

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7年度 総括研究報告書

研究代表者 明田 幸宏

別紙 2

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. 2025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7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 国立健康危機管理研究機構 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（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所応用疫学研究センター） 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（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所検査診断技術部） 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（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 細菌第一部） 泉谷秀昌（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 細菌第一部） 土橋西紀（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 加藤博史（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 八幡裕一郎（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 村井 達哉（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 実地疫学研究センターFETP） 高橋 琢理（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 感染症サーベイランス研究部） 高原 理（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 感染症サーベイランス研究部） 佐藤 梢（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所検査診断技術部） 松山 満貴（長野県環境保全研究所 感染症部） 重村 洋明（福岡県保健環境研究所 保健科学部） 久手堅 剛（沖縄県衛生環境研究所）

平良 遙乃（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：

本研究班では、腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) 感染症・食中毒に対する分子疫学サーベイランス体制の高度化を目的として、MLVA 法および全ゲノム解析 (WGS) を基盤とした解析体制の整備、広域食中毒アラートシステムの運用、ならびにヒト・動物由来株の分子疫学解析を実施した。全国の EHEC 分離株に対する MLVA 解析では、2025 年分離株 3,168 株を解析するとともに、地方衛生研究所から送付された 0157、026、0111 の MLVA データ約 1,700 株について型名付与を行った。また、MLVA 法の精度向上を目的として、GeneMapper 解析実習を強化した研修会を実施し、公開ゲノムデータを用いた *in silico* MLVA 解析により、0145 および 0165 における型別性能評価を行った。また WGS 解析基盤の整備としては、広域食中毒調査に活用可能な SNP 解析パイプライン「SNPcaster」を改良し、正式版 (v1.0) を公開した。新たに薬剤耐性遺伝子検出機能や専用サポートチャットボット (SNPcaster-GPT) を実装し、地方衛生研究所職員向け講習会や動画配信を通じて普及を進めた。また、Nanopore シーケンサー由来リードのみを用いた高精度 WGS 解析の有用性についても検証を行った。さらにヒト・動物・食品由来株を対象とした解析では、牛由来 EHEC 0157 株において *stx* subtype 保有パターンと系統学的背景との関連性が示唆された。また、市販牛関連食品および牛盲腸から多様な EHEC 株が分離され、一部にはヒト感染症との関連が懸念される血清群・遺伝子型が含まれていた。離島コホート研究では、ウシ由来 STEC 株を多数分離し、一部の 0157:H7 株が過去のヒト集団感染事例株と近縁であることが示された。さらに、ウシ由来 EHEC 株および *Campylobacter jejuni* 株の完全長ゲノム配列を構築し、WGS データベースへ組み込んだ。広域食中毒アラートシステムでは、NESID データと MLVA・WGS 情報を統合した週次解析を継続し、0157VT2 等による複数の広域散発疑い事例を検知した。また、*Campylobacter jejuni* 感染後に発症するギラン・バレー症候群 (GBS) の疫学調査を実施し、GBS 高リスク遺伝型の存在を確認した。

以上より、本研究班は、MLVA 法と WGS 解析を組み合わせた高精度な EHEC 分子疫学サーベイランス体制を整備するとともに、ヒト・動物・食品由来株を横断したワンヘルス型解析基盤を構築し、広域食中毒の早期探知および原因究明に資する重要な知見を得た。

A. 研究目的

本研究班では、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症・食中毒の早期探知、感染源解明、および迅速な行政対応に資する分子疫学サーベイランス体制の高度化を目的として、MLVA 法および全ゲノム解析 (WGS) を基盤とした解析・情報共有基盤の整備を行う。具体的には、全国の地方衛生研究所で実施される MLVA 解析データの集約・解析、検査精度向上のための研修・精度管理、ならびに WGS 解析パイプラインおよびデータベースの構築・標準化を推進し、国際整合性を有するクローン判定基準の確立を目指す。

また、患者由来株に加え、食品・動物由来株の分離およびゲノム情報の収集を進め、ヒト・食品・動物を横断した One Health 型の分子疫学解析基盤を構築する。特に、牛由来 EHEC 株や沖縄県離島における STEC コホート研究を通じて、感染源や感染経路に関する知見を蓄積し、ヒト感染事例との関連性を明らかにすることを目指す。

さらに、NESID 等の患者発生情報と MLVA・WGS 等の分子疫学情報を統合した広域食中毒アラートシステムを運用し、広域散发事例や集団感染の早期探知とリスク評価体制の構築を進める。加えて、カンピロバクター感染症後に発症するギラン・バレー症候群 (GBS) も含め、病原体情報・疫学情報・臨床情報を統合的に解析し、食品衛生対策および感染症対策に資する One Health 型の情報共有・リスク評価体制の確立を目指す。

B. 研究方法

(MLVA 法による型別、ゲノム解析パイプライン構築、評価)

1. MLVA 法による型別評価

感染症研究所に送付された 2025 年分離の腸管出血性大腸菌 (EHEC) 株に対し、Izumiya らの方法に準拠して MLVA 解析を実施した。血清群 O157、O26、O111 では 17 遺伝子座、O103、O121、O145、O165、O91 では 43 遺伝子座を対象とした。また、地方衛生研究所から送付された MLVA データについても解析を行い、型別評価を実施した。

2. 解析パイプラインの改良および機能追加
前年度までのフィードバックをもとに解析パイプライン「SNPcaster」を改良し、GitHub 上でベータ版 (v0.9) を公開した。さらに、NCBI AMRFinderPlus を用いた薬剤耐性遺伝子・病原性遺伝子検索機能、および SRA Toolkit による NCBI Sequence Read Archive (SRA) からのショートリードデータ自動取得機能を追加した。加えて、マニュアル補完を目的として、ChatGPT のカスタム GPT 機能を利用したサポートチャットボット「SNPcaster-GPT」を作製した。

3. 講習会の実施

解析パイプラインのインストール方法および操作方法に関する講習会を、2025 年 12 月 24 日に国立感染症研究所戸山庁舎にて対面および Zoom 配信形式で実施した。また、講習内容を説明動画として作成し、YouTube 限定公開により配信した。

4. SNP 解析性能評価

SNPcaster の性能評価として、Snippy、Lyve-SET、Parsnp との比較解析を行った。シミュレーションデータを用いて、*Escherichia coli*、*Campylobacter jejuni*、*Legionella pneumophila*、*Neisseria gonorrhoeae*、

Staphylococcus aureus の5菌種を対象に、参照配列との類似性が異なる条件下で感度および陽性的中率 (PPV) を比較した。また、公開 EHEC ベンチマークデータセットを用い、集団感染事例株間の pairwise SNP 数を算出し、実データにおける解析性能を評価した。

(ゲノム情報収集、データベース拡充化)

1. EHEC およびカンピロバクター菌株の全ゲノム解析

沖縄県集団感染事例由来 EHEC 0157 株 18 株、離島コホート研究由来 EHEC 株 18 株、およびカンピロバクター菌株 18 株について、培養後に Genomic-Tip (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。Rapid Sequencing Kit V14 および MinION Flow Cell R10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies) を用いて Nanopore シーケンスを実施し、Dorado によるベースコール後、Hybracter パイプラインを用いてゲノム配列を構築した。必要に応じて NanoFilt によるリードフィルタリングおよび circlator による環状化処理を行った。さらに、沖縄県集団事例株については、iSeq100 による Illumina ショートリード配列を用いて配列修正を実施した。各菌株について、ECTyper および mlst プログラムを用いて血清型および Sequence type (ST) を決定し、BLASTN により stx 遺伝子および eae 遺伝子保有状況を解析した。

2. 沖縄県集団事例由来 EHEC 株の比較ゲノム解析

沖縄県集団事例由来 EHEC 菌株について、Nanopore リードのみを用いた完全長ゲノム、Illumina ショートリードによる修正版ゲノム、および Illumina ショートリードを用い

たドラフトゲノムをそれぞれ構築した。これらを用いて、dnadiff による配列比較解析を行うとともに、SNPcaster および in-house プログラムを用いて SNP 解析を実施した。さらに、検出された SNP 情報をもとに GrapeTree による Minimum Spanning Tree 解析を行い、菌株間の系統関係を評価した。また、プラスミド配列間の SNP および InDel 解析も実施し、菌株の詳細な分類に利用した。

(MLVA 法の精度管理)

1. MLVA 法研修会の実施

地方衛生研究所等における MLVA 法の検査精度向上を目的として、令和 8 年 2 月に講義および実習からなる研修会を実施した。初日は Zoom を用いた遠隔講義形式とし、MLVA 法の基礎、異同判定、トラブルシューティングについて講義を行った。2 日目および 3 日目は国立感染症研究所村山支所において集合形式で実習を行い、EHEC 0157、026、0111 菌株を用いて DNA 抽出、PCR、電気泳動、および GeneMapper による MLVA データ解析を実施した。前年度アンケート結果を踏まえ、今年度は GeneMapper 解析実習および事前質問への対応時間を拡充した。対象者は、MLVA 法導入初期段階にある地方衛生研究所等の職員とし、参加者選定は施設状況および経験年数を考慮して行った。研修終了後にはアンケート調査を実施し、理解度および実務への活用性を評価した。

2. in silico MLVA 法による性能評価

MLVA 法の性能評価を目的として、公開ゲノムデータベース (NCBI SRA) から取得した EHEC 091、0145 および 0165 株のショートリードデータを用いて in silico MLVA 解析

を実施した。取得した Illumina paired-end リードは de novo アセンブル後、in silico PCR 法により O 遺伝子型および stx 遺伝子を確認した。続いて、泉谷らの MLVA17 および MLVA43 法に基づくプライマー配列を用いて isPCR 解析を行い、各 MLVA 領域のタンデムリピート (TR) 数を算出した。さらに、多様性指数 (Simpson's diversity index) および欠損率 (null 率) を既報と比較し、MLVA 法の分解能を評価した。また、得られた MLVA プロファイルを用いて minimum spanning tree (MST) を作成し、菌株間の系統関係および分離能を評価した。

(食品関連サンプル由来 EHEC 株の収集、解析)

