆一、明田幸宏. 輸入馬刺しによる食中毒事例株を含む腸管出血性大腸菌O26:H11流行株の全ゲノム配列解析. 第167回日本獣医学会学術集会. 北海道, 2024.

5. 鈴木麻友、瀬戸順次、的場洋平、池田辰也、水田克巳、大貫典子、李 謙一、泉谷秀昌. 2023年の馬刺しによる腸管出血性大腸菌食中毒の原因追究. 獣医学術学会年次大会. 2024.

6. 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（2023年）。第45回日本食品微生物学会学術総会、2024年9月、青森県青森市。

7. 泉谷秀昌：細菌性食中毒の概要、発生動向、集団事例、広域事例等について。第64回東北ブロック 食品衛生・環境衛生監視員研修会、2024年9月、岩手県盛岡市。

8. 泉谷秀昌：MLVAをはじめとした分子疫学解析と食中毒。令和6年度岐阜県食品衛生監視員等研修会、2024年11月、岐阜県岐阜市。

9. 泉谷秀昌：外部精度管理事業（EHEC）。令和5年度希少感染症診断技術研修会、2024年12月オンライン。

10. 泉谷秀昌：EHEC 0157、026、0111のMLVA。令和6年度腸管出血のMLVA研修会、2025年1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

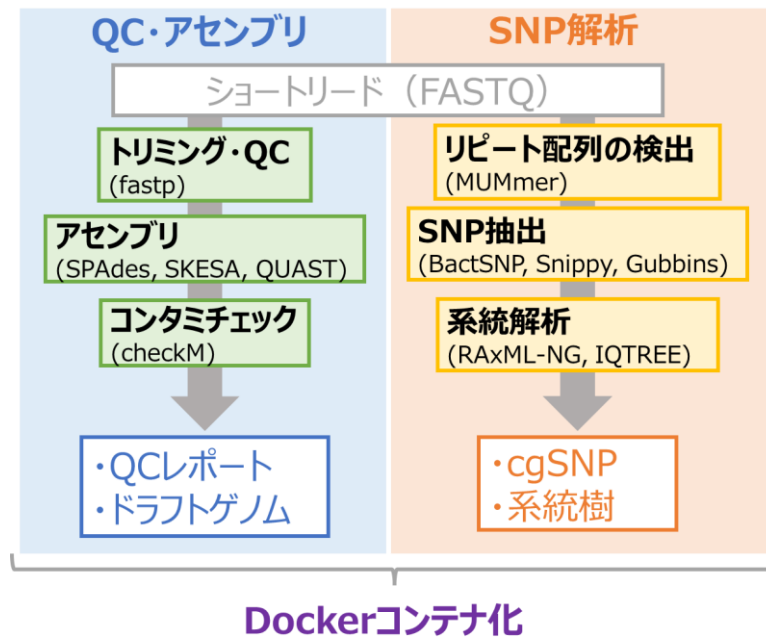


図 1. 解析パイプラインの概要

括弧内は主要なプログラム名を示す。

A

目次

1. 基本的な使い方	5
1.1. コマンド入力アプリ	6
1.2. コマンドライン操作	9
1.3. ディレクトリ説明、移動	9
2. インストール	15
2.1. Docker のインストール	15
2.2. プロキシサーバの設定	15
2.3. SNPCaster-grape_qc_assembly Notebook のインストール	32
2.4. 解析端末への SNPCaster インストール	35
3. 起動・停止方法	38
4. 解析実行手順	40
4.1. フォルダ構成	40
4.2. Jupyter Lab の使い方を学ぶ	41
4.3. プロジェクト作成	44
4.4. 解析の実行	47
5. アップデート(非推奨)	51
5.1. Jupyter Notebook の修正	51
5.2. 解析スクリプトの修正	52
5.3. Dockerfile の修正	53
6. コマンドライン操作	54
7. トラブルシューティング、Q&A	56
今後の検討課題	58

B

1.1.1.3. Linux

上述の Windows と同様に、フォルダ上のコンテキストメニューから「Open in Terminal」で、表示されているフォルダをカレントディレクトリとしたターミナルが開きます。

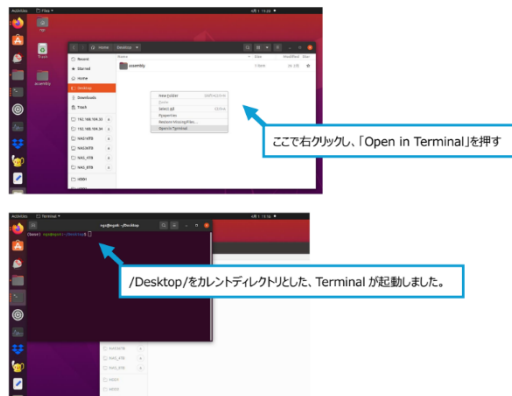


図 2. 解析パイプラインマニュアルの目次 (A) および内容の一部 (B)

1. 選択形式の設問

設問	回答数				
docker pullによるsnpcaster イメージのダウンロードをどこで行 いましたか?	職場の解析端末 (プロキシ設定必要)	職場の解析端末 (プロキシ設定不要なし)	職場の別の端末 (プロキシ設定必要)	職場の別の端末 (プロキシ設定不要なし)	自宅のパソコンで
	2	6	0	1	2
インストール	自力ではインストールでき なかった	マニュアルに書いていないことを調 べる必要があった	マニュアルだけを読んでイン ストールできた		
	1	3	7		
プログラムが動いたか	全てのプログラムが動作し なかった	一部のプログラムが動作せず、解 決しなかった	一部のプログラムが動作せ ず、調べる必要があった	全てのプログラムが問題なく 動いた	
	0	1	2	8	
機能	業務で必要だが、含まれ ていない機能があった	必要な機能は揃っていた			
	0	11			
マニュアル	自力ではインストールでき なかった	マニュアルに書いていないことを調 べる必要があった	分かりやすかった		
	0	4	7		

2. 自由記載の設問

設問	回答
追加して欲しい機能	・菌株リストの作製 ・アノテーション ・アセンブリ結果を1つのフォルダにまとめて欲しい ・MLST ・血清型別 ・病原因子の検索 ・トリミングファイルを残して欲しい
改善して欲しい部分	・系統解析結果をまとめて欲しい ・実行中ログに関する注意事項の追加 ・repeatsファイルが移動してしまう ・データ解釈について学べる機会が必要

図 3. 解析パイプラインアンケート結果

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

本研究班では、1) 反復配列多型解析法（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腸管出血性大腸菌（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を担っている。本年度は、2021年および2022年に国内で発生した集団食中毒事例（計39事例）に由来するEHEC菌株を対象に、WGS解析パイプラインによる解析結果を精査することで、本ツールの解析基準を詳細に検証すると共に、集団感染感知の基準となる指標を決定した。また、沖縄県衛生環境研究所で行われているゲノム解析の環境構築をサポートすると共に、九州地方の複数の衛生研究所から参加した研究員に対して、細菌のゲノム解析に関する情報提供を目的とした講演を行なった。さらに、ナノポアシーケンサのみを利用したEHEC菌株のゲノム構築に関する検討を行い、ナノポアシーケンサによる効率的な大腸菌の完全長ゲノム配列決定プロトコルを確立した。このプロトコルを用いて動物（牛）由来のEHECおよび腸管病原性大腸菌（EPEC）の完全長ゲノム配列を取得した。

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、これを実際の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) ゲノム解析パイプライン（SNPcaster）における一塩基多型（SNPs）の検出条件に関する検討

前年度に研究代表者と共にWGSデータを取得した、2021年および2022年に分離された集団食中毒由来のEHEC菌株のうち、疫学的関連性がある菌株を3株以上含む集団（合計39集団；合計402菌株）を解析の対象とした。各集団内の菌株間のSNPsの数を以下に示すSNPcasterの標準設定で算出

した：i) 参照配列として、EHEC O157:H7 Sakai株のリピート領域を除いたゲノム配列を指定 ii) 組み替え領域を検出し解析対象から除外するGubbinsプログラム (Croucher NJ, et al. *Nucleic Acids Res*, 2015) を使用。次に、i)の参照配列を大腸菌K-12 (MG1655株)に変更し、MG1655株のリピート配列を除去しない配列を参照配列として解析を行なった。さらに、ii) Gubbinsプログラムを使用しない条件で、Sakai株あるいはMG1655株を参照配列として解析を行った。以上の計4条件 (Sakai株参照配列・Gubbins有；MG1655株参照配列・Gubbins有；Sakai株参照配列・Gubbins無；MG1655株参照配列・Gubbins無) で解析したSNPcasterの結果を比較することで、EHEC菌株に対するSNPcasterの解析基準の検討を行った。

(2) ナノポアシーケンサを用いたEHEC菌株のゲノム配列の決定

公共データベースに完全長ゲノム配列が登録されているO157:H7 Sakai株 (Accession No. ASM886v2)を対象として、Sandersonら (Sanderson ND, et al. *Microb Genom*, 2024) の方法に従い、ナノポアシーケンサで得られたリード配列のみを用いて、Sakai株のゲノム配列を決定した。その後、MUMmer (Kurtz S, et al. *Genome Biol*, 2004) にパッケージされているdnadiffプログラムを用いて、決定した配列を公共データベース上のSakai株の配列と比較し、両配列間の差異を確認した。また、高精度なゲノム配列構築に必要なデータ量の検討のため、Rasusaプログラム (doi:10.5281/zenodo.3731394) を用いて、取得した塩基配列データをランダムに抽出した。抽出したデータを用いて、再度ゲノム配列を構築し、公共データベース上の配列との比較を行った。

EHEC菌株のゲノム配列決定法の効率化を目的として、Sandersonらの方法で用いられていたDNA抽出キット (Qiagen Genomic Tip 100/G; Genomic-tip)をPromega社のWizard® HMW DNA Extract ion Kit (HMW kit) に変更し、DNA精製を行った。DNA精製過程において、RNAをRNaseによって分解する必要があるが、HMW kitに同梱されているRNaseでは、RNAの分解が不十分であることが明らかとなったため、Invitrogen社のRNase Cocktail Enzyme Mixを代わりに使用した。また、ゲノム配列構築に用いるプログラムをHybracterパイプライン (Bouras G, et al. *Microb Genom*, 2024) に変更した。以上の改良プロトコルを用いて、Sakai株のDNAを抽出後、ナノポアシーケンシングを行い、得られたリード配列を用いてゲノム配列を構築した。

(3) EHECおよびEPEC菌株の完全長ゲノム配列決定

前年度および今年度の離島コホート研究によって分離されたEHECおよびEPEC (計43株) を解析対象とした。各菌株をLB培地で37℃、一晚培養後、Genomic Tip 20/G (Qiagen)を用いてDNAを精製した。Rapid Sequencing Kit V14 (Oxford Nanopore Technologies; ONT)を用いてDNAライブラリを調製後、MinION Flow Cell R10.4.1 (ONT)によるナノポアシーケンスを行なった。シーケンシングによって得られた波形データをDorado v.0.8.3 (ONT; Super accuracy basecalling modeおよびDNA model v.5.0.0を使用)を用いて塩基配列に変換 (ベースコール) した。生成された塩基配列データ (リード配列データ) から、Hybracterパイプラインを用いて、ゲノム配列を構築した。43株のうち2株については、NanoFilt v2.8.0 (De Coster W, et al. *Bioinformatics*, 2018)プログラムを用いて、Quality score (Q score)が8あるいは20を超えるリード配列を抽出し、ゲノム配列構築に利用した。構築したゲノム配列を用いて、ECTyper v.1.0.0 (Bessonov K, et al. *Microb Genom*, 2021)プログラムおよびmlst program v2.23.0 (<https://github.com/tseemann/mlst>; Achtmanのスキームを使用)によって各菌株の血清型およびSequence type (ST)を決定するとともに、BLASTNに基づいた方法 (Nakamura K, et al. *PLoS Pathog*, 2021)によって、志賀毒素 (stx)遺伝子およびインチミン (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