令和 5 年度および令和 6 年度に国内食肉処理施設へ搬入された牛の糞便由来 EHEC O157 株 41 株を対象として、MLVA 型、分離年、および stx subtype 保有パターンとの関連を解析した。令和 6 年度までに取得した MLVA 解析結果に基づき、各遺伝子座のリピート数を用いて GrapeTree による比較解析を行い、Minimum Spanning Tree (MST) を作成した。作成した MST 上に、各菌株の分離年および stx subtype 保有パターンを重ね合わせ、系統学的関連性を評価した。

2. 牛関連食品検体からの EHEC 分離

小売店で購入した牛小腸、牛大腸、牛肉製品計 49 検体、および牛盲腸 66 検体を対象として EHEC 分離を実施した。各検体は modified Tryptic Soy Broth (mTSB) 等で増菌培養後、DNA を抽出し、multiplex real-time PCR により stx、eae、および主要血清群関連遺伝子を検出した。主要血清群陽性検体については免疫磁気ビーズ法による濃

縮を行い、SMAC、CT-SMAC、CHSTEC、CT-CHSTEC 培地を用いて分離培養を実施した。培地上に形成された大腸菌様コロニーについて PCR スクリーニングを行い、stx 陽性株を分離・保存した。また、主要血清群陰性株については O-genotyping PCR を用いて O 遺伝子型を決定した。本研究では、stx 陽性大腸菌を EHEC として解析対象とした。

(離島コホート研究)

沖縄県における離島コホート研究として、人口当たりの STEC 報告数およびウシ飼養数の多い 2 地域を対象に、2025 年 5 月から 10 月にかけて調査を実施した。B 地域の食肉センターにおいてウシ糞便 50 検体を収集し、2023~2025 年の累計検体数は 250 検体となった。また、過去に STEC 感染事例が確認された B 地域農場において、2025 年は約 3 か月ごとに計 79 検体を収集するとともに、A 地域の 3 農場から 35 検体を収集した。各検体は緩衝ペプトン水 (BPW) および mEC 培地で増菌培養後、リアルタイム PCR によりベロ毒素遺伝子 (stx) のスクリーニングを行った。stx 陽性培養液については、X-MG 培地およびクロモアガー STEC 培地を用いて分離培養を行い、得られたコロニーに対して stx、eae、および主要 O 抗原遺伝子を対象とした PCR 解析を実施した。陽性株は純培養後、グリセロール加 TSB 中で -80℃ 保存した。

分離株のうち、O157:H7 株および O111:H8 株については患者株との遺伝的関連性を評価するため MLVA 解析を実施し、O116:H16 株については core genome SNP 解析を行った。また、2024 年および 2025 年に分離された

菌株については、Nanopore シーケンサーおよびショートリードシーケンスによる全ゲノム解析を実施し、血清型、stx subtype、および 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）

EHEC 広域食中毒アラートシステムでは、NESID から得られる EHEC 患者報告情報を用い、過去データに基づくベースラインと患者イベント数を比較することで、広域散发事例や集団感染疑い事例の早期探知を行った。アラートレベルは、患者イベント数およびベースラインからの逸脱度をもとにレベル 1～4 に分類し、レベルに応じて内部注意喚起、継続監視、厚生労働省への情報提供等を行う運用とした。令和 7 年度は、改訂したベースラインおよび判定基準に基づき週次解析を実施し、血清型、VT 型、診断週、HUS の有無、症例数、地理的集積等を評価した。検知事例については、自治体対応の食中毒事例との整合性確認や、MLVA 等の分子疫学情報を用いた事後検証の必要性を整理するとともに、COVID-19 流行後の患者報告動向を踏まえたアラート基準の再検討を行った。

（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）

2023 年以降に特定地域で増加が指摘された GBS 症例について、医療機関の協力のもと後方視的疫学調査を実施した。症例定義に基づき、発症時期、年齢、性別、先行症状、胃腸炎症状、鶏肉喫食歴、検査情報等を収集・整理した。さらに、一部症例および関連食中毒事例から分離され

た *Campylobacter jejuni* 株について、MLST 型や LOS クラス等の分子疫学的解析を行い、GBS 発症リスクに関連する遺伝的特徴を評価した。菌株分離は高知県衛生環境研究所および高知市保健所で実施し、遺伝子解析は 国立感染症研究所 細菌第一部で行った。

C. 研究結果

1. MLVA 法による型別評価

感染研細菌第一部において、3,793 株について分子型別解析を実施した。このうち 3,168 株について MLVA 法による解析を実施した。解析依頼施設数は延べ 94 施設であった。各血清群において同定された型数は、0157 が 861、026 が 164、0111 が 69、0103 が 97、0121 が 21、0145 が 21、0165 が 3、091 が 40 であった。得られたデータは 2026 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 46 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 1700 株であった。

2025 年は 55 施設から約 1500 株分のデータについて照会があり、感染研で精度確認を行った（上記型名付与を行った株のデータを含む）。全遺伝子座における正解率（平均値）は約 99%であった。株毎の正解率（平均値）は約 88%であった。

2. ゲノム解析パイプライン構築、評価

GitHub 上で公開した SNP 解析パイプライン「SNPcaster」v0.9 について、地方衛生研究所から得られたフィードバックをもとに改良を行った。新たに、NCBI AMRFinderPlus を利用した薬剤耐性遺伝子検索機能を実装し、

主要病原菌における薬剤耐性遺伝子を自動的かつ網羅的に検出可能とした。また、SRA Toolkit を利用した機能を追加し、SRA から FASTQ データを自動取得できるようにした。講習会は対面および Zoom 配信によるハイブリッド形式で実施し、75 機関 136 名が参加した。講習では、解析パイプラインの原理、インストール方法、使用方法、および解析結果の解釈について説明した。また、講習内容を動画化し、感染症研究所 YouTube チャンネルにて限定公開した。

シミュレーションデータを用いた比較解析の結果、SNPcaster は高い SNP 検出精度を示した。陽性的中率 (PPV) は Snippy および Lyve-SET と同等に高く、特に SNPcaster および Snippy では偽陽性 SNP は認められなかった。一方、Parsnp は他プログラムより低い値を示した。感度評価では、参照配列との類似性が高い条件では全プログラムが高い値を示したが、類似性 97% 条件では Snippy および Lyve-SET の感度低下が認められ、Parsnp ではさらに大きく低下した。

実データを用いた解析では、SNPcaster は参照配列の系統的距離に左右されにくく、安定した pairwise SNP 数を示した。近縁株を参照配列とした場合、ほとんどのプログラムで pairwise SNP 数は 10 か所以内であったが、遠縁株を参照配列とした場合、Lyve-SET および Snippy では SNP 数の増加が認められた。一方、SNPcaster では大きな変動は認められず、クラスタード SNP、リピート領域、およびファージ領域由来 SNP を除外後も安定した結果を示した。

2. ゲノム情報収集、データベース拡充化

沖縄県 EHEC 感染症集団事例由来 0157 菌株の完全長ゲノム配列を用いた SNP 解析の結果、複数菌株に共通する染色体上の塩基変異は 1 か所のみであり、18 菌株は 7 株からなる Group I と 11 株からなる Group II に分類された。さらに、保存プラスミド上の塩基欠失に基づき、Group II は 8 株の Group IIa と 3 株の Group IIb に細分化された。これらのゲノム情報と検体情報を統合的に解析した結果、本事例における EHEC の伝播経路は「Group I → Group IIa → Group IIb」である可能性が高いと推定された。

また、離島コホート研究により取得したウシ由来 EPEC および EHEC のゲノム配列を公共データベースへ登録した。登録に際しては、沖縄県衛生環境研究所職員への技術指導を行い、地方衛生研究所におけるゲノムデータ公開体制の整備を支援した。登録した EHEC 39 株については、そのゲノムリソースとしての有用性から、*Microbiology Resource Announcements* 誌に報告した。

さらに、本年度の離島コホート研究で分離されたウシ由来 EHEC 18 株について全ゲノム解析を実施し、15 種類の血清型を有する多様な系統が存在することを明らかにした。全株が stx 遺伝子を保有していた一方で、eae 遺伝子陽性株は 3 株のみであった。また、沖縄県内の集団感染事例から分離された *Campylobacter jejuni* 15 株についても Nanopore リード取得および全ゲノム配列構築を完了し、今後の詳細解析に向けたゲノムデータベースの拡充を行った。

Nanopore リードのみを用いて構築した EHEC 0157 菌株のゲノム配列精度について検証した結果、Illumina ショートリードによる修正前後の比較では、全 18 菌株における差異

は SNVs が 0～11 か所、InDels が 3～25 か所であり、中央値はそれぞれ 2 および 7 であった。多くの菌株では SNVs が 0～2 か所、InDels が 8 か所以内であり、現在の Nanopore シーケンスにより得られる 0157 染色体配列は比較的高精度であることが示唆された。また、リードデータ量と SNVs/InDels 数との間に明確な相関は認められず、一定以上のシーケンス量増加は配列精度向上に大きく寄与しないと考えられた。

さらに、Nanopore ゲノム配列を用いた WGS 解析精度について検証した。Illumina リードを用いた SNPcaster 解析では、菌株間の差異は最大 3 SNPs であり、Illumina データを用いた in-house プログラム解析でも最大 4 SNPs と類似した結果が得られた。一方、Nanopore ゲノム配列をそのまま用いた場合には最大 11 SNPs が検出され、SNP 数の増加が認められた。しかし、Illumina ショートリードにより修正した Nanopore ゲノム配列を用いた場合には最大 4 SNPs となり、Illumina リード解析と同等の結果が得られた。これらの結果から、Nanopore 配列単独解析で増加する SNP は主としてシーケンスエラーに由来することが示唆された。

また、地方衛生研究所におけるゲノム解析環境整備を支援するため、九州地方の衛生研究所職員を対象とした研修会において「病原細菌の全ゲノム解析方法の現状」に関する講演を行った。加えて、講演内容を動画教材として作成・配布し、教材内容および今後必要とされる解析技術に関するアンケート調査を実施した。その結果、教材は概ね高い評価を受けるとともに、地方衛生研究所職員が求めるゲノム解析技術や知識に関する具体的ニーズを把握することができた。