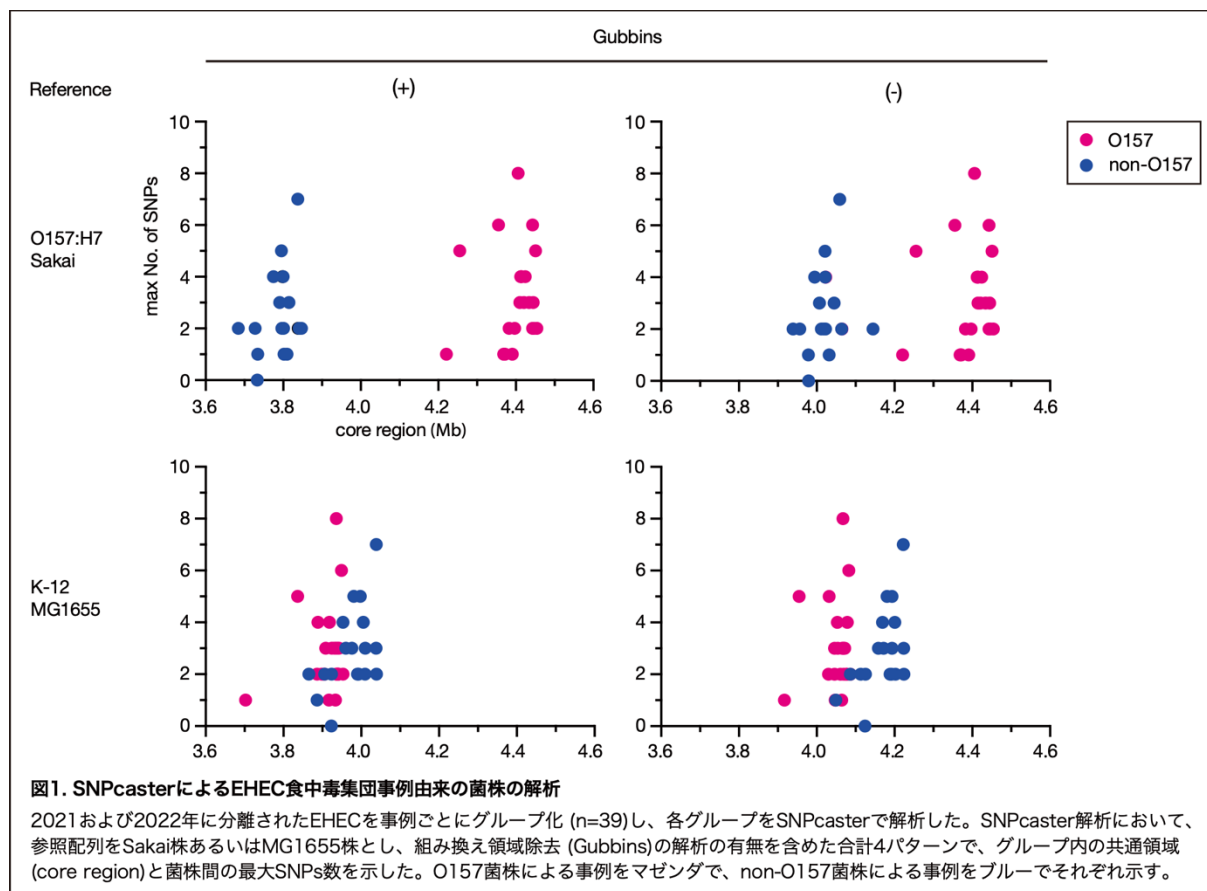
C. 研究結果

(1) 国内の食中毒事例に由来する菌株を用いたSNPcasterパイプラインの解析条件の検討

2021年および2022年に発生したEHEC集団食中毒事例から分離された菌株を対象として、SNPcaster解析を行った (図1)。解析セットには、EHEC主要血清型のO157:H7による事例 (n=21)のほか、non-O157として、O26:H11 (n=8), O111:H- (n=3), O103:H2 (n=3)などによる事例が含まれていた。SNPcasterの解析では、参照配列 (Reference)を含む全ての解析対象株に共通するゲノム領域 (core region) に存在するSNPsを抽出する。SNPcasterの標準設定 (図1左上)において、O157による事例を解析した場合には、事例内の菌株間のcore regionが4.2~4.4 Mbであったのに対し、non-O157による事例では、core regionが3.6~3.8 Mbとなったことから、O157とnon-O157ではcore regionに明らかな差が見られることがわかった。この一方で、参照配列としてK-12 MG1655株を用いた場合、O157およびnon-O157事例におけるcore regionの間に著しい差は見られなかった。core regionに含まれる組み替え領域を推定し、これを除去するGubbinsプログラムがcore regionに与える影響を調べた。参照株にO157 Sakai株を用いた場合、血清型が同一のO157による事例のcore regionは1事例を除いて全く変化しなかったが、non-O157による事例では、core regionに0.2 Mb程度の違いが見られた。参照配列としてK-12 MG1655株を用いた場合は、事例にかかわらず、Gubbinsを使用することでcore regionが0.2 Mb程度低下した。このことから、SNPcasterで参照株として標準設定されて

いる菌株と血清型のレベルで同一ではない菌株による事例では、参照株と解析株との間に組み替え領域と判定される領域 (0.2 Mb程度)がcore regionから除去されていることが明らかとなった。

各事例における菌株間の最大SNPs数を解析したところ、4つの解析パターンのうち、いずれの場合においても、最大SNPs数が10を超える事例は存在しなかった。解析菌株は疫学的関連性に基づいて事例ごとに分類されていることから、国内で発生している食中毒事例において疫学的関連性のある菌株をSNPcasterで解析する際の遺伝的な違いは、10 SNPs以下となることが示唆された。



(2) 地方衛生研究所のゲノム解析環境の構築に関する支援活動

WGS解析パイプラインが配布される地方衛生研究所におけるゲノム解析環境の構築のサポートを目的として、分担研究者 (大西) の所属する沖縄県衛生環境研究所を訪問した。本所では解析PCや使用する主要な解析プログラムの設定は終了していたので、所属研究員にゲノム解析における注意点、具体的には煩雑になる菌株のデータ管理の効率化についてアイデアを提案するとともに、個々の解析プログラムの使用方法や結果の解釈などを、研究員の疑問に答える形で説明した。また、九州地方の衛生研究所の研究員を対象として開催された、ゲノム配列解析の研修会に参加し、「病原細菌の全ゲノム解析とゲノム研究の概要」というタイトルで講演を行なった。研修会に参加したのはゲノム解析の設備が整っていない研究所に所属する、ゲノム解析の経験のほとんどない研究員であったため、講演では病原細菌のゲノム解析に必要な設備や、将来的なSNPcasterの配布を想定したゲノム解析に関する基礎知識の解説に焦点を当てた。講演終了後にそれぞれの研究員と個別に相談する機会を得ることができたため、ゲノム解析環境構築前の地方衛生研究所の状況に関する情報を収集した。

(3) ナノポアリードのみで構築したEHEC菌株の配列精度

SNPcasterにおける参照株として用いられているSakai株のゲノムは、2001年に完全長配列が決定され、2018年に配列修正が行われていることから、非常に高精度な配列データとなっている。Sakai株のゲノム配列をナノポアリードのみで構築し、その配列を登録済の配列と比較することで、ナノポアリードのみで構築するゲノム配列の精度を検証した。ナノポアリードのみを用いて構築されたゲノム配列において、Sakai株の染色体と2つのプラスミド (pO157およびpOSAK1)の全てが環状化された。また、それぞれの

表1. ナノポアリードのみで構築したSakai株のゲノム配列のサイズと参照配列との違い

	染色体		pO157		pOSAK1	
	サイズ (bp)	SNV/InDel*数	サイズ (bp)	SNV/InDel*数	サイズ (bp)	SNV/InDel*数
参照配列†	5,498,578		92,721		3,306	
ナノポア	5,498,579	2/7	92,722	8/1	3,306	0/0

* SNV, Single Nucleotide Variation; InDel, Insertion and Deletion

† PacBioリード (ロングリード) とイルミナリードを用いて構築した配列 (Accession No. ASM886v2)

ゲノムサイズは2018年に登録された配列とほぼ一致しており、両者の配列の違いについても、染色体でわずか2塩基ミスマッチと7塩基の欠失・挿入、pO157で8塩基ミスマッチと1塩基の欠失・挿入であり、pOSAK1に関しては完全に一致していた（表1）。以上の結果は、ナノポアリードのみでSakai株のゲノムを高精度に構築できることを示唆している。次に、Sakai株ゲノム配列の全長の160倍（160xカバレッジ）に相当する全ナノポアリードからランダムにリードを抽出することで、ゲノム配列構築に使用するデータ量を調節し、高精度なゲノム構築のために必要なデータ量を検討した（表2）。その結果、50xカバレッジよりもデータ量が多い場合には、十分な精度のゲノム配列が構築でき、50xカバレッジを下回ると、染色体の環状化に影響が見られることが明らかになった。また、pOSAK1に関しては同一配列の重複に起因するゲノムサイズの拡大が確認されたが、これは使用するデータ量の調節のために行ったナノポアリード配列のランダムサンプリングが原因であると考えられた。

表2. ナノポアリードのデータ量とSakai株のゲノムサイズ・ゲノム環状化との関係

データ量*	染色体		pO157		pOSAK1	
	サイズ (bp)	環状化	サイズ (bp)	環状化	サイズ (bp)	環状化
160x†	5,498,578	○	92,720	○	3,306	○
100x	5,498,578	○	92,720	○	9,219	○
50x‡	5,498,586	○	92,721	○	9,682	○
40x	2 frags§	×	92,721	○	16,429	○
30x	5,498,599	○	92,721	○	16,497	○
20x	5 frags	×	92,721	○	3,581	○
10x	26 frags	×	92,725	○	9,069	○

* Sakai株のゲノムサイズ (5.6 Mb) を基準として算出したナノポアリードのデータ量

† ナノポアリードの全データ量（結果の比較のため、表1で行った配列修正処理をしていない）

‡ 参照配列との違いは、染色体で2-SNVs/10-Indels, pO157で8-SNVs/1-Indelであった。

§ 染色体に該当するゲノム配列がN個に断片化 (n frags)

(4) ナノポアリードを用いたEHEC菌株のゲノム配列決定方法の検討

ナノポアシーケンスには長鎖DNAが必要であり、Qiagen社のGenomic-tipはDNA精製のゴールドスタンダードとして利用されている。しかしながら、Genomic-tipでは、陰イオン交換樹脂が充填されたカラムに菌体破砕液を添加することによりDNAを分離する、一般的なDNA精製キットとは異なる手法を採用しているため、多検体を処理することが困難であることに加え、菌体によっては破砕液がカラムに詰まることでDNA分離に手間がかかり、想定よりも長時間の作業を要することがある。そこで、Genomic-tipに代わるDNA精製キットとして、試薬添加と遠心分離のみで作業が完結する、Promega社のHMW kitでSakai株のDNAを精製し、これを用いて取得したナノポアリードの品質をGenomic-tipを用いて得たナノポアリードの品質と比較した。Genomic-tipによって精製したDNAに由来するナノポアリードの平均長は5,625-bpであり、シーケンスリードの長さの分布を示すN50（値が大きいほど長いリード配列が得られていることを示す指標）は14,299-bpであった。一方、HMW kitによって精製したDNAに由来するナノポアリードでは、平均長が3,696-bp、N50が8,308-bpであり、いずれの値もGenomic-tipを下回ったことから、HMW kitで精製されたDNAはGenomic-tipによるDNAよりも剪断されており、その結果、ナノポアリード長が短くなったことが示唆された。この一方で、HMW kitによって得られたナノポアリードを用いて、Genomic-tipによるものと遜色ないSakai株のゲノム配列を構築することができた。このことは、HMW kitを用いて精製されたDNAであっても十分な精度のゲノム配列が構築できることを示している。

Sandersonらの方法では、ナノポアシーケンスを用いたゲノム配列の構築にはFlyeプログラム（K olmogorov M, et al. Nat Biotech, 2019）が使用されているが、本プログラムはプラスミドの配列構築が不得手であることが指摘されており（Johnson J, et al. Microb Genom, 2023）、ユーザー自身が構築されたプラスミド配列の正確性を検証する必要がある。また、Flyeプログラム後に、Medakaプログラム（ONT）を用いたゲノム配列の修正をユーザー自身が操作して実行し、修正前後の配列を比較して再度プログラムを使用するかを判断することとなる。以上のことから、既報の方法ではナノポアリードの取得後、配列構築のために複数の操作と解析に関する知識が必要となる。そこで、本ステップの簡略化およびプラスミド構築の高度化を目的として、Hybracterパイプラインの使用を検討した。本パイプラインでは、一度の操作によって、Flyeプログラムに続いてMedakaプログラムが実行され、配列修正の必要性も自動で判断される。また、プラスミド配列構築についてはPlassemblerプログラム（Bouras G, et al. Bioinformatics, 2023）が実行され、プラスミドの配列精度を高めている。Hybracterパイプラインを用いて、Sakai株のゲノム配列とプラスミドがナノポアリードから問題なく構築できることを確認した。また、後述するEHECおよびEPEC菌株においても、染色体およびプラスミドが問題なく構築されていることを確認した。このことから、ナノポアリードを用いたゲノム配列構築においてHybracterパイプラインが利用可能であると考えられた。

以上の検討結果を踏まえ、図2に示すゲノム配列プロトコルを構築した。

1. Genomic-tipあるいはHMW kitを用いたDNA精製
2. ナノポアシーケンス用ライブラリ調製
3. MinIONシーケンス
4. Hybracterパイプラインを用いたゲノム配列の構築

図2. EHECゲノム配列構築手順の概要

(5) ウシ由来EHECおよびEPEC菌株のゲノム配列決定

(4) で構築したプロトコルを用いて、離島コホート研究によって分離された計43のEHECおよびEPEC菌株の完全長ゲノム配列を決定した。DNA精製に関しては、HMW kitの検討中であつたため、Genomic-tipを使用した。この菌株セットには、25種類の血清型あるいは24種のSTの大腸菌が含まれていた。染色体のゲノムサイズは4.8–5.8 Mbであつた。プラスミドを保有していない菌株は存在しておらず、1つの菌株あたりの保有プラスミド数は1-11であつた。以上のことから、今回