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

牛由来EHEC 0157株のMLVA解析結果に基づくMinimum Spanning Tree (MST) を用いて、分離年およびstx subtype保有パターンとの関連を解析した。その結果、分離年による明確なクラスター形成は認められなかった一方で、stx2cを単独保有する菌株群によるクラスター形成が確認された。

また、牛関連食品検体49検体についてEHEC分離を行った結果、8検体から計9株のEHECが分離された。分離された菌株は0g103、0g157および0gUTに分類され、全株がeae陽性であった。一方、牛盲腸検体66検体からは16検体でEHECが検出され、計20株が分離された。分離株は0g103、0g109、0g116、0g119、0g157、0g171、0g5413および0gN10など多様な0遺伝子型を示し、このうち0g103、0g109および0g157株は全てeae陽性であった。これらの結果から、牛関連食品および牛盲腸には多様なEHECが存在しており、一部にはヒト感染症との関連が懸念される遺伝子型が含まれることが示された。

5. 離島コホート研究

A地域およびB地域の食肉センターで収集したウシ糞便検体についてstx検出リアルタ

イムPCRを実施した結果、2025年は50検体中12検体でstx陽性となり、6株のSTECが分離された。2023～2025年の累計では、A地域100検体中6検体、B地域150検体中57検体でstx陽性が確認され、それぞれ2株および28株のSTECが分離された。0-genotypingの結果、多くの菌株は主要7血清群に該当しない0gNTであり、2023～2025年に分離された30株中25株が0gNTであった。分離株ではstx2陽性株が多く、eae陽性株も認められた。さらに、ゲノム解析の結果、0gNT株は18種類の血清型に分類され、地域内に多様なSTEC系統が存在することが明らかとなった。

また、A地域3農場およびB地域1農場を対象とした調査では、A地域35検体中32検体 (91.4%)、B地域79検体中72検体でstx陽性が確認された。STEC分離の結果、A地域では29株、B地域では70株が分離され、B地域では0g157、stx2、eae陽性株および0g111、stx1、eae陽性株も検出された。ゲノム解析では、0gNT株が18種類の血清型に分類され、0116:H16 stx2a陽性株および0171:H2 stx2d陽性株などが確認された。

さらに、0157:H7株および0111:H8株に対してMLVA解析を実施したところ、A地域農場由来0157:H7株は、2024年に同地域で発生した集団感染事例由来株とSingle Locus Variant (SLV) の関係にあることが明らかとなった。一方、他の菌株については国内既報株との類似MLVAプロファイルは認められなかった。また、B地域農場由来0116:H16株11株に対するcore genome SNP解析では、菌株間差異は0～17 SNPsであり、特定農場内で近縁なクローンが維持されている可能性が示唆された。

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

令和 7 年度は、EHEC 広域食中毒アラートシステムを継続運用し、2025 年 12 月時点で複数の広域散発疑い事例を検知した。7～8 月には 0157VT2 によるレベル 2.5 相当事例 2 件について厚生労働省へ情報提供を行い、さらに 8～9 月には 0157VT2 によるレベル 4 相当事例 3 件を検知した。これら 3 件は診断週および症例群の重なりから継続事例である可能性が示唆された。加えて、11 月には 0157VT2 事例、12 月には 0157VT1VT2 事例を検知し、2025 年 12 月までに計 7 件のアラート発出に相当する運用実績が得られた。検知された事例の多くでは、地域的集積あるいは時間的集中が認められた。特に、第 48 週に検知された 0157VT1VT2 事例では九州地方で患者報告の集積が確認され、自治体が対応した食中毒事案との整合性も認められた。これらの結果から、本アラートシステムは、自治体対応や食中毒届出に先行または並行して広域散発疑い事例を把握できる有用な手法であることが示された。一方で、感染源や共通曝露の特定に至らない事例も多く、原因究明や再発防止に結びつけるためには、MLVA 型別や全ゲノム解析等の分子疫学情報との迅速な連結、自治体間での症例情報整理、および食品衛生・感染症対策・地方衛生研究所間の情報共有体制強化が必要であることが明らかとなった。また、COVID-19 流行後の患者報告動向を踏まえアラート基準の再検討を行ったが、2025 年時点では流行状況に大きな変化は認められず、基準改訂は実施しなかった。

さらに、ギラン・バレー症候群（GBS）関連調査では、2023 年以降に特定地域で増加が

指摘された GBS 症例について後方視的疫学解析を実施した。その結果、近年の GBS 症例増加と、先行症状として胃腸炎を呈する症例の割合が高いことが確認された。また、一部症例および関連食中毒事例から分離された *Campylobacter jejuni* 株の分子疫学解析により、GBS 発症リスクが高いとされる遺伝的特徴を有する菌株が確認され、国内におけるカンピロバクター感染と GBS 発症との関連を示唆する基礎的知見が得られた。

D. 考察

令和 7 年度は MLVA 法、WGS 解析、食品・動物由来株解析、広域食中毒アラートシステムを組み合わせた EHEC サーベイランス体制の実用性がさらに高まった。MLVA 解析株数は前年より増加し、地方衛生研究所から送付された MLVA データも高い一致率を維持していたことから、全国的な分子疫学サーベイランス基盤として有効に機能していると考えられた。一方で、地衛研におけるデータの信頼性確保は重要であり、研修会や精度確認を通じた継続的な支援が必要である。特に今年度の研修会では、GeneMapper 実習時間の拡充により前年度の課題は概ね改善されたが、参加者の経験差や実習環境による理解度の差も示され、今後は受講者の経験レベルに応じた班編成や表示環境の改善が求められる。

WGS 解析については、SNPcaster を GitHub で公開し、地方衛生研究所で利用可能な解析ツールとしての普及が進んだ。講習会への多数の参加や学会等での使用例からも、標準的解析ツールとして定着しつつあることが示唆された。精度検証では、SNPcaster はシミュレーションデータおよび実データのいずれにおいても高い SNP 検出精度を示し、特に

参照配列が遺伝的に遠い場合でも偽陽性 SNP が少なく、行政判断に用いる解析手法として有用であると考えられた。また、Nanopore リードによる完全長ゲノム解析では、一定の SNV や InDel エラーが残るものの、プラスミド配列を含む詳細な比較が可能であり、食中毒事例における伝播経路推定に有用であることが示された。ただし、Nanopore 配列をそのまま SNP 解析に用いる場合は、従来の同一クローン判定基準とは異なる基準設定が必要であり、DNA 精製工程の時間的不安定性も今後の実装上の課題である。

食品関連サンプルおよび離島コホート研究からは、牛関連食品、牛盲腸、農場および食肉センター由来検体に多様な STEC/EHEC が存在することが明らかとなった。牛由来 EHEC 0157 では分離年による明確な偏りは認められず、複数系統が牛群内に継続的に維持されている可能性が示唆された。一方、stx2c 単独保有株のクラスター形成や、農場内での近縁クローンの長期残存、さらにヒト集団感染事例株と近縁な 0157:H7 株の検出は、牛が STEC の重要なリザーバーであり、ヒト感染との関連を解明するうえで継続的なゲノム比較解析が重要であることを示している。今後は、ウシ由来株と沖縄県内外のヒト由来株との比較解析を進め、感染源や感染経路の推定精度を高める必要がある。

EHEC 広域食中毒アラートシステムは、自治体単位では散发例として認識される段階で、全国的な患者発生情報から広域散发疑い事例を早期に把握する手段として一定の実用性が確認された。一方で、アラートは感染源や共通曝露を直接特定するものではないため、患者情報、喫食歴、食品流通情報、MLVA 型別、WGS 情報を迅速に統合する体制が不可

欠である。また、GBS 関連調査では、カンピロバクター感染症を急性胃腸炎にとどまらず、GBS 等の重症合併症を含む疾病負荷として評価する必要性が示された。以上より、EHEC およびカンピロバクター食中毒対策には、感染症対策、食品衛生、病原体解析、臨床情報を横断的に統合する One Health 型の情報共有・リスク評価体制の構築が今後の重要課題である。

E. 結論

本研究により、MLVA 法を基盤とした迅速な菌株情報の集約体制が進展し、EHEC 食中毒事例への対応において、地方衛生研究所、感染研、厚生労働省および自治体間の連携の重要性が改めて示された。改良版研修会の実施や *in silico* MLVA 解析により、地方衛生研究所における MLVA 法の精度維持・向上に資する知見が得られた。

また、SNPcaster の一般公開により、地方衛生研究所等の公的機関での WGS 解析の利用が広がりつつあり、その解析精度も高いことが確認された。Nanopore シーケンシングを用いた WGS 解析は、EHEC 集団食中毒事例の解析や伝播経路推定に有用であり、ゲノム配列の公共データベース登録、国際誌での公表、動画教材を活用した技術普及を通じて、地域の解析能力向上と持続的な情報共有体制の構築に寄与した。

食品・動物由来株の解析では、牛関連食品、牛盲腸およびウシ糞便から多様な EHEC/STEC 株が分離され、一部にはヒト感染症との関連が懸念される遺伝子型が含まれることが示された。2023 年から 2025 年までにウシ糞便から 144 株の STEC を分離しており、今後、ウシ由来株、食品由来株、ヒト由来株の全ゲ

ノム比較解析を進めることで、沖縄県における STEC 感染症の原因分析や感染経路解明に資することが期待される。

さらに、EHEC 広域食中毒アラートシステムは、広域散発疑い事例の早期探知、厚生労働省等への情報提供、検知後の分子疫学情報との連結および事後検証体制の改善に有用であることが示された。加えて、カンピロバクター感染とギラン・バレー症候群等の重症合併症に関する知見は、食品衛生対策を重症化予防の観点から評価する必要性を示しており、今後は感染症対策、食品衛生、臨床、病原体解析部門が連携した One Health 型のリスク評価体制の構築が重要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2024 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 46 巻、103-104、2025 年 5 月
2. Kubomura A, Lee K, Iyoda S, Akeda Y. 2025. Complete genome sequence of three atypical diarrheagenic *Escherichia coli* O166:H15 strains from foodborne outbreaks. Microbiol Resour Announc 14:e0074625.
3. Ooka T, Arai S, Lee K, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J. 2025. Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene,

astA, in *Escherichia coli*. Front Microbiol 16:1635769.

4. Imai Y, Okuno M, Hoshiko Y, Kaneko H, Sato T, Noguchi A, Lee K, Yamamoto T, Nakayama-Imahiji H, Kuwahara T, Iyoda S, Ogura Y. 2025. Genomics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from asymptomatic carriers in Japan highlights risk-adaptive control. Commun Biol 9.
5. Morita M, Lee K, Sugiyama A, Kojima N, Kawai Y, Izumiya H, Akeda Y. 2026. A case of laboratory-acquired *Salmonella* Typhi infection due to phage typing in Japan: whole-genome sequencing confirms the source of infection. Access Microbiol 8.
6. Kakita T, Iyoda S, Taira H, Kudaken T, Akeda Y, Ohnishi M, Nakamura K. Closed genome sequences of 39 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Okinawa, Japan. Microbiology Resource Announcements. 2025 Nov 13;14(11):e0081625.
7. Shimabukuro S, Kobayashi T, Yokoyama E, Ando N, Kikuchi T, Momose F, Kageyama T, Matsuoka H, Ishioka T, Hirai S. Establishment of autoclave conditions for disaccharide-containing liquid media using spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. Journal of Microbiological Methods. 2026; 245: 107487.
8. Closed genome sequences of 39 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

strains isolated from healthy cattle in Okinawa, Japan. Kakita T, Iyoda S, Taira H, Kudeken T, Akeda Y, Ohnishi M, Nakamura K, Microbiol Resour Announc. 2025 13;14(11):e0081625.

2) 学会発表

1. 中村 佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏. ナノポアリードのみを用いた全ゲノム配列比較による細菌検査方法の検討. 第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 福岡, 2025.
2. 中村 佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏. 完全長ゲノム配列の比較解析に基づく腸管出血性大腸菌感染症起因菌のゲノム変化の解明. 九州微生物研究フォーラム 2025. 沖縄, 2025.
3. 泉谷秀昌: 3 類感染症。令和 7 年度希少感染症・重点感染症診断技術研修会、2026 年 2 月オンライン。
4. 泉谷秀昌: EHEC 0157、026、0111 の MLVA。令和 7 年度腸管出血の MLVA 研修会、2026 年 2 月、東京都
5. 李 謙一, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 明田幸宏. 腸管出血性大腸菌の 大規模集団事例解析にもとづく SNP 解析条件の最適化. 第 99 回日本細菌学会総会. 広島, 2026.
6. 李 謙一, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 明田幸宏. SNPcaster: 細菌ゲノム解析パイプライン. 第 46 回日本食品微生物学会学術総会. 川崎、神奈川, 2025.
7. 李 謙一, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 明田幸宏. SNPcaster: 細菌ゲノムアセンブリ・系統解析パイプライン. 第 168 回日本獣医学会学

術集会. 宮崎, 2025.

8. 原田哲也, 若林友騎, 李 謙一, 河合高生, 伊豫田 淳. 腸管出血性大腸菌 0157 clade 分類のためのリアルタイム PCR 法の確立. 第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.
9. 小高優人, 上村直輝, 岩瀬忠行, 李 謙一, 石嶋 希, 中根大介, 菅井基行, 菅原庸, 明田幸宏, 伊豫田 淳, EHEC Working Group. 腸管出血性大腸菌における多細胞鎖形成機構の分子遺伝学的解析. 第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.
10. 李 謙一, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 久保田寛顕, 木全恵子, 若林友騎, 野本竜平, 柿田徹也, and 明田幸宏. 細菌ゲノム解析パイプライン(SNPcaster)の開発. 第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.
11. 李 謙一. ゲノム解析が切り拓く腸管出血性大腸菌の新たなサーベイランスと高病原性株の特定. 微生物ウィーク 2025. 東京, 2025.
12. 岡田由美子, 西田智子, 山本詩織, 李 謙一, 泉谷秀昌, 西野由香里, 井田美樹, 下島優香子, and 都丸亜希子. 国内で分離された患者及び食品由来リステリア・モノサイトゲネスの分子疫学的解析. 第 98 回日本細菌学会総会. 石川, 2025.
13. 石嶋 希, 岩瀬忠行, 児玉年央, 李 謙一, 大岡唯祐, 後藤義幸, 八尋錦之助, 明田幸宏, and 伊豫田 淳. HUS 患者から分離された stx2f 遺伝子保有 E. albertii の病原性解析. 第 98 回日本細菌学会総会. 石川, 2025.
14. 李 謙一, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, and 明田幸宏.

細菌ゲノム解析パイプライン (SNPcaster) の開発および共有化方法の構築. 第 98 回日本細菌学会総会. 石川, 2025.

15. 大岡唯祐, 玉村雪乃, 桃木杏奈, 李 謙一, 平井晋一郎, 伊豫田 淳, 楠本正博, and E. albertii Working Group. 国内で分離された *Escherichia albertii* の進化系統およびゲノム特性. 第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.

16. 平井晋一郎. 腸管出血性大腸菌感染症の MLVA 解析について. 分子疫学を活用した感染拡大防止対策立案研修 (長崎県開催、オンライン発表). 令和 8 年 2 月 25 日.

17. ウシ農場で発生した腸管出血性大腸菌感染症—子牛の保菌調査とゲノム解析—, 柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遥乃、久手堅剛、照屋盛美、喜屋武向子、大西真 第 54 回沖縄県獣医学会 (2025 年 7 月)

18. ナノポアリードのみを用いた全ゲノム配列比較による細菌検査方法の検討、中村佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏、第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2025 年 9 月)

19. 完全長ゲノム配列の比較解析に基づく腸管出血性大腸菌感染症起因菌のゲノム変化の解明、中村 佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏、九州微生物研究フォーラム 2025 (2025 年 9 月)

20. ウシ農場で発生した腸管出血性大腸菌感染症—子牛の保菌調査とゲノム解析—, 柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遥乃、久手堅剛、照屋盛美、喜屋武向子、大西真 令和 7 年度獣医学術九州地区学会 (2025 年 10 月)

21. Tatsuya Murai et al. 高知県におけるギラン・バレー症候群の発生状況の発表.

2nd SAFETYNET Conference、2025 年 9 月 25 日 (クアラルンプール市)

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（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所細菌第一部）
研究協力者 泉谷秀昌（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所細菌第一部）
李 謙一（国立健康危機管理研究機構 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 2025 年分離株は 3,168 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 1700 であった。

また全ゲノム配列解析を用いて広域食中毒の調査に活用可能な解析パイプライン（SNPcaster）を構築した。前年度までに開発した試験版を改良し、ベータ版として GitHub 上で公開するとともに、試験運用を開始した。その後、得られたフィードバックをもとに改良を重ね、正式版（v1.0）をリリースした。追加機能として、NCBI AMRFinderPlus による薬剤耐性遺伝子検出機能、およびカスタム GPT を活用した専用サポートチャットボット（SNPcaster-GPT）を実装した。さらに、主として地方衛生研究所職員を対象に利用者講習会を実施し、後日、講習内容の動画配信も行った。また、既存の SNP 解析プログラムとの比較検証を行い、本プログラムが高い精度を有することを明らかにした。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic

Escherichia coli: EHEC）のサーベイランス
ではこれまでパルスフィールドゲル電気

泳動法（PFGE）が主要な解析手法であったが、2018 年 6 月 29 日付の厚生労働省事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」（2023 年 6 月 28 日再周知）により、反復配列多型解析（multi-locus variable-number tandem repeat analysis : MLVA）法が血清群 O157、O26、O111 の統一手法として用いられている。本研究では全国の MLVA による解析結果の総括並びに、事務連絡に基づいて送付された地方衛生研究所からの MLVA データについて解析を行った。

また近年、高速シーケンサー（next-generation sequencing: 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）解析が取り入れられつつある。実際の解析では、NGS により WGS を取得した後、生データのクオリティチェック（quality check: QC）を行い、さらに single nucleotide polymorphism (SNP) 解析等を実施する必要がある。これらの解析に用いられるソフトウェアや解析サーバーは多数存在する一方で、使用方法やデータの評価基準等を体系的に記載したマニュアルは十分に整備されておらず、精度管理上の課題がある。さらに、Linux OS 上で動作するソフトウェアについては、利用する端末や環境によってインストールが困難となる場合がある。

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および共有化を目的とした。本年度は、前年度までに作製した解析パイプラインのアップデートおよび精度検証を行った。

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 2025 年分離株に対して MLVA 法により解析した。方法は Izumiya ら（2008、2020）の方法に従って実施した。血清群 O157、O26、O111 については 17 か所、O103、O121、O145、O165、O91 については 43 か所の遺伝子座を用いた。地方衛生研究所から MLVA 型付与のために送付された MLVA データ（血清群 O157、O26、O111）も併せて解析を行った。

2. プログラムアップデートおよび機能追加

前年度までに得られたフィードバックをもとに、各種バグ修正等を行い、解析パイプラインをベータ版（v0.9）として GitHub 上に公開した。主に地方衛生研究所職員を対象に周知を行い、試験的な運用を開始した。

また、次の 2 種類の機能を追加した。1 つ目は、NCBI AMRFinderPlus による薬剤耐性遺伝子検索機能である。本機能では、主要な病原菌を対象として、薬剤耐性遺伝子の網羅的な検索を行うことができる。また、大腸菌など一部の菌種については、病原性遺伝子の検索も可能である。2 つ目は、SRA Toolkit を利用した、NCBI のショートリードデータベース（Sequence Read Archive: SRA）からのリードデータダウンロード機能である。本機能により、作成した SRA アクセション番号リストに基づき、対象データを自動的にダウンロードすることが可能となった。これにより、デ

データベース上に登録されている国内外のゲノムデータと、ローカルで保有するゲノムデータとの比較が可能となる。

さらに、マニュアルを補完する目的で、生成 AI を利用したチャットボット (SNPcaster-GPT) を作製した。これは ChatGPT のカスタム GPT 機能を利用したものであり、SNPcaster のマニュアルおよびプログラムを読み込ませることで、SNPcaster のインストール方法や使用方法に関する質問に対して、より正確な回答を提供できるようにした。