の菌株セットは多様な病原大腸菌を含んでいることが明らかとなり、少なくとも病原大腸菌においては、今回のプロトコルでほぼ確実に完全長ゲノム配列の構築が可能であることが示唆された。

D. 考察

細菌の進化の過程では、ファージなどの可動性遺伝因子の獲得や、染色体内において互いに類似した配列間で相同組み替えが起きることがある。これらに起因するSNPsは突然変異に由来するSNPsとは本質的に異なることから、系統解析において細菌を区別する情報として利用されない。SNPcasterで行われるSNP解析においても、標準設定では、解析対象株に共通するゲノム領域（コアゲノム配列）から、可動性遺伝因子領域と、Gubbinsプログラムを用いて推定された組み替え領域を除去している。しかしながら、様々な年代に、様々な由来から分離された細菌を解析セットに含めることが多い系統解析とは異なり、集団食中毒事例に由来する菌株間の異同を判定する場合は、原因（食品など）から分離された菌株と患者から分離された菌株の間は遺伝的に著しく近縁であるという仮定に基づいて解析するため、これらの分離菌株間で、可動性遺伝因子の獲得や相同組み替え発生による違いが発生する可能性は低い。実際に、病院内の同一患者から継続的に分離された菌株のセットを用いた解析により、可動性遺伝因子領域や組み替え領域は菌株間の異同の判定に影響をほとんど及ぼさないことが報告されている（Gorrie CL, et al. Lancet Microbe, 2021）。国内のEHEC集団感染事例の菌株を用いた今回の解析においても、菌株間の最大SNPs数はGubbinsプログラム使用の影響を受けなかった。Gubbinsプログラムでは複雑な計算が行われるため、解析に使用するPCに与える負担が他のプログラムと比較して大きく、そのため結果の出力に要する時間に著しく影響することがある。地方衛生研究所での用いられるPCの性能によっては、Gubbinsプログラムが解析の負担となる可能性もあるため、SNPcaster配布時にGubbinsプログラムに関する正確な情報提供が必要であると考えられた。今回、可動性遺伝因子の影響は検討しなかったが、SNPcasterではSakai株以外の参照配列を使用する場合は、ユーザー自身が除去すべき領域として可動性遺伝因子を指定することになるため、こちらに関しても可動性遺伝因子領域指定の必要性に関しての状況説明が必要であると思われる。

SNPcasterでは、解析したい菌株のWGSをアラインメントするための参照配列が必要であり、標準設定ではO157:H7 Sakai株が指定されている。今回の解析により、Sakai株を標準株に選んだ場合に、O157とnon-O157の集団事例の間で、SNPcaster解析の出力結果のひとつであるcore regionのサイズに大きな違いがあることが明らかとなった。これは、Sakai株がO157 EHECであることから、Sakai株と同一血清型のO157菌株を解析する場合には、Sakai株と解析株の間で共有される領域が広くなるため、結果的にcore regionのサイズが大きくなることに起因している。一方、MG1655を用いた場合には、O157とnon-O157のcore regionサイズは大差がなかった。MG1655は大腸菌の一般的な実験用の株で、非病原性であり、病原性大腸菌とは遺伝的に異なる。このため、今回の解析対象株のいずれとも、同程度のcore region（おそらく大腸菌株をSNPcasterで解析した場合の最低限の領域）を確保したと考えられる。プログラムのオプション設定を除けば、参照配列株はユーザーが唯一指定しなければいけないパラメータであり、実際に、九州の衛生研究所職員を対象とした研修会において、参照株には何を選択するべきかという質問を受けた。Sakai株を設定した場合、解析対象がO157かそれ以外かで、少なくともcore regionのサイズの標準値が異なる。これに対し、MG1655株では、ほとんどの解析対象で類似したcore regionとなると予想され、その標準値から大きく異なる値が出力された場合は、何らかのエラーを推測できる。また、菌株同士の異同の判定基準となる最大SNPsについて、今回の解析セットでは、Sakai株とMG1655株の間に明確な差は確認できなかった。従って、大腸菌に関してはMG1655株を参照株に設定することをオプションの一つとして提案できると考えられた。

国内の合計39の集団事例を用いた解析の結果、疫学的関連性のある菌株間のSNPs数は8以内に収まることが明らかとなった。前年度行った海外事例（計5事例）の菌株を用いた解析では、5 SNPsが同一クローン判定のひとつの基準となることが示唆されていた。また、前年度の解析により、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も明らかとなっている。これらのことから、国際的に整合性のある同一クローンの判定基準の候補として、10 SNPsはある程度妥当な数値であると考えられた。

ナノポアシーケンサによって得られる配列はロングリード配列と言われ、イルミナシーケンサによるショートリード配列と比較して、リードあたりの情報量が飛躍的に増加するため、細菌の染色体およびプラスミドのゲノム配列を完全に構築する点において、非常に有用となる。この一方で、ナノポアリードの塩基配列の精度が課題となり、ナノポアリードを使用してゲノム配列を決定する場合にはイルミナリードと併用する必要があった。しかしながら、近年の技術革新により、ナノポアリードのみで細菌の高精度な完全長ゲノム配列を構築可能であることが報告されている（Sanderson ND, et al. Microb Genom, 2024）。ナノポアシーケンスのための設備に係る費用は、地方衛生研究所に配備されているイルミナシーケンサ(iSeq 100)よりも圧倒的に安価である

（現時点の価格で約150万円程度）。また、iSeq 100の販売は2025年9月末で終了し、システムサポートは2029年末で終了することが告知されている。このことから、将来的なイルミナからナノポアへの切り替えの可能性を想定し、ナノポアシーケンサを用いたゲノム配列決定プロトコルを構築しておくことは重要であると考えられる。本研究により、大腸菌に関しては、ナノポアシーケ

ンスのみで精度の高いゲノム配列を安定して構築できることが明らかとなった。DNA精製において特に多検体を処理する必要がある場合は、HMW kitを利用することで作業を効率的に進めることが可能となるが、Genomic-tip使用時と同様のゲノム配列を常に構築できるかどうかは、Sakai株以外の様々なEHEC菌株を用いて検証する必要がある。また、先述の通り、ナノポアシーケンスには長鎖DNAが必要であり、長鎖DNAをいかに調製するかがシーケンスの成否に大きく影響する。長鎖DNAの調製法は菌種によって異なることが予想されるため、大腸菌以外の食中毒起因菌に関してはWGSデータベースの構築に加えて、ナノポアシーケンスを利用する場合はDNA精製方法を最適化することが将来的な課題のひとつであると考えられる。

E. 結論

SNPcasterパイプラインの標準設定および解析基準について、以下の条件を決定し代表者に提案した：

- ・ 参照配列として、MG1655株 (NCBI accession No. NC_000913.3)の染色体のすべての領域を使用する。
 - ・ Gubbinsプログラムは、解析環境に応じて使用しない設定でも大きな問題は発生しない。
 - ・ 解析後に得られるcore regionは、Gubbinsプログラム有では3.7-4.0 Mb、Gubbinsプログラム無では3.9-4.2 Mbとなることが予想される。
 - ・ 菌株間のSNPsが10以下の場合、同一クローンに由来する可能性が非常に高いと判定できる。
- また、ナノポアシーケンサのみを用いたゲノム配列決定法を確立し、その有用性を確認した。これを用いて、離島コホート研究で得られた病原大腸菌のゲノム配列を決定した。ゲノム配列決定に関する成果については、来年度論文報告する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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6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）感染症の調査、引いては効果的な対応のためには、患者の疫学情報と菌株情報の迅速な連携が課題となっている。感染症発生動向調査（NESID）と各地方衛生研究所や国立感染症研究所で分析され、NESFD等で共有される MLVA などの菌株データを統合し、集団発生や広域事例、散发例に対して記述疫学や GIS を用いた空間解析を行うことで、異常探知の有用性が増すことが考えられる。また、発生初期段階でも特異的な増加を迅速に探知できるよう、報告数のベースライン比較によるアラートシステムの改良と、介入の迅速化を目指している。2024 年においては 4 件のアラートを発出した。それらのアラート発出の公衆衛生上の有効性についてさらに評価し、改善していく必要がある。なお、国外の先進事例や国際ネットワークから情報を収集し、農林部局との連携を含めた広域事例対応の強化も図る。食品衛生分野の HACCP や農業分野の GAP との統合的対応を検討し、得られた知見をシステムに反映させる。なお、個人情報保護には十分配慮しながら取り組む。

2020～2023 年に高知県で確認されたギラン・バレー症候群（GBS）症例は計 25 例で、2023 年に 13 例と大幅に増加した。2023 年の症例では、胃腸炎の先行や *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 陽性の割合、鶏肉喫食歴を有する者が多く、GBS 発症に *C. jejuni* 感染が関与していた可能性が示唆された。さらに、便培養から得られた *C. jejuni* 株の遺伝子解析により、GBS の発症に関連することが知られる ST-22 型が、1 例の GBS 症例および 2023 年の県内広域で発生した複数の食中毒事例から検出された。ST-22 は自己抗体産生を誘導しやすい遺伝型を有しており、2023 年の GBS 症例増加はこの高リスク株の広域分布と関連する可能性がある。

研究協力者（令和6年度の主たる所属）：
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）
高原 理（同上・感染症疫学センター）
加藤 博史（同上・実地疫学研究センター）
八幡裕一郎（同上・実地疫学研究センター）
高橋 佑紀（同上・実地疫学研究センターFETP）
後藤 滉平（同上・実地疫学研究センターFETP）

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。

さらに今年度より加わった活動の一つが高知県内で発生しているカンピロバクターによるギラ

ン・バレー症候群 (Guillain-Barré syndrome: GBS) の多発に対する疫学研究である。行政的には感染症法第 15 条による積極的疫学調査として、高知県と国立感染症研究所との連携のもとで実地疫学調査が行われているが、公衆衛生学的・細菌学的にも新たな知見を含むことから研究的側面について、本研究グループが支援することとしたものである。

B. 研究方法

広域食中毒アラートを検出し、具体的な発出する方法としては、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】

提供要否を都度判断: 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
過去1年間のイベント数	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)

GBS については、2023 年の高知県内における GBS 症例集積事例の全体像の把握や原因の特定を目的に、高知県、国立感染症研究所 (感染研) 実地疫学専門家養成コース (FETP)、実地疫学研究センターおよび細菌第一部が実地疫学調査および菌株解析を実施し、その結果の一部が国立感染症研究所病原微生物検出情報 (IASR) に掲載されたので、その内容 (*) から報告する (<https://id-info.jihs.go.jp/surveillance/iasr/45/535/article/040/index.html>)。方法については、まず症例定義を 2020 年 1 月~2023 年 12 月に、高知県内の 4 医療機関において GBS の診断基準である

「Brighton の診断基準 (レベル 3 以上)」に合致する者とした。各医療機関において後ろ向きに症例情報を収集し、記述解析を行った。また、自治体 (保健所・地方衛生研究所) 担当者と GBS 症例を診療した医師等へ聞き取り調査を実施した。さらに、上記 GBS 症例と高知県内のカンピロバクター食中毒事例の症例から得られた便検体から高知県衛生環境研究所および高知市保健所で *C. jejuni* 菌株を分離し、感染研細菌第一部で遺伝子解析を実施した。

(倫理面への配慮)

広域食中毒アラート発出に関する研究についてはラインリスト作成やそのための個人情報扱を扱わないことから倫理的な問題は発生しない。また、カンピロバクターによるギラン・バレー症候群につ

いては、集計され感染研 HP 等に公表された情報についてのみ、本報告書については対象とするところであるが、さらに論文文化等の対応を行うにあたっては、引用という形であっても倫理審査委員会への具申が必要と考え、その準備中である。

C. 研究結果

まず、広域食中毒アラート発出に関する研究について 2019 年から 2024 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)、2024 年 (3／4 回) であった。2024 年の厚生労働省への情報提供回数は 3 回で、2022 年、2023 年と並ぶ件数であった。2024 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。

2024 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 (2024 年 37-38 週) として、O157VT2 が海外渡航者で多い等の疫学的な偏りを認めた。2024 年 9 月 25 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 2024 年 37 週から 38 週にかけて、感染症サーベイランスシステム上では例年を上回る O157VT2 症例数の増加を認め、特に診断・週 38 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)。

GBS に関する結果として、(*) から引用すると以下のようになる。

・GBS 症例の調査結果

2020 年 1 月～2023 年 12 月に計 25 例 (2020 年: 3 例、2021 年: 5 例、2022 年: 4 例、2023 年: 13 例) の GBS 症例が確認された (図)。症例の年齢中央値は 66.0 歳 (範囲: 14-90 歳)、男性が 15 人 (60%) であった。症例 25 例のうち 3 例 (12%) に人工呼吸器装着が確認され、観察できうる範囲で死亡例は確認されなかった。