3. 講習会の実施

配布した解析パイプラインのインストール方法および操作方法に関する講習会を、2025 年 12 月 24 日に国立感染症研究所戸山庁舎にて開催した (対面および Zoom 配信)。また、後日、説明動画を YouTube の限定公開機能を利用して配信した。

4. 精度評価

SNPcaster の SNP 検出性能について、主要な SNP 解析ツールと比較することにより評価した。比較対象として、Snippy、Lyve-SET および Parsnp を用いた。

まず、シミュレーションデータを用いて、各ツールの感度および陽性的中率 (positive predictive value: PPV) を算出し、比較した。対象菌種は、*Escherichia coli*、*Campylobacter jejuni*、*Legionella pneumophila*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Staphylococcus aureus* の 5 種とした。各菌種について、SimuG を用いて、参照配列との類似性が異なる 3 条件の配列データを作製し、入力データとした。具体的には、

類似性 99.999% (菌株レベルの差異)、99.9% (菌株と菌種の間レベルの差異)、97% (菌種レベルの差異) の 3 条件とした。次に、実データを用いて SNP 数の比較を行った。本解析では、公開されている EHEC のベンチマークデータセット (https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_dataset) を用いた。本データセットは、EHEC の集団感染事例 3 件 (O157 が 2 事例、O121 が 1 事例、各 5 株) から構成される。参照配列としては、解析対象菌株と系統的に遠い株として EHEC O26:H11 11368 株を用い、近縁な株として、O157 については Sakai 株、O121 については 51104 株の染色体配列を用いた。各条件で SNP 解析を実施し、各事例内における pairwise SNP 数を算出した。

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、3,793 株について分子型別解析を実施した。このうち 3,168 株について MLVA 法による解析を実施した。解析依頼施設数は延べ 94 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 861、O26 が 164、O111 が 69、O103 が 97、O121 が 21、O145 が 21、O165 が 3、O91 が 40 であった。得られたデータは 2026 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 46 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 1700 株であった。

2025 年は 55 施設から約 1500 株分のデータについて照会があり、感染研で精度確認を行った（上記型名付与を行った株のデータを含む）。全遺伝子座における正解率（平均値）は約 99%であった。株毎の正解率（平均値）は約 88%であった。

2. プログラムアップデートおよび機能追加

本年度は、GitHub 上で v0.9 を公開した後、地方衛生研究所向けに積極的な周知を行い、得られたフィードバックをもとに修正および機能追加を実施した。

追加機能として、NCBIAMRFinderPlus を用いた薬剤耐性遺伝子検索機能を導入し、主要病原菌における薬剤耐性遺伝子を自動的かつ網羅的に検索できるようにした。また、SRA Toolkit を利用したプログラムにより、SRA から FASTQ データを自動的にダウンロードできるようにした。

3. 講習会の実施

講習会は、対面および Zoom 配信によるハイブリッド形式で実施した。参加登録者は 75 機関から計 136 名であり、当日の Zoom における最大同時参加者数は 100 名であった。講習では、プログラムの原理、インストール方法、使用方法および解析結果の解釈について説明した。また、講習会動画は、感染研 YouTube チャンネルにおいて限定公開した。

4. 精度評価

シミュレーションデータを用いた精度評価の結果、SNPcaster は高い SNP 検出精度を示した。陽性的中率で評価した場合、い

ずれのデータセットにおいても、SNPcaster、Snippy および Lyve-SET は高い値を示した（図 1）。特に、SNPcaster および Snippy では偽陽性 SNP は認められなかった。一方、Parsnp は他のプログラムと比較して低い値を示した。感度で評価した場合、類似性 99.999%および 99.9%のデータでは、いずれのプログラムも高い値を示した。一方、類似性 97%のデータでは、Snippy および Lyve-SET の値は約 0.75 まで低下し、Parsnp では大きく低下した（図 2）。

実データを用いた検証では、SNPcaster は参照配列にかかわらず安定した値を示した。参照配列として解析対象データと同一血清型の株を用いた場合、Snippy 以外のプログラムでは pairwise SNP 数は 10 か所以内に収まった（図 3）。一方、参照配列として遺伝的に遠縁な株を用いた場合、SNPcaster および Parsnp では pairwise SNP 数に大きな変化は認められなかったものの、Lyve-SET では 10 か所を超える pairwise SNP を有するペアが認められた。Snippy では、平均して 500 か所以上の pairwise SNP が認められた。

また、クラスタード SNP、リピート領域およびファージ領域に存在する SNP を除外した場合、いずれのプログラムでも類似した結果が得られた。近縁株を参照配列とした場合には、いずれのプログラムにおいても pairwise SNP 数は 10 か所以内であった。参照配列が遺伝的に遠縁な株であった場合には、Snippy 以外のプログラムでは pairwise SNP 数は 5 か所以内であった。Snippy では、検出される SNP 数は大幅に減少したものの、最大で 30 か所

の pairwise SNP が検出された。

D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年より約 25%増加した。解析結果は定期的あるいは不定期に厚生労働省 NESFD に MLVA リストとして掲載された。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 1700 株に上った。感染研で行った精度確認では菌株ベースで 88%、遺伝子座ベースで 99% 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。

ゲノム解析パイプライン構築について、本年度は、SNPcaster を GitHub 上で一般公開し、より広範な利用を促進した。その結果、新たなバグ等が確認され、フィードバックをもとに修正を行うことで、よりインストールしやすいプログラムへと改良することができた。

講習会には 100 名以上が参加し、本プログラムに対する関心の高さがうかがえた。また、学会や研究会等においても本プログラムの使用例が散見されており、地方衛生研究所における標準的な解析ツールになりつつあると考えられる。

シミュレーションデータを用いた検証では、本プログラムが解析対象株の遺伝的多様性にかかわらず、高い精度を示すことが明らかとなった。偽陽性の少なさ

を示す陽性的中率は、いずれのデータにおいても 100%であった。正確性が求められる行政判断において、SNP 検出精度の高さは重要な要素である。また、感度についても他のプログラムより高い値を示したことから、データの種類にかかわらず、より多くの有用な情報を取得できることが示唆された。

実データを用いた検証では、参照配列にかかわらず安定した結果が得られることが示された。実データにおいて、検出された SNP が偽陽性であると断定することは困難である。しかし、参照配列が遺伝的に遠い場合に、近い場合よりも多数の SNP が認められることは、偽陽性 SNP の存在を示唆している。本研究では、Snippy および Lyve-SET において、遺伝的に遠い株を参照配列とした際に、多数の偽陽性と考えられる SNP が出現した。過去の研究においても、これらのプログラムでは参照配列が遺伝的に遠い場合に偽陽性 SNP が検出されることが示されており、本研究の結果と一致している。

偽陽性 SNP の主な原因は、ファージ領域などの組換え領域であると考えられる。本研究においても、組換えの結果と考えられるクラスタード SNP、ならびに組換えが起こりやすいリピート領域およびファージ領域に存在する SNP を除外した結果、検出される SNP 数が減少し、プログラム間の差異も小さくなった。組換え領域の存在は、リードマッピングの際にソフトクリップと呼ばれる不完全なアライメントを生じさせ、その結果、偽陽性 SNP が検出されることが考えられている。SNPcaster において SNP 検出を担ってい

る BactSNP は、アラインメントおよびリードマッピングの両方に基づく変異検出を用いることで、ソフトクリップ等に起因する偽陽性 SNP 検出を大幅に低減していると考えられる。

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。

また SNPcaster プログラムの一般公開を行ったことで地方衛生研究所等の公的な機関において利用が広がっている。精度についても高精度であることが確認された。今後、地方衛生研究所等において SNP 解析の標準的なツールとなることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2024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46巻、103-104、2025年5月
2. Kubomura A, Lee K, Iyoda S, Akeda Y. 2025. Complete genome sequence of three atypical diarrheagenic *Escherichia coli* O166:H15 strains from foodborne outbreaks. Microbiol Resour Announc 14:e0074625.

3. Ooka T, Arai S, Lee K, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J. 2025. Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene, astA, in *Escherichia coli*. Front Microbiol 16:1635769.

4. Imai Y, Okuno M, Hoshiko Y, Kaneko H, Sato T, Noguchi A, Lee K, Yamamoto T, Nakayama-Imaohji H, Kuwahara T, Iyoda S, Ogura Y. 2025. Genomics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from asymptomatic carriers in Japan highlights risk-adaptive control. Commun Biol 9.

5. Morita M, Lee K, Sugiyama A, Kojima N, Kawai Y, Izumiya H, Akeda Y. 2026. A case of laboratory-acquired *Salmonella* Typhi infection due to phage typing in Japan: whole-genome sequencing confirms the source of infection. Access Microbiol 8.