2023 年において、幡多保健所管内を除く県内 5 保健所管内で、GBS 症例が確認された。2023 年は 2020～2022 年の症例と比較して、先行症状に胃腸炎を有する者の割合が高く [92% (12/13) vs 50% (6/12)]、*C. jejuni* 便培養陽性もしくは抗体陽性の割合が高く [54% (7/13) [69% (9/13) →54% (7/13) に変更] vs 33% (4/12)]、さらに鶏肉喫食歴 (生および加熱不十分な状態の鶏肉を喫食したかどうかまでは不明) を有する割合も高かった [38% (5/13) vs 8% (1/12)]。また、便培養陽性患者 (1 例) から採取された菌株の解析から、MLST (multilocus sequence typing) の sequence type (以下 ST とす

る) -22 であることが判明した。

・高知県内食中毒事例の調査結果

2023 年の食中毒 8 事例 [9 事例 →8 事例に変更] (疑い事例含む) の *C. jejuni* 便培養陽性症例から採取された菌株を解析した結果、6 事例 (75%) [7 事例 (78%) →6 事例 (75%) に変更] の菌株から *C. jejuni* (ST-22) が検出され、これらの事例は県内 4 保健所所管区域内 (安芸・中央西・中央東・高知市) で発生していた。

自治体 (保健所・地方衛生研究所) への聞き取り調査では、*C. jejuni* を含めて、食中毒事例の増加および GBS を引き起こす感染症の流行やイベント等は確認できる範囲で認められなかった。ただし、2023 年に例年と比較して *C. jejuni* による胃腸炎患者数が増加した医療機関が確認された。

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、2023～2024 年は特筆すべき事例発生としては、2024 年の韓国渡航歴のある生肉喫食に関連した症例であったと考えられた (IASR vol46, No. 5: p17-18)。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) 2024 年 (3 回/4 回) 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、その後回復したものの、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は今後必要である。

GBS 事例の考察に関する (*) からの引用としては以下のようなになる。

2023 年は、GBS 症例が幡多地域を除く高知県内広域で報告された。症例調査から、先行症状に胃腸炎を呈している割合、*C. jejuni* 抗体もしくは便培養が陽性である割合、鶏肉喫食歴 (生および加熱不十分な状態の鶏肉を喫食したかどうかまでは不明) を有する割合が 2020~2022 年と比較して高かった。これらの所見は、2023 年において、報告された患者らが GBS 発症に先行して *C. jejuni* に感染していた可能性を示唆している。

菌株の遺伝子解析検査では、2023 年に回収された食中毒事例の便培養検体より、*C. jejuni* (ST-22) が高い割合かつ県内広域において確認され、GBS 症例の 1 例からも検出された。*C. jejuni* (ST-22) は、神経細胞表面のガングリオシド構造 (GM1、GD1a、GQ1b/GT1a 等) に対する自己抗体 (抗 GM1、抗 GD1a 等) の産生を誘導する傾向のある、LOS (lipooligosaccharide) class A 遺伝子型を有することが多いため、GBS 発症リスクが高い菌株であると考えられている 3)。調査結果より、GBS 発症リスクの高い *C. jejuni* (ST-22) が高知県内広域に分布していたことが、2023 年の県内 GBS 症例数が 2020~2022 年と比較して増加した可能性として考えられる。

制限として、本調査が ecological study であり症例対照研究等は実施しておらず、鶏肉喫食歴については生および加熱不十分な状態の鶏肉を喫食したかどうか区別できていないため、本事例における鶏肉喫食と GBS 発症の因果関係は不明であることから解釈に注意が必要である。また、他のすべての GBS 発症要因を問診・検査等で除外できておらず、他の発症要因との関連性を十分に評価できていない。さらに、*C. jejuni* 感染症は感染症発生動向調査における届出疾患ではないため、県内の *C. jejuni* 感染症の発生動向そのものが十全に把握されていない。

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。

GBS 症例については、引き続き発生の動向注視および情報収集、*C. jejuni* の菌株収集と遺伝子解析を継続し、*C. jejuni* 感染症の感染源・感染経路を追究していくことが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

特記事項無し

2. 学会発表

○高橋佑紀、後藤滉平、加藤博史、山本章治、濱田一功、八幡裕一郎、宮地美智子、松岡智加、清岡有紀、小野邦桜、大森真貴子、影山温子、下元かおり、泉谷秀昌、島田智恵、松本一繁、山村展子、川内敦文、明田幸宏、砂川富正。高知県におけるギラン・バレー症候群 (GBS) 症例の集積事例 (2023 年)。カンピロバクター研究会。2024 年 11 月 19 日 (つくば市)

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 6 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、2021 年から 2022 年までの間に国内の食肉処理施設 B に搬入された牛から分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) 9 株の血清型および Stx サブタイプを同定し、MLVA 型を解析した。牛糞便由来 EHEC 株の血清型は、0157:H7 が 8 株、0182:H2 が 1 株であり、0157 株は 6 種類の MLVA 型に分類された。同一 MLVA 型の株が同一農場由来の異なる個体から分離されたことから、農場内で複数の個体が同一 MLVA 型の EHEC 株を保有している可能性が示唆された。食肉処理施設 B から収集した全ての牛糞便由来 EHEC 0157 株は、*stx2c* を保有していた。また、令和 5 年度に収集した食肉処理施設 A 由来の EHEC 0157 株（33 株）と、施設 B 由来の 0157 株（8 株）との MLVA 型比較から、由来施設ごとに異なるクラスターが形成される傾向が確認された。これらの知見から、今後の広域的な食中毒の早期探知には、地域ごとに牛糞便由来 EHEC 株の収集と MLVA 型およびゲノムデータの体系的蓄積が重要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

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、感染源や感染経路を把握し、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、令和 5 年度に引き続き、食品関連サンプル由来株として食肉処理施設に搬入された牛の糞便由来 EHEC 株を収集し、MLVA 型およびゲノムデータを蓄積することを目的とした。

B. 研究方法

1) 菌株

2021 年 10 月から 2022 年 9 月に国内食肉処理施設 B に搬入された牛の糞便から分離された EHEC 9 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。いずれの O 遺伝子型も陰性となった株は、O-genotyping PCR

(Iguchi ら、2015) を用いて O 遺伝子型を決定し、陽性となった O 遺伝子型の抗血清を用いて O 血清型を決定した。

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) 生化学性状および運動性試験

カジトン培地に保存した EHEC 9 株を TSI 培地および LIM 培地に接種し、37℃で 24 時間培養し、生化学性状および運動性を確認した。

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℃15 分の熱変性後、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ポート数を決定した。遺伝子

座ごとのリポ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)。

8) 株間の類縁関係解析

令和 5 年度に収集した食肉処理施設 A 由来の牛糞便分離 EHEC 0157 株 (33 株: 菌株 1、3 から 13、15 から 34、36) と令和 6 年度に収集した食肉処理施設 B 由来の牛糞便分離 EHEC 0157 株 (8 株: 菌株 37 から 43、45) の株間の類縁関係を明らかにするため PHYLOViZ Online を用いて MLVA 解析結果の各遺伝子座リポート数を株間で比較し、Minimum spanning tree (MST) を作成した。

C. 研究結果

1) 牛糞便由来 EHEC 株の血清型および MLVA 型

食肉処理施設 B から収集された牛糞便由来株 9 株は、すべて *stx* および *eae* 陽性であり、血清型は 0157:H7 が 8 株、0182:H2 が 1 株であった (表 4)。MLVA 型は 21m0152、22m0067、22m0603、22m0604、22m0605 および 24m0510 の 6 種類に分類された。22m0603 および 24m0510 は、同一農場由来の異なる個体から分離された。0157 株の TSI および LIM 培地での生化学性状判定結果は、一般的な大腸菌と同様に乳糖および白糖分解 (+)、ガス産生 (+)、リジン (+)、インドール (+) および運動性 (+) であった。0182 株は、運動性 (-) であり、その他の性状は 0157 株と同じであった。

2) 牛糞便由来 EHEC 株が保有する *Stx* サブタイプ遺伝子パターン

保有する *Stx* サブタイプ遺伝子のパターンは、0157 株では全て *stx2c* 単独保有であり、0182 株は *stx1a* 単独保有であった (表 4)。

3) 由来施設間での菌株の比較

食肉処理施設 A 由来 EHEC 0157 株および食肉処理施設 B 由来 EHEC 0157 株は概ね別のクラスターを形成した (図 1)。しかし、菌株 13 および菌株 36 など一部の菌株はク

ラスターを超えて混在した。

D. 考察

本研究では、国内の食肉処理施設 B から収集された牛糞便由来 EHEC 株 9 株について、血清型、*Stx* サブタイプ、MLVA 解析を実施し、施設 A 由来株との類縁関係を明らかにした。施設 B 由来の EHEC 株は主に 0157:H7 であり、特に *Stx* サブタイプ *stx2c* を保有することが特徴であった。一方で、0182:H2 という異なる血清型および *Stx* サブタイプ *stx1a* を保有する株も確認され、多様な EHEC 株が存在することが示唆された。MLVA 解析結果から、施設 B 由来の EHEC 株は 6 つの MLVA 型に分類され、一部の MLVA 型 (22m0603 および 24m0510) は同一農場由来の異なる個体から分離されていることから、特定の農場において複数の個体間で同一または近縁な株が広がっている可能性が示唆された。

MST を用いた MLVA 型の比較では、施設 A と施設 B の EHEC 0157 株が概ね別のクラスターを形成したことから、施設の地域あるいは農場ごとに偏りがある可能性が推察された。しかし、一部の株が施設を超えて混在していたことから、MLVA のみの情報で分離地域を

特定することは困難であると推察された。

E. 結論

農場内で同一 MLVA 型の EHEC 株が複数の個体に存在する可能性が示唆された。また、EHEC の MLVA 型には食肉処理施設や農場ごとの偏りが見られることから、広域的な食中毒の早期探知を可能にするためには、地域ごとに牛糞便由来株などの EHEC 株を収集し、MLVA 型およびゲノムデータを体系的に蓄積することが重要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

• Shouhei Hirose, Hidemasa Izumiya, Yoshimasa Sasaki, Yukihiro Akeda and Yukiko Hara-Kudo : Multilocus variable-number tandem-repeat analysis genotype diversity, pathogen-related genes and antimicrobial susceptibility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in the same food sample,

International Association for Food Protection Annual Meeting 2024, 2024
(令和 6) 年 7 月 15 日, ロサンゼルス.

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	TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG	USDA
		Stx-R	CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACDTC	
		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	TTTCACACTATTGGATGGTCTCAA	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	TGTTCCAGGTGGTAGGATTCG	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	
	WzxO103	Wzx O103-F	TTGGAGCGTTAACTGGACCT	USDA
		Wzx O103-R	ATATTCGCTATATCTTCTTGCGGC	
		Wzx O103-P	AGGCTTATCTGGCTGTTCTTACTACGGC	
Assay5	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	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGTTATATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTTG
	O157-9			GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
	EH111-8	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG
		PET	CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGCTCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTAATTG	GAACAACCTAAACCCGCTCGCCATCG
	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
Mix2	EH26-7	PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTT	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	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC
	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>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG
<i>stx1c</i>	CCTTTCCTGGTACAACAGCGGTT	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. 食肉処理施設 B から収集した牛糞便由来 EHEC 株の分離年月、血清型、MLVA 型
および Stx サブタイプ

菌株名	分離年月	血清型	MLVA型	Stx subtype
菌株37	2021年10月	O157:H7	22m0067	<i>stx2c</i>
菌株38	2021年10月	O157:H7	21m0152	<i>stx2c</i>
菌株39	2022年6月	O157:H7	22m0603	<i>stx2c</i>
菌株40	2022年6月	O157:H7	22m0603	<i>stx2c</i>
菌株41	2022年6月	O157:H7	22m0604	<i>stx2c</i>
菌株42	2022年9月	O157:H7	24m0510	<i>stx2c</i>
菌株43	2022年9月	O157:H7	24m0510	<i>stx2c</i>
菌株44	2022年9月	O182:H2	NA	<i>stx1a</i>
菌株45	2022年9月	O157:H7	22m0605	<i>stx2c</i>

NA: Not applicable

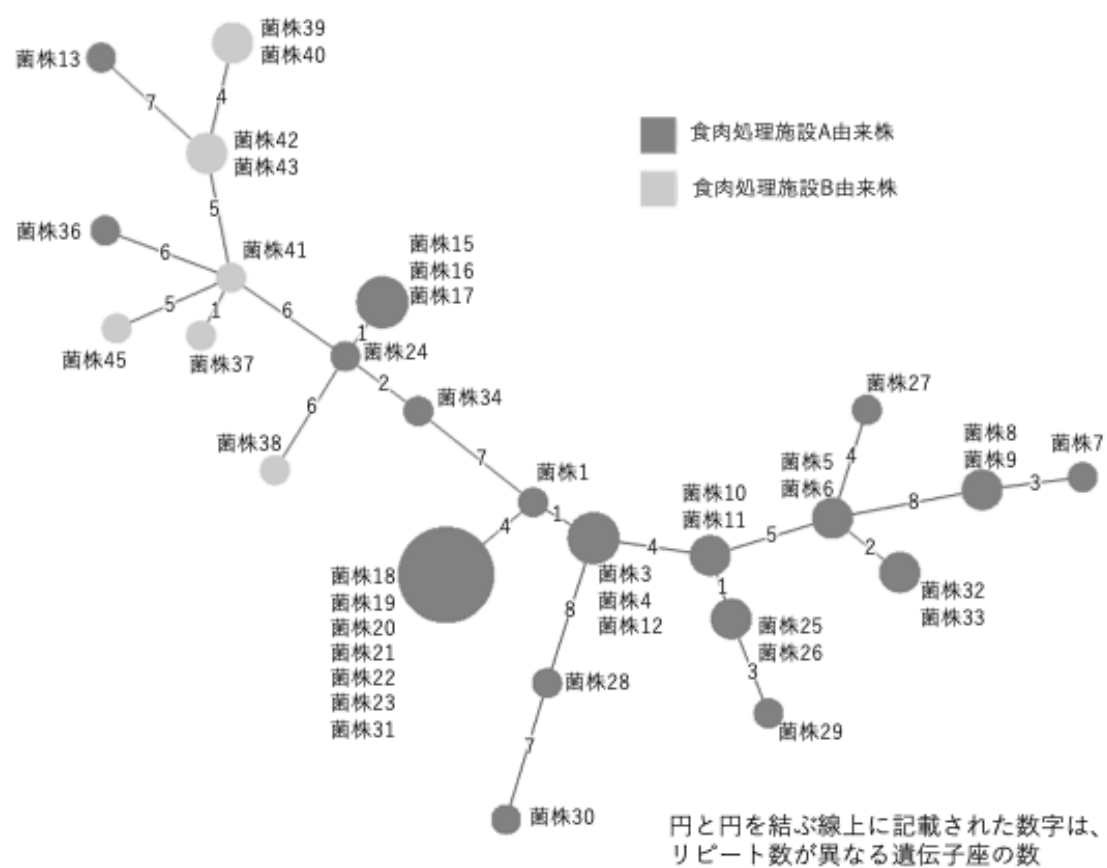


図1. MLVA 解析に基づく EHEC 株の類縁関係

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研修会の実施、及びトラブルシューティング集の改訂

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	佐藤 梢	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	小野 諭子	長野県環境保全研究所 感染症部
研究協力者	松山 満貴	長野県環境保全研究所 感染症部

本研究班では、地方衛生研究所(地衛研)における腸管出血性大腸菌(EHEC)の分子疫学的サーベイランスに用いられる反復配列多型解析(MLVA)法の検査精度を向上させるため、精度管理試験を実施してきた。これまで、試験結果に誤りが認められた施設に対しては、個別に改善策を提示してきたが、このような対応では支援可能な施設数に限界がある。特に、技術的課題の克服には、実習を通じた支援が不可欠であると考えられた。

そこで、本研究では、MLVA法の検査精度を技術面・知識面の両面から支援することを目的として、全国の地衛研を対象に研修会を実施した。研修会は、Zoomを用いた遠隔講義と集合形式の実習を組み合わせた3日間の構成とし、講義では、MLVA法に関する総論・各論、異同判定、トラブルシューティングに関して解説した。実習では、EHEC菌株を用いてDNA抽出、電気泳動、GeneMapperによる解析に至る一連の工程を実施した。研修会終了後に実施したアンケートの結果、一定の学習効果が得られたことが確認された。一方で、GeneMapper実習においては時間配分や進行速度に課題があることが明らかとなり、これを踏まえて改良版カリキュラムを構築した。また、参加者からMLVA法の日常検査における質問や問題点を募集し、これらを基に、昨年度までに作成したトラブルシューティング集を改訂した。

これらの取り組みにより、MLVA法における解析技術の習得支援が効果的に実施され、地衛研における検査精度の維持・向上に貢献する成果が得られた。本研究の成果は、今後の研修体制の構築及び教育資材の整備における重要な基盤となるものである。

A. 研究目的

地方衛生研究所(地衛研)では、腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団発生を早期に探知するために、反復配列多型解析(MLVA)法を用いたサーベイランスが実施されている¹⁾。MLVA法は、特定の遺伝子領域における繰り返し配列数を測定することで、菌株間の類似性を高精度で評価できる手法である²⁾。本法はPCRを基盤とするため、短時間で解析結果を得ることが可能であり、結果が数値化されることから、自治体間の比較、すなわち広域食中毒への対応にも適している³⁾。このように分子疫学的解析法として有用なMLVA法を公衆衛生分野で活用していくためには、地衛研における検査精度の維持及び向上が不可欠である。

これまで本研究班では、地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験を実施し、各施設における検査精度の把握に努めてきた。その結果、基本的な実験操作や解析ソフトに関する理解が十分でない施設が一部に存

在することが明らかとなった。誤答が見られた施設に対しては、実験工程を照会して原因の特定を行い、改善策を提示することで、検査精度の向上を図ってきた。しかし、昨年度のように菌株検体を用いた試験では、発送可能数に制限があるため、全ての施設に対応することは困難である。実際、49施設から応募があったにもかかわらず、受験できたのは21施設に限られた。そこで、施設数の制限を受けずに検査精度の向上を支援する手段として、試験で把握したトラブルを基に解決事例集を作成した。しかし、現時点で事例数は10件に留まっており、今後、さらなる事例の収集と内容の充実が求められる。

一方、精度管理試験の実施やトラブルシューティング集の作成は、知識面での支援にはなるものの、技術の習得や改善には限界がある。これまでの精度管理試験の実施により、電気泳動データからタンデムリポート(TR)を算出する解析ソフトGeneMapper(T hermo Fisher Scientific)の使用に関して、

特に多くの誤りが確認された。解析ソフトの操作方法や実験操作の確実な習得及び改善を図るには、直接的な指導を伴う研修会の実施が効果的であると考えられる。

そこで、本年度は、地衛研のMLVA法における検査精度向上を知識及び技術の両面から支援するため、研修会を実施した。また、研修会参加者を対象として、MLVA法を日常検査で運用する中で生じた質問や問題点を事前に募集し、トラブルシューティング集の拡充を図った。

B. 研究方法

1. MLVA 法の研修会の実施

(1) 研修会の日程及び内容

研修会は令和7年1月28日(火)、30日(木)及び31日(金)に実施し、講義と実習で構成した(表1(A)、図1(A))。初日はZoomによる懸隔形式で、バイオリスク管理(区分:講義①)及びMLVA法の総論・各論に関する講義(区分:講義②)を行った。2日目と3日目は国立感染症研究所(感染研)村山庁舎にて集合形式で実施した。2日目のMLVA法の異同判定(区分:講義③)では、同一クローン由来と判定可能なTR変異の範囲を解説した。MLVA法で使用する代替・解析ツールの紹介(区分:講義④)では、地衛研等で広く用いられていたBioNumerics(Applied Maths社)の新規販売中止を受け、代替解析ツールを紹介した。さらに、実務上の課題に対応するため、トラブルシューティングに関する講義(区分:講義⑤)も実施した。実習では、異なるクローン由来の18菌株のEHEC O157、O26及びO111を使用した。これらの菌株から、1班あたり9菌株、つまり各研修生に3菌株を検体として配布した。配布時に検体の血清型が判別できないようにした。これらの菌株を用いて、2日目に菌株培養液からのDNA抽出、PCR反応、電気泳動を(区分:実習①～③)、3日目にはGeneMapperを用いたデータ解析を行った(区分:実習④)。GeneMapper実習では、Panel及びBinファイルのインポート、ピークのサイジング、Binの修正、電気泳動データの解析、及びトラブル事例由来のデータの解釈を実施した。電気泳動データの解析では、検体の電気泳動で得たデータを用い、それ以外の解析(ピークのサイジング等)では、事前に用意したデータを使用した。研修会最後の実習では、参加者から事前に募った日常検査における質問や問題点に対し、実際の電気泳動データを用いて解説を行った(区分:実習⑤)。

(2) 研修生定員及び対象者

受け入れ可能な研修生数を、MLVAデータからTR数を算出する解析ソフトウェアGeneMapperが搭載されたパーソナルコンピュータ(PC)の利用可能台数に基づき決定した。メーカー及び感染研内の他部署からGeneMapper搭載PCを合計5台借用し、1台を講師用、残り4台を研修生用とした。研修会

では1台のPCを3人で使用する体制とし、1班3名・全4班構成、計12名を定員とした。これにより、各班に1台のPCが割り当てられた。

研修会の対象者として、EHECのMLVA法を導入予定の地衛研等の検査機関、または人事異動等により新たに本法の担当となった職員を想定し、以下の①または②のいずれかに該当する者を要件とした。

- ①今後、MLVA法の導入を予定している、または導入から3年以内の地衛研等の職員
 - ②MLVA法の実施経験が3年以内の職員
- 要件に基づき研修生を選考することで、研修の必要性が高い職員が優先的に参加できるように配慮した。

(3) 研修生の選考

研修会の募集及び参加者の選定を、以下の通り実施した。令和6年10月4日(金)に、56施設の地衛研及び13施設の中核市の検査機関に対して研修会の実施を通知し、同年11月15日(金)を申込締切日とした(図1(A))。申込時には、募集要件を満たしているか、つまり、施設のMLVA法導入年数や職員の経験年数を申告させることで、研修参加の必要性を評価した。さらに、これまで本研究班が実施してきた精度管理への参加状況も選考の要素とした。つまり、過去に落選または未参加の施設を優先することで、教育訓練を受ける機会の均等化を図った。

(4) アンケートによる評価

研修会終了後、参加者を対象にアンケートを実施した(図1(A))。アンケートでは、研修会全体に関する項目として、「時期」、「日数」、「カリキュラム内容」、及び「Zoomによる講義視聴環境」のそれぞれについて、適切であったか、または問題があったかを選択形式で評価させた。各講義・実習については、「理解度」、「業務への活用の可能性」、「内容の量」、及び「進行速度」に関して選択形式で評価を求めた。さらに、研修会全体の項目及び各講義・実習について、自由記述欄を設け、感想や要望を記載させることで、選択結果の背景や根拠を把握できるようにした。提出されたアンケートを評価し、研修会の問題点を明らかにした。

(5) 落選者へのフォロー対応

研修会に参加できなかった落選者に対しては、録画した講義動画の視聴機会を提供する対応を行った(図1(A))。集合形式で実施した2日目の講義についても、Zoomを用いて録画・編集を行い、初日及び2日目に実施されたバイオリスク管理を除く講義について、感染研 感染症危機管理研究センターがアカウントを持つ動画配信サイトを通じて公開する計画とした(表1(A))。落選者には、講義資料の配布と併せて、当該サイトのURLを案内する予定で準備を進めた。

2. トラブルシューティング集の改訂

研修生から募った日常検査における質問や問題点を、研修会での解説とは別に、トラブル事例の題材としても活用した(図1(B))。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、昨年度に作成したトラブルシューティング集に組み込んだ。

C. 研究結果

1. MLVA 法の研修会の実施

(1) 研修生の選考

22施設の地衛研及び2施設の中核市の検査機関から応募があり、全ての施設が参加要件を満たしていた。教育訓練の機会均等を重視し、本研究班がこれまで実施してきた精度管理試験に一度も参加していない4施設の内、3施設を研修会参加とした。残る1施設については、MLVA法の導入の目途が立っていないため、参加対象外とした。また、昨年度の精度管理試験に応募したものの選外となった4施設については、機会均等化の観点から本研修会に参加とした。加えて、昨年度の試験において不正解であった1施設は、検査精度向上の必要があると判断し、参加とした。さらに、昨年度に作成したトラブルシューティング集において事例を提供した4施設については、MLVA法の実施に課題を抱えている可能性があると考え、参加とした。最終的に12施設を参加としたが、その内、1施設の参加者が体調不良により参加を辞退したため、一昨年度の精度管理試験には参加したが、昨年度は不参加の1施設を繰り上げて参加とした。

(2) 研修会の実施

研修会は予定通り実施されたが、実習の一部においてトラブルが発生した(表1(A))。2日目は、PCR産物の電気泳動まで大きな問題なく進行した。しかし、3日目に電気泳動で得られたデータをGeneMapperで解析した際(区分:実習④)、大半のデータにおいて図2(A)に示すようなトラブルが発生した。具体的には、遺伝子増幅産物及びサイズスタンダードを含むほぼ全てのピークの根元に小さなピークが出現し、GeneMapperにおいてはSQ(Size Quality)がエラーと判定された。エラーと判定されたデータは自動でサイジングされないため、サイズスタンダードの手動補正が必要となり、解析作業の進行に支障をきたした。本実習では、Panel及びBinファイルのインポート、ピークのサイジング、Binの修正、電気泳動データの解析、さらにトラブル事例由来のデータの解釈を行う予定であった。しかし、上述のトラブルにより、トラブル事例由来のデータの解釈には至らず、他の項目も一部短縮せざるを得なかった。また、研修会の最後には、事前に募集した日常検査における質問や問題点について、全て解説を行った(実習⑤)が、寄せられた質問等は、「ダブルピーク等の複数ピー