2) 学会発表

1. 泉谷秀昌：3類感染症。令和7年度希少感染症・重点感染症診断技術研修会、2026年2月オンライン。
2. 泉谷秀昌：EHEC O157、O26、O111のMLVA。令和7年度腸管出血のMLVA研修会、2026年2月、東京都
3. 李 謙一、伊豫田 淳、泉谷秀昌、明田幸宏。腸管出血性大腸菌の 大規模集団事例解析にもとづく SNP 解析条件の最適化。第99回日本細菌学会総会。広島、2026。
4. 李 謙一、森田昌知、伊豫田 淳、泉谷秀昌、中村佳司、山岸敏明、明田幸宏。SNPcaster: 細菌ゲノム解析パイプライン。第 46 回日本食品微生物学会

- 学術総会. 川崎、神奈川, 2025.
5. 李 謙一, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 明田幸宏. SNPcaster: 細菌ゲノムアセンブリ・系統解析パイプライン. 第168回日本獣医学会学術集会. 宮崎, 2025.
 6. 原田哲也, 若林友騎, 李 謙一, 河合高生, 伊豫田 淳. 腸管出血性大腸菌 O157 clade 分類のためのリアルタイム PCR 法の確立. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.
 7. 小高優人, 上村直輝, 岩瀬忠行, 李 謙一, 石嶋 希, 中根大介, 菅井基行, 菅原 庸, 明田幸宏, 伊豫田 淳, EHEC Working Group. 腸管出血性大腸菌における多細胞鎖形成機構の分子遺伝学的解析. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.
 8. 李 謙一, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 久保田寛顕, 木全恵子, 若林友騎, 野本竜平, 柿田徹也, and 明田幸宏. 細菌ゲノム解析パイプライン(SNPcaster)の開発. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.
 9. 李 謙一. ゲノム解析が切り拓く腸管出血性大腸菌の新たなサーベイランスと高病原性株の特定. 微生物ウィーク2025. 東京, 2025.
 10. 岡田由美子, 西田智子, 山本詩織, 李 謙一, 泉谷秀昌, 西野由香里, 井田美樹, 下島優香子, and 都丸亜希子. 国内で分離された患者及び食品由来リステリア・モノサイトゲネスの分子疫学的解析. 第98回日本細菌学会総会. 石川, 2025.
 11. 石嶋 希, 岩瀬忠行, 児玉年央, 李 謙一, 大岡唯祐, 後藤義幸, 八尋錦之助, 明田幸宏, and 伊豫田 淳. HUS患者から分離されたstx2f遺伝子保有E. albertiiの病原性解析. 第98回日本細菌学会総会. 石川, 2025.
 12. 李 謙一, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, and 明田幸宏. 細菌ゲノム解析パイプライン(SNPcaster)の開発および共有化方法の構築. 第98回日本細菌学会総会. 石川, 2025.
 13. 大岡唯祐, 玉村雪乃, 桃木杏奈, 李 謙一, 平井晋一郎, 伊豫田 淳, 楠本正博, and E. albertii Working Group. 国内で分離されたEscherichia albertiiの進化系統およびゲノム特性. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.
- ## 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

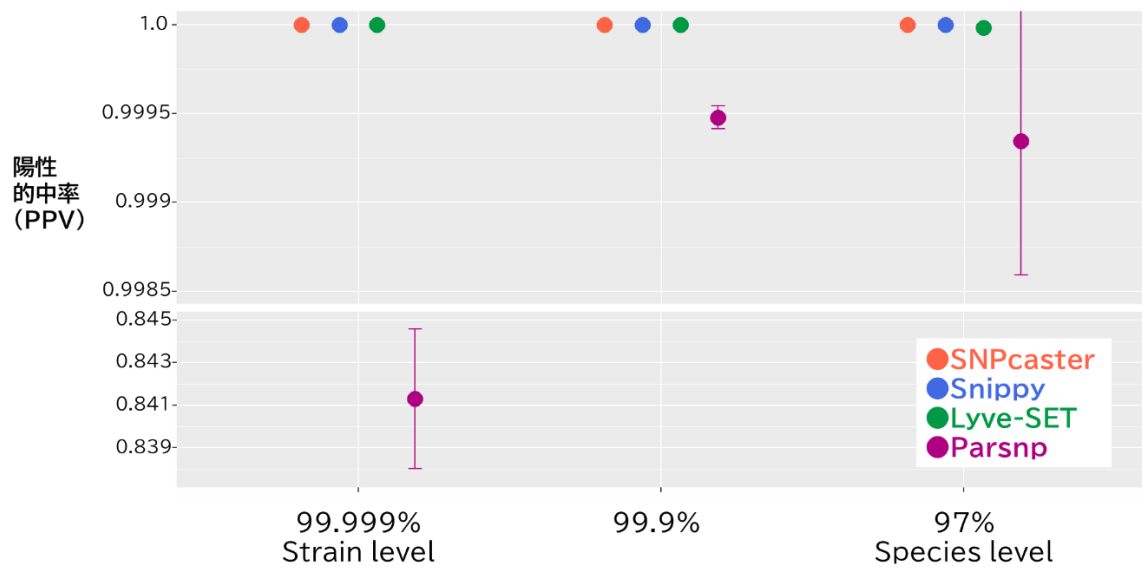


図 1. SNP 検出プログラム別にみたシミュレーションデータにおける陽性的中率の比較

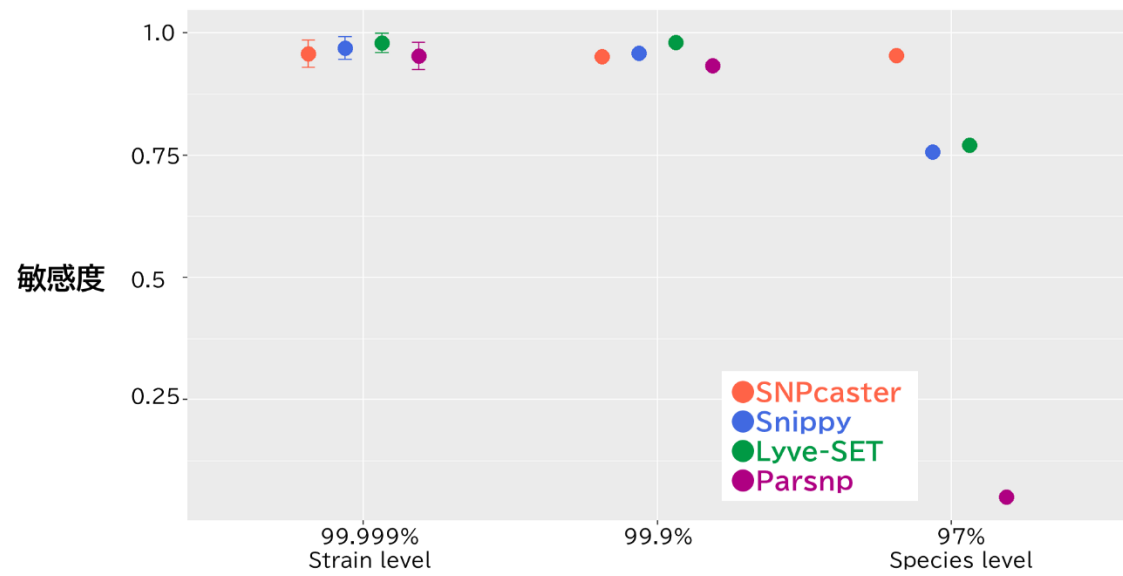


図 2. SNP 検出プログラム別にみたシミュレーションデータにおける
敏感度の比較

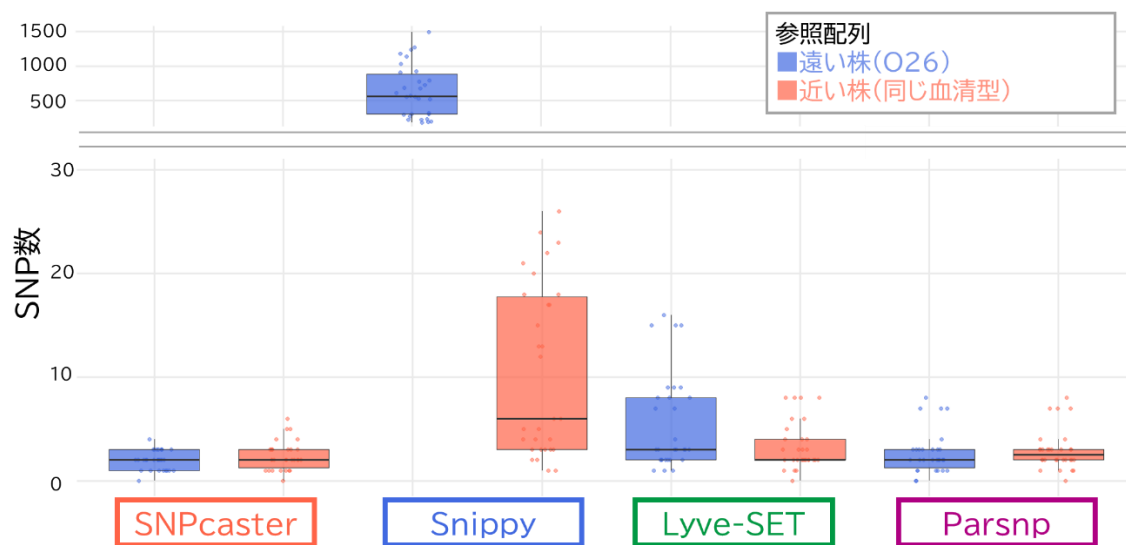


図 3. SNP 検出プログラム別にみた実データにおける pairwise SNP 数の比較(クラスタード SNP、リピートおよびファージ領域の除去なし)

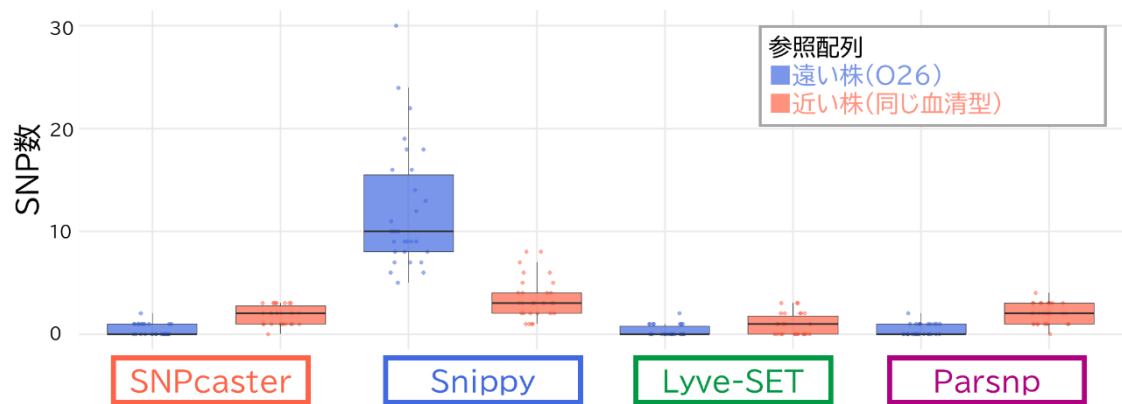


図 4. SNP 検出プログラム別にみた実データにおける pairwise SNP 数の比較(クラスタード SNP、リピートおよびファージ領域の除去あり)