クの判定」、「Binから外れたピークの判定」、「蛍光強度が低いピークの判定」及び「その他」の4つに大別された。なお、GeneMapperによる解析(区分:実習④)でのトラブルの影響もあり、研修会の終了は予定より30分遅れた。

研修会終了後に以下の対応を行った。まず、GeneMapper実習(表1(A)、区分:実習④)で取り扱えなかった内容へのフォローとして、実習で使用予定だったデータ及び模範回答を各研修生に送付し、必要に応じて質問も受け付けた。次に、サンガーシーケンサーのメーカー担当者に協力を依頼し、研修後にトラブルシューティングを実施したが、現時点で、明確な原因は特定できていない。当初は、研修で使用したシーケンサーがキャピラリー及びバッファーマー型のカートリッジ式であったことから、カートリッジ自体の異常も疑われた。しかし、メーカーにカートリッジを返却し、解析を依頼したところ、異常は確認されなかった。そこで、サンプルやバッファーマーに装着したセプターの汚染が原因である可能性が考えられたが、洗浄後のセプターで再解析を行っても現象の改善は見られなかった。

(3) アンケートによる評価

研修生全員からアンケートの提出があった。研修会全体に関する項目では、「時期」及び「Zoomによる講義視聴環境」について、90%以上の評価が得られた(図3、表1(A))。一方で、開催時期の変更を希望した1名は、自由記載欄に「年度後半の開催では、参加後に異動により担当者が変わる可能性があるため」と記載していた。また、「時期は適切」と回答した参加者からも、「MLVA法の新任者として業務を始め、疑問や課題が生じ始めた夏頃の開催でも良かった」との意見があった。「日数」については、4名が「短い」と回答し、3名が「カリキュラムの変更」を要望した。これら7名の内、6名は、自由記載欄で「GeneMapperによるデータ解析(区分:実習④)等の実習の時間が不足している」と回答した。残る1名からは、「MLVA法の結果を保健所へ適切に説明する方法など、結果の活用方法に関する講義を加えてほしい」との要望があった。

各講義・実習に対する評価では、全ての講義及び実習において、「理解度」及び「業務への活用」について「理解できた」以上の回答が100%、またはほぼ100%だった(表1(A)、図4(A、B))。しかし、各講義・実習の「内容の量」及び「進行速度」に関しては、GeneMapperによる解析(区分:実習④)について半数以上の研修生が「少なすぎる」及び「早すぎる」と回答した。事前に募った質問等への回答(区分:実習⑤)においても、一定数の研修生が同様に「少なすぎる」及び「早すぎる」と回答した(表1(A)、図4(C、D))。これら以外の講義・実習については、「講義の量」及び「進行速度」が「適切」との回答が100%、またはほぼ100%であった。

各講義・実習についての自由記述欄では、

GeneMapperによる解析(区分:実習④)については、10名の研修生から意見が寄せられた。この内、8つの意見は「解析時間が足りない」との内容だったことから、選択形式の回答の「内容が少なすぎる」及び「進行速度が早すぎる」は、「実習内容が多いが、作業時間が短すぎた」の意味と考えられた。事前に募った質問等への回答(区分:実習⑤)では、終了時刻が遅れたため、進行速度を早くせざるを得なかった。この実習についての選択式の回答も「内容に対して時間が短かった」を示すと思われた。また、MLVA法におけるトラブルシューティング(区分:講義⑤)についても、「実際にトラブル事例への対応の実習を加えて欲しい」との意見があった。トラブル事例の対応は、GeneMapperの実習(区分:実習④)内で行う予定だったが、時間が足りずに実施できなかった。その他、各講義・実習について、幾つかの要望があり、講師にフィードバックした。

(4)落選者へのフォロー対応

録画した講義については、編集後に動画配信サイトへのアップロードを試みたが、令和7年度から感染研が新機構へ移行することに伴い、同サイトのURLが変更される可能性があることが判明した。そのため、動画の配信は令和7年度以降に延期された。現在、令和7年5月から7月までの期間での配信を予定している。なお、講義資料については令和7年3月中旬に落選者に送付した。

2. トラブルシューティング集の改訂

昨年度に作成したトラブルシューティング集について、3つの事例及び解決法を追加した(図2(B))。大分類A「ピークが検出されない」においては、小分類として「プラスミドの脱落によるTRが検出されない事例」を新たに追加した。次に、大分類D「非典型的ピークの出現」には、小分類として「ダブルピーク等の複数ピークの判定」に加え、本研修においても確認された現象である「スタンダードピークの根元に小さなピークが立つ現象(図2(A))」を追加した。この現象は、バッファに取り付けるセプターの汚染、つまり、前の検体を解析時にキャピラリーに付着したサイズスタンダードがセプター内に残留することが原因となり得る。特に、セプター内の特定のスリットが汚染されている場合、そのスリットを経由するキャピラリーにおいては、常に同様の現象が観察されることから、原因推定の手掛かりとなる。

D. 考察

本年度のMLVA法研修会では、参加対象を明確に定めたことで、ニーズの高い研修を実施することができた。講義及び実習を通じて、学習効果の高い指導が行われたが、一部の实習では時間が不足していたとの意見が見られた。そこで、研修終了後にはデータと模範回答を送付する等のアフターフォローを実施し、理解の定着を図った。これら

の結果を踏まえ、時間配分や構成を見直し、今後の研修会に向けた改良版カリキュラムを構築した(表1(B))。

研修会に対して高いニーズの根拠として、全国の地衛研等から24施設の応募があった点が挙げられる。参加条件として、MLVA法の実施経験が3年以内の職員を対象としたが、それにも関わらず多数の応募があったことは、地衛研における人事異動が頻繁に行われている実態を反映している⁴⁾。これは、MLVA法の継続的な技術習得支援が求められていることを示している。

研修後のアンケート結果からは、全ての講義及び実習において「理解できた」「業務に活用できる」との評価が得られ、学習効果の高い指導が実施できたことが確認された。一方で、GeneMapperによる解析や事前に募った質問への対応に関しては、時間が不足していたとの指摘が複数寄せられた。これを受け、補足資料の提供や質疑応答による個別フォローを行い、内容の補完に努めた。事前に収集した質問の内、「ダブルピーク」、「Binから外れたピーク」及び「蛍光強度の低いピーク」の判定の3分類は、いずれもGeneMapperでの解析に関連していた。また、改訂されたトラブルシューティング集に収録された13の事例の大半も、GeneMapperを適切に使用することで原因を推定できる。これらの結果から、地衛研等でのMLVA法の運用では、解析ソフトの操作技術の習得が極めて重要であることが示唆された。

GeneMapper実習(表1(A)、区分:実習④)及び事前質問への回答(区分:実習⑤)については、いずれも理解度及び業務への活用可能性の評価が高く、実習内容自体には大きな問題はなかったと考えられる。一方で、これらの実習については「実習内容が多く、作業時間が足りなかった」との指摘が多数寄せられ、時間配分に課題があることが明らかとなった。特に、GeneMapper実習では、1班3名に対して1台のGeneMapper搭載PCを割り当て、研修生が交代で作業を行った。PCの台数を増やすことでこの問題は一定程度解消可能であるが、メーカー及び感染研内からの借用を試みた結果、確保できたのは最大5台に留まった。このため、ハードウェアの制約を補うために、研修全体の構成を見直す必要が生じた。

そこで、時間配分の改善を目的として、改良版の研修会を構築した(表1(B))。具体的には、1日目にZoomによる講義を集中的に実施し、2日目及び3日目の集合型研修では、講義と並行して十分な実習時間を確保する構成とした。GeneMapper実習(区分:実習④)については、「Panel及びBinのインポート＋サイジング」「Binの修正＋データ解析」「トラブル事例への対応」の三部構成とし、従来の2時間から合計5時間へと大幅に拡充した。また、同様に時間不足の指摘があった事前質問への回答(区分:実習⑤)についても、従来の30分から1時間へと延長し、研修生の理解促進を図った。

本研究班では、GeneMapperの操作や

MLVA法における解析上の課題に対応するため、トラブルシューティング集を作成してきた。これらは実技を伴わないため、技術習得という観点では実習に劣るものの、解析ソフトや機器といったハード面での制約を受けずに活用できる点で、検査精度の向上に有用な教育資材である。特に、地衛研等においては人事異動が頻繁に発生し、経験年数の少ない職員が多く配置される現状がある⁴⁾。そのような状況下では、現場で遭遇するトラブルを自らの経験として蓄積することが難しく、あらかじめ事例と対応策が整理された教材の活用が重要となる。

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

E. 結論

MLVA法研修会の実施及び研修会後のアフターフォローにより、一定の学習効果がある指導を行えた。アンケート結果を評価したことで、研修会カリキュラムの問題点を明らかにし、改良版カリキュラムの構築に繋げた。また、研修会参加者からMLVA法の日常検査における質問や問題点を募ったことで、トラブルシューティング集を充実させた。

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。また、研修会での講義動画の公開にご尽力いただいております同所感染症危機管理研究センターの吉見逸郎先生ならびに吉松芙美先生にも、厚く御礼申し上げます。本研修会において使用したGeneMapperの借用に際し、サーモフィッシャーサイエンティフィック社のご厚意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法研修会に応募、またはご参加くださっ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) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 3) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40(5): 83-85, 2019
- 4) 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

H. 健康危険情報

なし

(A) 研修会の概要

(B) トラブルシューティング集の改訂

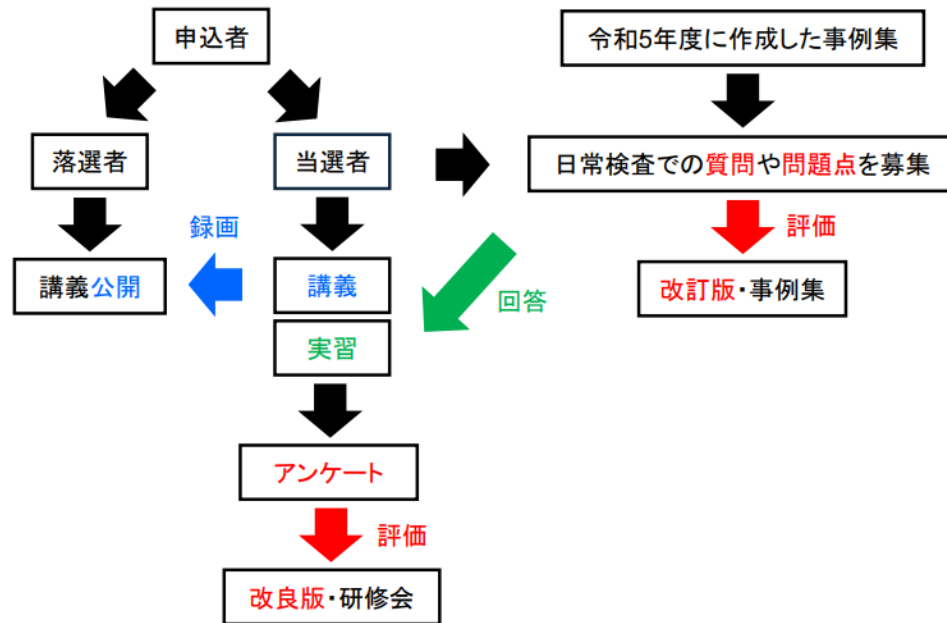
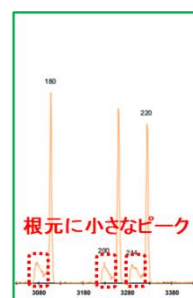
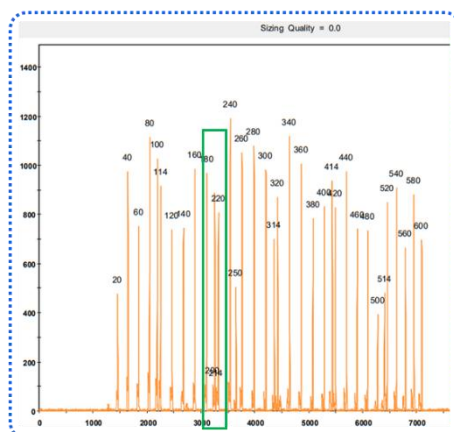


図1 本年度の活動概要

(A) トラブルの一事例



(B) 目次

目次

A : ピークが検出されない

- 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
- 3 : プラスミドの脱落

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
- 3 : 複数ピークの判断
- 4 : スタンダードピークが割れる

E : 疫学的関連性が無い菌株間でのMLVA型の一致

- 1 : 蔓延菌株

図 2 トラブルシューティング集の改訂

(B)の赤点線は追加した事例を示す。

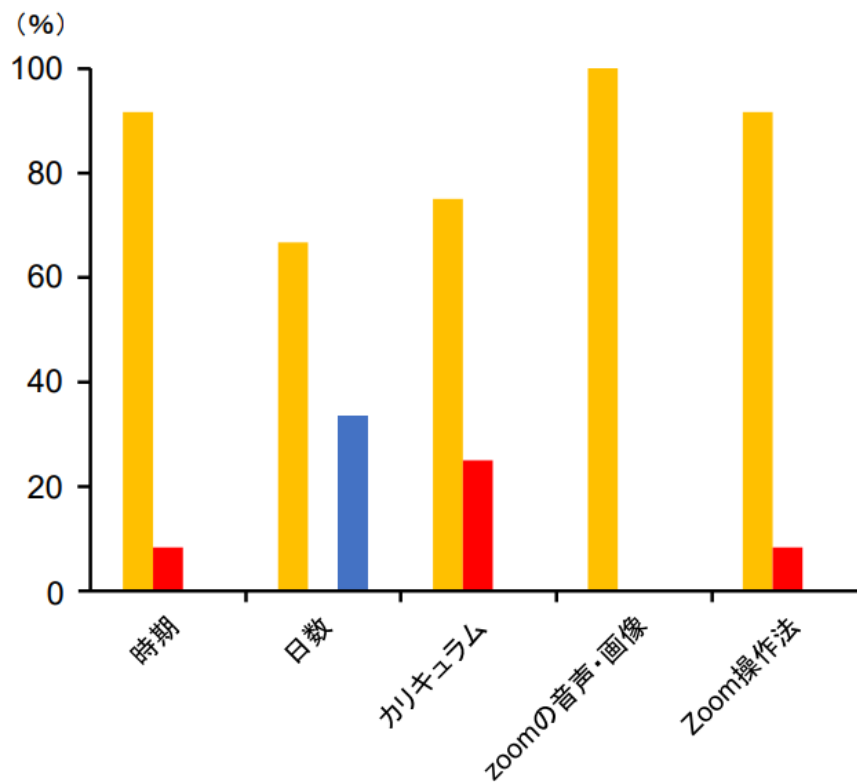
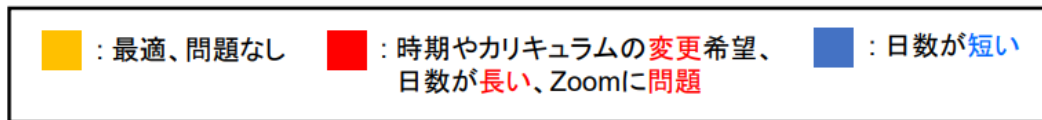
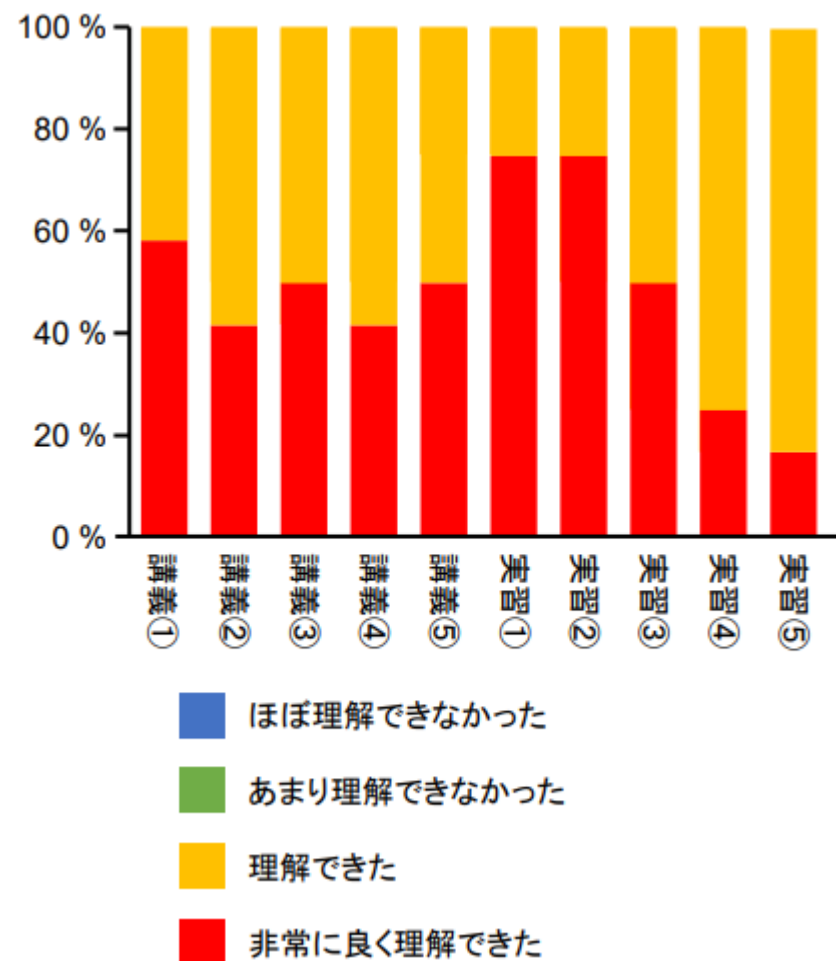


図 3 反復配列多型解析 (MLVA) 法研修会全体における評価

(A)理解度



(B)業務への活用

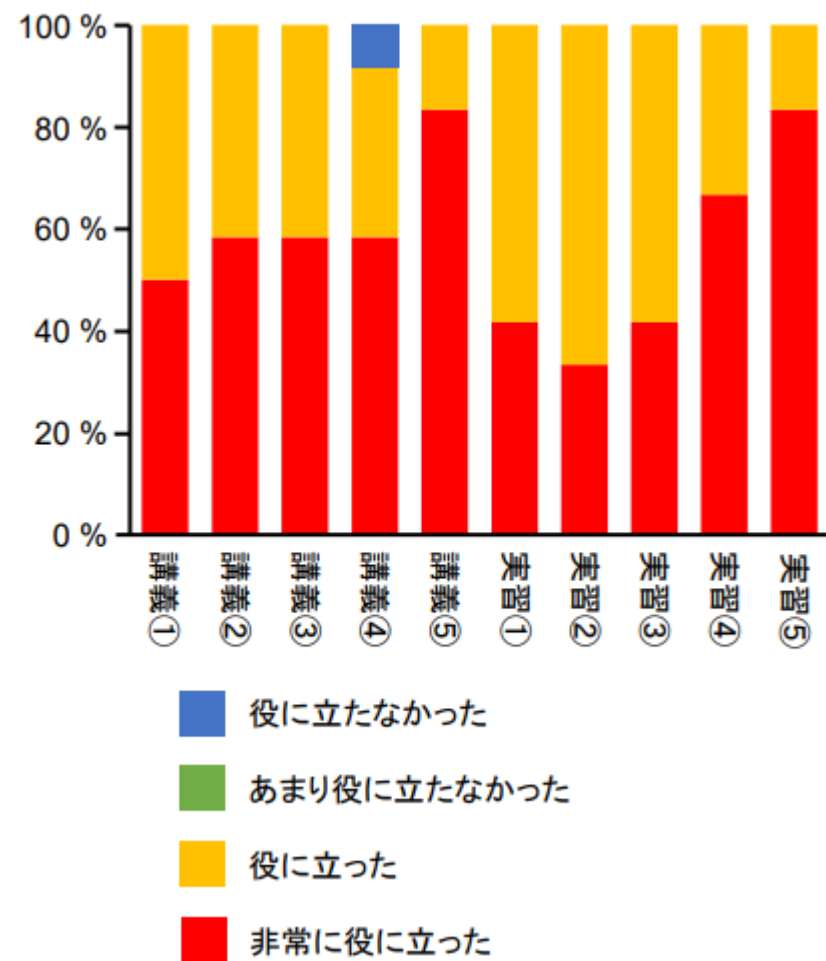
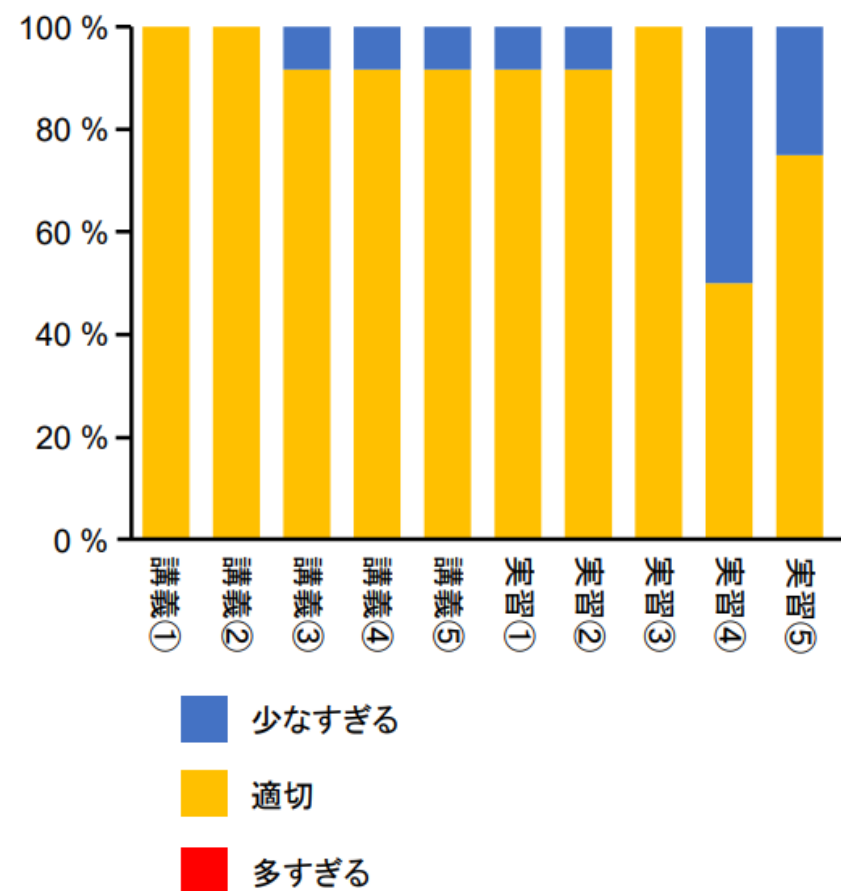


図4 MLVA 法研修会の各講義・実習における評価

横軸に記載されている各棒の下項目は表1の区分に該当する。

(C) 講義・実習の量



(D) 講義・実習の速度

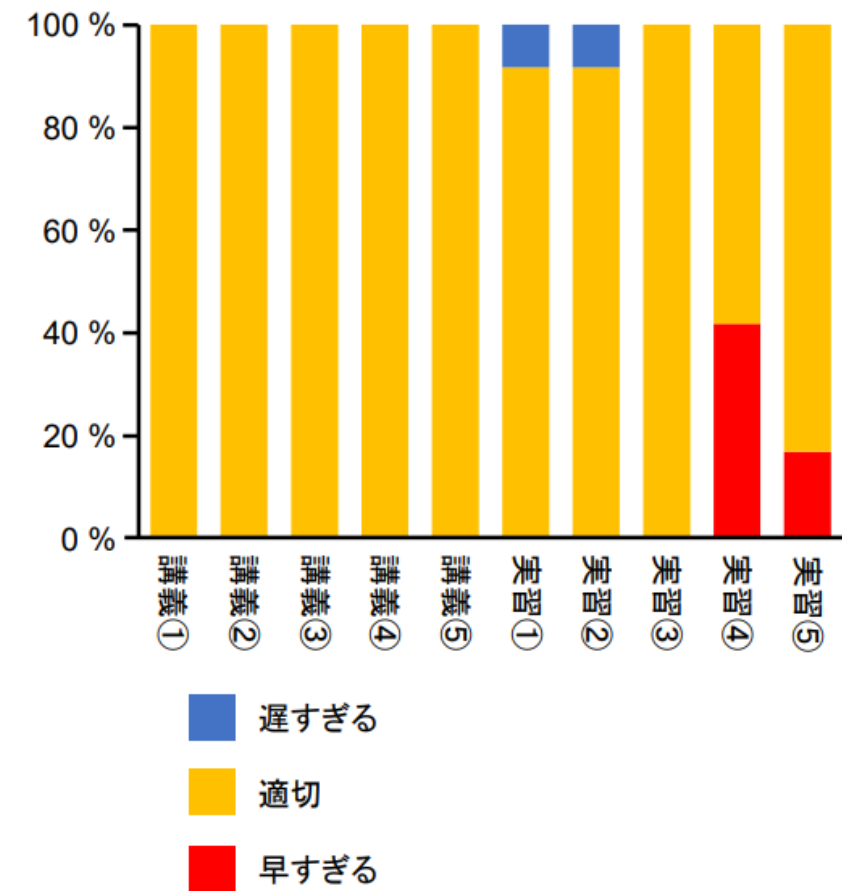


図 4(続き) MLVA 法研修会の各講義・実習における評価

横軸に記載されている各棒の下は表 1 の区分に該当する。

表 1 MLVA 法研修会で実施されたカリキュラム及び改良版カリキュラム

(A)実施したカリキュラム

1 日目: Zoom

時間	区分	題名	内容
13:00-13:05 (5 分)	その他	開会挨拶	-
13:05-13:30 (30 分)	その他	オリエンテーション	-
13:30-15:00 (1 時間 30 分)	講義①	バイオリスク管理	BSL2 施設を利用するための教育訓練
15:00-15:15 (15 分)	その他	休憩	-
15:15-16:15 (1 時間)	講義②	EHEC O157、O26、O111 の MLVA 法	MLVA 総論・各論