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、沖縄県で発生したEHEC感染症集団事例から分離された菌株（計18株）を用いて、Nanoporeシーケンサーから得られたリードのみで高精度なWGS解析が可能か検討した。また、前年度に引き続き、九州地方の複数の衛生研究所職員を対象とした講演会を実施し、あわせて資料を音声付き動画として作成し、不参加の衛生研究所へ共有した。WGSデータベースの拡充に関しては、前年度までに離島コホート研究により取得したウシ由来病原性大腸菌の完全長ゲノム配列を公共データベースに登録し、そのうちEHEC（計39株）の解析結果を国際誌にて報告した。さらに、R7年度に離島コホート研究により新たに分離されたウシ由来EHEC（計18株）および、沖縄県内のカンピロバクター集団感染事例から分離された*Campylobacter jejuni*（計15株）について、Nanoporeリードの取得および全ゲノム配列の構築を完了した。

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きている。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) EHECおよびカンピロバクター菌株のWGS決定

EHEC菌株（計36株：沖縄県集団事例由来O157株18株、R7年度離島コホート研究分離株18株）はLB培地（37℃、一晚培養）から、カンピロバクター菌株（18株）はBrucella broth（37℃、微好気、48時間培養）から、それぞれGenomic-Tip（Qiagen; 20/Gあるいは100/G）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Nanoporeシーケンシングを行なった。取得データの塩基配列への変換（ベースコール）には、Dorado (ONT; Super accuracy mode)およびDNA modelを、菌株セットごとに以下のバージョンで使用した：沖縄県EHEC感染症集団事例O157菌18株, Dorado v.1.0.0 and DNA model v.5.2.0; カンピロバクター菌株, Dorado v.0.8.3 and DNA model v.5.0.0; R7年度離島コホート研究分離株18株, Dorado v.7.11.2 in MinKNOW v.25.09.16 and DNA model v.5.2.0。生成された塩基配列データ（Nanoporeリード）から、Hybracterパイプライン (Bouras G, *et al.* Microb Genom, 2024)を用いて、ゲノム配列を構築した。EHEC菌株については、必要に応じてNanoFilt v.2.8.0 (De Coster W, *et al.* Bioinformatics, 2018) プログラムを用いて、Quality score (Q score) >10およびリード長 >2-kbのどちらかあるいは両方を満たすリードのみを抽出し、配列構築に利用した。さらに、ゲノムの環状化が確認できない場合には、circlator (Hunt M, *et al.* Genome Biol., 2015) プログラムにより、環状化処理を行なった。沖縄県集団事例分離EHEC菌株のWGSゲノムに関しては、iSeq100 (Illumina)によるシーケンシングで得たショートリード配列（沖縄県衛生環境研究所より提供）を用いて、polypolish v.0.6.1 (Wick RR, *et al.* PLoS Comput Biol, 2022) およびpypolca v.0.4.0 (Bouras G, *et al.* Microb Genom, 2024) プログラムによる配列修正を行った。

各EHEC菌株の血清型およびSequence type (ST)を、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。

(2) 沖縄県集団事例分離EHEC菌株を用いた比較ゲノム解析

方法 (1) により、各菌株において、① Nanoporeリードのみを用いた完全長ゲノム配列、② ①をIlluminaショートリードで修正した配列、③ IlluminaショートリードとShovill v1.1.0 (Seemann T, <https://github.com/tseemann/shovill>, 2016)プログラムを用いたドラフトゲノム配列、をそれぞれ構築した。これらの配列を用いて、以下の3つの解析を行った。

解析1: 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、①と②の間の染色体配列間の差異を確認した。

解析2: 全18菌株の染色体配列間に存在するSingle Nucleotide Polymorphisms (SNPs) を、(i) Illuminaショートリードを用いたWGS解析パイプライン (SNPcaster)、(ii) ③のゲノムを用いた、in-houseプログラム (Ogura, *et al.* Microb Genom, 2017)、(iii) ①のゲノムを用いた、in-houseプログラム、(iv) ②のゲノムを用いた、in-houseプログラム、の方法でそれぞれ検出した。

解析3: 解析2の方法 (iv)で得られたSNPsを用いて、GrapeTree (Zhou Z, *et al.* Genome Res., 2018) プログラムにより、Minimum Spanning Tree (MST)を作成し、18菌株を染色体配列の違いに基づいて分類した。さらに、全18菌株のプラスミド配列間に存在するSNP/InDel (Insertion and Deletion) をdnadiffプログラムにより検出し、これを18菌株の詳細な分類に利用した。

(3) WGS解析に関する資料作成

九州地域の衛生研究所（福岡市、北九州市、福岡県、佐賀県）職員を対象として、病原細菌の全ゲノム解析の導入に向けた基礎知識および現状に関する講演を、福岡県保健環境研究所にて実施した。さらに、講演不参加の職員への周知・普及を図るため、本講演資料を音声付きの動画教材として作成した。具体的には、Microsoft PowerPoint for MacおよびOBS Studioを用いて音声付きスライドショーを録画し、iMovieでの編集とHandBrakeでの圧縮を経て、1本あたり10～20分（22～60 MB）の動画ファイルとして整備した。本教材の配布については、福岡県保健環境研究所の重村氏の協力を得て、九州地域の衛生研究所の希望者に提供した。あわせて、動画内容の分かりやすさや時間の適切性、動画教材の利用に関する意識、および今後動画化を希望するゲノム解析テーマについてアンケートを実施し、利用者のニーズとフィードバックを収集した。

(倫理面への配慮)

該当しない

C. 研究結果

(1) Nanoporeリードのみで構築したEHEC O157菌株の配列精度

前年度にEHEC O157 Sakai株を用いて実施したNanoporeリードのみによるゲノム配列（以下、Nanoporeゲノム配列）の精度検証を、本年度は対象株数を増やして詳細に検討した。多くの菌株では参照配列が存在しないため、高精度なIlluminaショートリードを用いてNanoporeゲノム配列を修正し、修正前後の配列を比較することで精度評価を行った。全18菌株におけるNanoporeゲノム配列と修正後配列との差は、SNVs (Single Nucleotide Variants)が0～11個、InDelsが3～25個であった（図1）。SNVsとInDelsの中央値はそれぞれ2および7であり、Sakai株での検証結果と一致していた。また、18菌株中14株でSNVsが0～2個、13株でInDelsが8個以下であったことから、現在のNanoporeリードによるO157染色体配列には、2 SNVsおよび8 InDels程度の修正箇所が含まれる可能性が高いことが示唆された。また、Nanoporeリードの合計データ量（69x～419x）とSNVs/InDels数の相関を解析したところ、100x以上のデータ量増加に伴うSNVs/InDels数の減少は確認されなかった。したがって、一定以上のリード量の増加はNanoporeゲノム配列の精度に影響しないと考えられた。

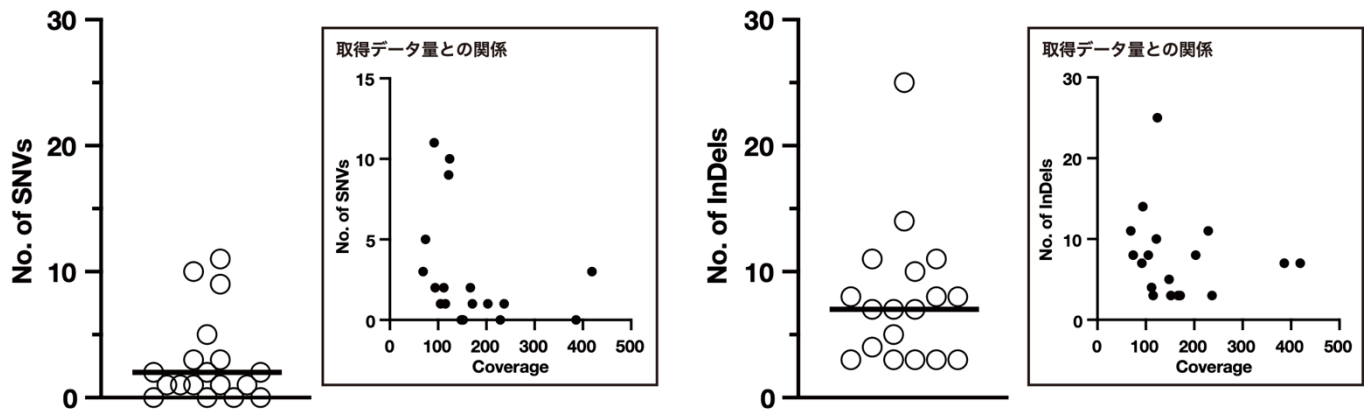


図 1. Nanopore ゲノム配列修正前後における SNVs および InDels の比較

EHEC O157 菌株（全 18 株）について、Nanopore リードのみで構築した染色体ゲノム配列とその配列をイルミナ配列で修正した配列を比較した。グループ化されたカラム散布図により、修正前後の塩基配列の差（SNVs あるいは InDels の数）の分布を示した。各ドットは個別の菌株を示し、横線は中央値を表す。また、SNVs/InDels の数と、ゲノム構築に使用した Nanopore リードのデータ量（genome coverage で表記）との関係をインセット内に示した。

（2）Nanoporeゲノム配列を用いたWGS解析の精度の検証

Nanoporeゲノム配列をWGS解析に利用した際、SNPcasterを用いた既存の解析結果とどの程度の乖離があるかを検証した。評価項目として、菌株間の最大・最小・平均 SNPs数およびSNPsの標準偏差を算出し、比較を行った（表1）。SNPcasterはIlluminaリードを用いた解析には対応しているが、Nanoporeリードには対応していない。そのため、本検証では、分担者自身の所属する研究室で開発され、既報となっているin-houseプログラムを用いて、構築済みの各菌株ゲノム配列からSNPsを検出し、SNPcasterの結果と比較した。

まず、沖縄県集団事例分離EHEC菌株をSNPcasterで解析したところ、最大3 SNPsの差異が認められた。一方、Illuminaリードを用いてin-houseプログラムで解析した結果は最大4 SNPsであり、最小・平均SNPs数および標準偏差についてもSNPcasterの結果と類似していた。したがって、これら2つのプログラムによる解析結果は同等であることが明らかとなった。