2 日目: 集合

時間	区分	題名	内容
10:00-10:10 (10 分)	その他	庁舎利用の説明	-
10:10-11:00 (50 分)	実習①	菌株培養液からの DNA 抽出	DNA 抽出にキレックス樹脂を利用
11:00-12:00 (1 時間)	実習②	PCR 反応	異なるメーカーのマルチプレックス PCR 酵素を使用して比較
12:00-13:00 (1 時間)	その他	休憩	-
<u>13:00-14:00 (1 時間)</u>	<u>講義③</u>	<u>MLVA 法の異同判定^a</u>	<u>MLVA 法の結果の解釈</u>
<u>14:00-14:30 (30 分)</u>	<u>講義④</u>	<u>MLVA 法で使用する代替・解析ツールの紹介^a</u>	<u>MLVA 法のツールの紹介</u>
<u>14:30-15:00 (30 分)</u>	<u>講義⑤</u>	<u>MLVA 法におけるトラブルシューティング^a</u>	<u>MLVA 法でのトラブルと解説法</u>

^a (A)の集合型から(B)の Zoom での講義に変更。下線で表記。

表 1(続き) MLVA 法研修会で実施されたカリキュラム及び改良版カリキュラム

(A)(続き)実施したカリキュラム

2 日目: 集合

時間	区分	題名	内容
15:00-15:20(20 分)	その他	休憩	—
15:20-16:00(40 分)	実習③	PCR 産物の電気泳動	SeqStudio を使用
16:00-16:30(30 分)	その他	質疑応答	—

3 日目: 集合

時間	区分	題名	内容
<u>10:00-12:00(2 時間)</u>	<u>実習④</u>	<u>GeneMapper による MLVA 法データの解析^b</u>	<u>Panel 及び Bin のインポート/ サイジング/ Bin の修正/ データの解析/ トラブル事例への対応</u>
<i>12:00-12:30(30 分)</i>	<i>実習⑤</i>	<i>事前に募集した質問や問題点へ回答^c</i>	<i>日常検査での疑問点を募集</i>

^b (B)では、3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加。二重下線で表記。

^c (B)では、時間を 1 時間に増加。斜字で表記。

表 1(続き) MLVA 法研修会で実施されたカリキュラム及び改良版カリキュラム

(B)改良版カリキュラム

1 日目: Zoom

時間	区分	題名	変更内容
10:00-10:05(5 分)	その他	開会挨拶	開始時間を 10 時に変更
10:05-10:30(30 分)	その他	オリエンテーション	—
10:30-12:00(1 時間 30 分)	講義①	バイオリスク管理	—
12:00-13:00(1 時間)	その他	休憩	—
13:00-14:00(1 時間)	講義②	EHEC O157、O26、O111 の MLVA 法	—
<u>14:00-15:00(1 時間)</u>	<u>講義③</u>	<u>MLVA 法の異同判定^a</u>	<u>Zoom に変更(2 日目から 1 日目に移動)</u>
15:00-15:15(15 分)	その他	休憩	—
<u>15:15-15:45(30 分)</u>	<u>講義④</u>	<u>MLVA 法で使用する代替・解析ツールの紹介^a</u>	<u>Zoom に変更(2 日目から 1 日目に移動)</u>
<u>15:45-16:15(30 分)</u>	<u>講義⑤</u>	<u>MLVA 法におけるトラブルシューティング^a</u>	<u>Zoom に変更(2 日目から 1 日目に移動)</u>

^a (A)の集合型から(B)の Zoom での講義に変更。下線で表記。

2 日目: 集合

時間	区分	題名	変更内容
10:00-10:10(10 分)	その他	庁舎利用の説明	—
10:10-11:00(50 分)	実習①	菌株培養液からの DNA 抽出	—
11:00-12:00(1 時間)	実習②	PCR 反応	—
12:00-13:00(1 時間)	その他	休憩	—

表 1(続き) MLVA 法研修会で実施されたカリキュラム及び改良版カリキュラム

(B)(続き)改良版カリキュラム

2 日目:集合

時間	区分	題名	変更内容
<u>13:00-15:00(2 時間)</u>	<u>実習④</u>	<u>GeneMapper による MLVA 法データの解析^b</u>	<u>3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加 Panel 及び Bin のインポート/サイジング</u>
15:00-15:20(20 分)	その他	休憩	-
15:20-16:00(40 分)	実習③	PCR 産物の電気泳動	-
16:00-16:30(30 分)	その他	質疑応答	-

3 日目:集合

時間	区分	題名	変更内容
<u>10:00-12:00(2 時間)</u>	<u>実習④</u>	<u>GeneMapper による MLVA 法データの解析^b</u>	<u>3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加 Bin の修正/ データの解析</u>
12:00-13:00(1 時間)	その他	休憩	-
<u>13:00-14:00(1 時間)</u>	<u>実習④</u>	<u>GeneMapper による MLVA 法データの解析^b</u>	<u>3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加 トラブル事例への対応</u>
<u>14:00-15:00(1 時間)</u>	<u>実習⑤</u>	<u>事前に募集した質問や問題点へ回答^c</u>	<u>1 時間に増加</u>

^b (B)では、3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加。二重下線で表記。

^c (B)では、時間を 1 時間に増加。斜字で表記。

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

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した。まず、1 地域各 50 検体を収集し増菌培養後ベロ毒素遺伝子 (*stx*) 陽性率を求めた (A 市 0%、B 市 38%)。 *stx* 陽性 19 検体から計 9 株の EHEC 株が分離された。また、2023 年に主に子ウシ舎での業務にあたっていた従業員が EHEC 感染症 (O26, *stx1*) に罹患した農場において、子ウシからの糞便 30 検体を収集し解析した。結果、22 検体で PCR 法陽性を確認し、14 検体から *stx* 陽性菌株 15 株の分離に成功した。その内 O26, *stx1* 陽性 1 株について MLVA を実施したところ、2023 年の従業員由来分離株と 1 loci 違いだった。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

2023 年に引き続き、沖縄県における人口あたり EHEC 報告数及びウシ飼養数の多い 2 つの離島地域に焦点をあて 2024 年 4 月から 9 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。なお、2023 年

にも同数の検体を収集しており、累計で 200 検体となった。

加えて、2023 年に主に子ウシ舎での業務にあたっていた従業員が EHEC 感染症 (O26, *stx1*) に罹患した農場において、子ウシからの糞便 30 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°C、42°C で一晩培養した。

リアルタイム PCR によるベロ毒素遺伝子 (*stx*) スクリーニング：培養液をボイルし DNA を抽出後、*stx* 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、*stx*, *eae* 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。

stx 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℃ で保存した。

子ウシから分離した O26, *stx1* 陽性 1 株については、患者との遺伝的関連を確認するため、MLVA 法を実施した。

2023 年、2024 年に分離された株については、本研究班分担研究者の中村 (九州大学) へ送付し、Nanopore シーケンサーによりゲノム解析を実施し、血清型、*stx* subtype, *eae* type を決定した。

(倫理面への配慮)

C. 研究成果

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 培地を用いて培養した増菌液から DNA を抽出し、*stx* 検出リアルタイム PCR を実施した結果、2024 年に収集した 100 検体中 19 検体で *stx* が検出された。*stx* 陽性となった検体はすべて B 市で収集された検体だった。*stx* 陽性検体から *stx* 保有菌株の分離を試みたところ、9 株の EHEC が分離された。2023 年と 2024 年を合わせると、*stx* 陽性は、A 市 100 検体中 6 検体、B 市 100 検体中 45 検体であり、A 市からは 2 株、B 市からは 22 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、2024 年は、Og157 が 2 株分離されたが、7 株はシグナルを得ることができず、MP1 Plus で推定

できる O 群以外であると判定した (OgNT)。2023 年の結果と合わせると 24 株中 19 株が OgNT、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。

stx1 陽性株が 2 株 (22.2%)、*stx2* 陽性株が 8 株 (88.9%)、うち両毒素遺伝子陽性株は 1 株であった。*eae* 陽性株は 3 株 (33.3%) 存在した。2023 年と 2024 年の分離株のゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 19 株は 13 種類の血清型に分けられ、2 株は O 型別不能 (OUT) だった。その内訳を表 2 に示した。

EHEC 陽性患者が従事した農場の子ウシの EHEC 保有率とヒト由来株との遺伝的関連

ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いて培養した増菌液から DNA を抽出し、*stx* 検出リアルタイム PCR を実施した結果、30 検体中 22 検体 (73.3%) で *stx* が検出された。*stx* 陽性検体から *stx* 保有菌株の分離を試みたところ、14 検体 (46.7%) から 15 株の EHEC が分離された。その内訳は OgNT, *stx2* 陽性が 11 株、OgNT, *stx1*, *eae* 陽性が 3 株、Og26, *stx1*, *eae* 陽性が 1 株だった。ゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 14 株は 7 種類の血清型に分けられ、O116:H16, *stx2a* 陽性が 7 株だった。その内訳を表 3 に示した。なお、OgNT, *stx2* 陽性だった 1 株は現在再度ゲノム解析中である。

このうち、O26:H16, *stx1a* について、MLVA を実施したところ、当該農場の子ウシ舎で業務していた EHEC 陽性患者と 17 loci 中 16 loci が一致し、不一致だった loci (O157-9) は 1 リピート違いだった。

D. 考察

2024 年は、100 頭のウシ糞便検体から 9 株の EHEC (STEC) が分離され、2023 年の 15 株

と合わせて累計 24 株の分離に成功した。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中村（九州大学）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（九州大学）と共有した。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。

EHEC 患者が従事していた農場における子ウシ糞便の *stx* 陽性率は 73.3%と非常に高かった。2023 年に分離されたヒト患者由来株と 2024 年に分離された子ウシ由来株 (O26:H16, *stx1a* 陽性は近縁な系統であることが MLVA により明らかとなり、当該患者はウシから感染したことが疑われた。これらの結果を当該農場主、農場管理獣医師、保健所へ情報共有し、農場従業員へ EHEC 感染症の注意喚起を行った。また、約一年間近縁な系統が農場で維持されていたことから、今後、同農場で、母ウシおよび子ウシから EHEC を分離し、遺伝的系統を比較することで、EHEC の農場内汚染実態の把握と、感染経路の推定を行い、具体的な対

策に活かす予定である。

沖縄県のヒトの EHEC 感染症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
2023 年から 2024 年までに、ウシ糞便から EHEC 株の分離を試み 24%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 0 件
2. 学会発表 0 件
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

表 1 ウシ由来 EHEC 分離株の性状

地域	O-genotyping	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2023	2024
A	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0
A	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0
B	Og157		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2	2
B	OgNT		<i>stx2</i>		5	5
B	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0
B	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		1	1
B	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	2	1

B	OgNT	<i>stx1</i>			1	0
B	O111	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0

表 2 ゲノム解析によるウシ由来 EHEC 分離株の血清型、*stx* typing

地域	血清型	<i>stx1</i> subtype	<i>stx2</i> subtype	<i>eae</i> type	2023 年	2024 年
A	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	0
A	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	1	0
B	O157:H7		<i>stx2c</i>	<i>gamma1</i>	2	2
B	O109:H16		<i>stx2a</i>	-	2	0
B	O174:H21		<i>stx2c</i>	-	1	0
B	O104:H7		<i>stx2a</i>	-	1	0
B	O111:H8	<i>stx1a</i>		<i>theta</i>	1	0
B	O177:H25		<i>stx2c</i>	<i>beta1</i>	1	0
B	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	1
B	O88:H25	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	1	0
B	O181:H49		<i>stx2a</i>	-	0	1
B	O181:H51		<i>stx2a</i>	-	1	0
B	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	0	0
B	OgGp3(O118/O151):H16	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1	0
B	O8:H4	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>	-	0	1
B	O8:H8		<i>stx2a, stx2d</i>	-	0	1
B	O171:H2		<i>stx2d</i>	-	0	2
B	OUT:H20		<i>stx2g</i>	-	0	1
B	OUT:H7	<i>stx1a</i>		-	1	0

表 3 ゲノム解析による子ウシ由来 EHEC 分離株の血清型、*stx* typing

血清型別	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	検出数
O26:H11	<i>stx1a</i>			1
O104:H7		<i>stx2a</i>	-	1
O116:H16		<i>stx2a</i>	-	7
OgGp3(O118/O151):H16	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1
O171:H2		<i>stx2d</i>	-	1
O5:H9	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1
O84:H2	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

1. Matsumoto Y., Lee K., Akasaka R., Honjo H., Koizumi M., Sato T., Kubomura A., Ishijima N., Akeda Y., Ohnishi M., and Iyoda S. Increased resistance against tellurite is conferred by a mutation in the promoter region of uncommon tellurite resistance gene *tehB* in the *ter*-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7. 2024. *Appl Environ Microbiol* 90:e0228323.
2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2023 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 45 巻、80-82、2024 年 5 月

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆宇

次の職員の令和6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事
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和7年4月1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6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 隆宇

次の職員の令和6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
- 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
(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6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6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 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 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6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。