次に、Nanoporeゲノム配列をin-houseプログラムで解析したところ、最大11 SNPsの差異が認められ、SNPcasterおよびIlluminaリードを用いた解析結果と比較してSNPs数が増加した。一方で、Illuminaショートリードで修正した後のNanoporeゲノム配列を用いた場合には、最大4 SNPsとなり、その他の指標についてもIlluminaリードを用いたin-houseプログラムの結果と一致した。以上の結果から、Nanoporeゲノム配列をそのままWGS解析に用いた場合にSNPcasterよりも検出SNPs数が増加することは、シーケンスエラーに由来するものと考えられた。

表 1. EHEC 集団事例の菌株を用いた WGS 解析方法の比較

菌株間 SNPs	方法 i	方法 ii	方法 iii	方法 iv
最大	3	4	11	4
最小	0	0	0	0
平均	0.9	1.3	1.3	1.3
標準偏差	0.7	0.9	0.9	0.9

方法 i, Illumina リードを用いた SNPcaster

方法 ii, Illumina リードを用いた in-house プログラム

方法 iii, Nanopore リードを用いた in-house プログラム

方法 iv, Nanopore/Illumina リードを用いた in-house プログラム

（3）EHEC感染症集団事例における起因菌の伝播経路推定

沖縄県EHEC感染症集団事例に由来するO157菌株の完全長ゲノム配列を用いて行ったこれまでのSNPs解析結果に基づいて、MSTを作成し、菌株間の遺伝的差異を確認した（図2A）。複数菌株に共通した染色体上の塩基変異は一箇所（*cheB*遺伝子上のA371G変異）のみであり、合計18菌株を7株（Group I）と11株（Group II）に区別した。さらに、全菌株に保存される3つのプラスミドのうち、1つのプラスミド上の塩基欠失がGroup IIの3菌株に共通して存在することが明らかとなった。この塩基欠失によって、Group IIの11株は、8株（Group II a）と3株（Group II b）に細分化された。

以上の塩基配列に基づく分類から、伝播経路は「① Group I → Group IIa → Group IIb」または「② Group IIb → Group IIa → Group I」のいずれかであると考えられた。ここに検体情報を照らし合わせ、今回のEHECの伝播経路は①であると推定した（図2B）。

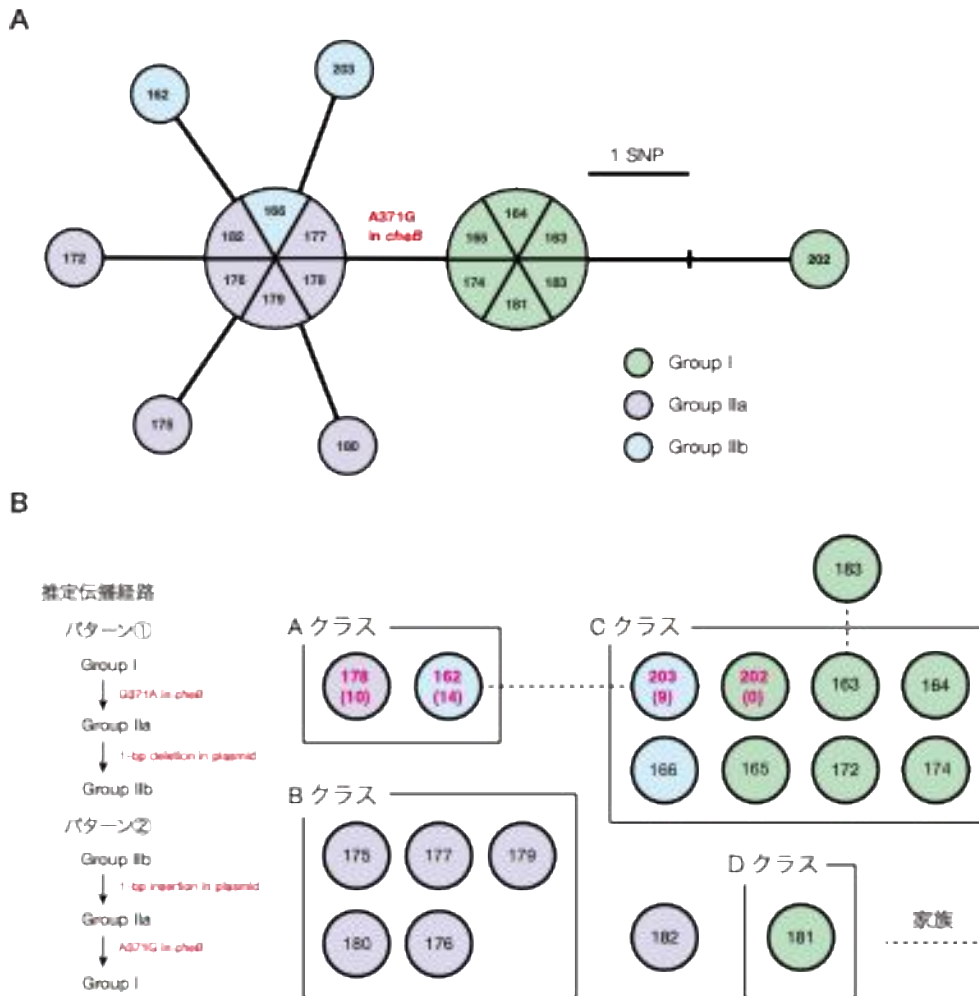


図 2. EHEC 感染症集団事例起因菌の伝播経路の推定

A. EHEC O157 菌株（全 18 株）の WGS 解析によって染色体上に検出された SNPs に基づく Minimum Spanning Tree (MST)。赤字で示した *cheB* 遺伝子上の 1 塩基変異とプラスミド上に特定された 1 塩基欠失により、18 菌株は緑・紫・青で示した 3 つのグループに分類された。

B. 菌株が分離された検体の情報。保育園のクラスと検体 ID を示す。有症者を赤字で示し、初発例からの経過日数を括弧内に示す。初発から次の発生までに 9 日間経過している状況から、パターン①の伝播の可能性が高いと推定された。

(4) WGSデータベースの拡充

離島コホート研究により前年度までに取得したウシ由来EPEC（病原性大腸菌）およびEHECのゲノム配列を公共データベースに登録した。登録にあたっては、沖縄県衛生環境研究所の職員に対し作業手順の指導を行い、地方衛生研究所におけるゲノム解析成果の公開を促進した。また、登録したEHEC（計39株）については、ゲノムリソースとしての価値が高いと判断し、Microbiology Resource Announcements誌にて公表した。

本年度の離島コホート研究で分離されたウシ由来EHECについてもWGS解析を行い、全18菌株の配列を決定した。血清型は15種類と多様であり、広範な系統のEHECが含まれていることが示唆された。なお、全菌株が *stx* 遺伝子を保有していた一方、*eae* 遺伝子陽性株は3株に留まった。

さらに、沖縄県内で発生した集団感染事例から分離された *Campylobacter jejuni* 計15株について、Nanoporeリードの取得およびWGS配列の構築を完了した。これらのゲノムデータは次期プロジェクトへ引き継ぎ、詳細な解析を行う予定である。

(5) 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

前年度に続き、九州地方の衛生研究所職員を対象とした研修会において、「病原細菌の全ゲノム解析方法の現状」と題して講演を行った。本年度は、参加可能な施設数の減少およびウェビナー開催における技術的制約があったため、より広範かつ効率的な情報共有を図るべく、講演内容を動画教材として作成し配布した。あわせて、教材の内容および今後解説を希望するゲノム解析技術に関するアンケートを実施した。その結果、教材は概ね高く評価され、地方衛生研究所の職員がゲノム解析に関してどのような知識や技術を必要としているのかという、具体的なニーズを把握することができた。

D. 考察

WGS解析の精度と実用性

本研究では、実際の食中毒事例から分離されたEHEC O157菌株を用い、Nanoporeゲノム配列がIlluminaリードを用いて構築される配列と同等の精度でWGS解析が可能であることを検証した。前年度の検証結果と同様に、Nanoporeゲノム配列に認められた差異の多くはIlluminaリードによる僅かな修正に留まっており、Nanoporeリードのみによるゲノム構築精度の高さが改めて示された。一方で、解析対象とした18菌株のゲノム配列は極めて類似していたものの、修正される塩基数には菌株間でばらつきが認められ、特にSNVs数において一定の差異が見られた。Nanoporeシーケンシングの精度は近年飛躍的に向上しているが、挿入・欠失(InDels)のエラーは依然として一定程度発生し、本解析においてもリード量の増加がこのエラー率の低減に寄与しないことが明らかとなった。これはNanoporeのシーケンシング原理に起因するものと考えられ、今後も不可避免なエラーとして残存する可能性がある。したがって、Nanoporeゲノム配列を利用する際は、一定数のInDelsが含まれることを前提に解析を行う必要がある。また、EHECゲノムにはプロフェージや挿入配列といった類似配列が複数箇所に存在するため、ショートリードを用いた修正(ポリッシング)が必ずしも正確に行われない可能性についても十分に留意すべきである。

Nanoporeシーケンシングの配列エラーはWGS解析の結果にも直接的に影響し、本解析では菌株間の最大SNPs数が11 SNPsとなり、SNPcasterによる解析結果を上回る結果となった。前年度までの研究により、食中毒事例において疫学的関連性のある菌株間をSNPcasterで解析した際の、遺伝的差異は10 SNPs以下であることが示されている。Nanoporeゲノム配列を用いた解析結果はこの閾値を僅かに上回っていたことから、この配列をWGS解析に適用する際には、従来の基準とは異なる「同一クローン判定基準」を策定するためのさらなる検証が必要であると考えられる。この一方で、Nanoporeリードによる完全長ゲノム配列の構築は、WGS解析に大きな利点をもたらした。具体的には、今回の食中毒事例における伝播経路の推定において、プラスミド配列の比較解析が不可欠であったが、これは完全長ゲノム配列を用いることで初めて可能となった。ショートリードベースのSNPcasterでは不可能な解析領域をカバーできる点は、Nanopore WGS解析の極めて有用な利点であると言える。

Nanoporeシーケンシングの運用上の課題

ゲノムデータベースの拡充を目的としたEHECおよびカンピロバクターのWGS解析において、ほぼ全ての菌株で完全長配列を構築することに成功した。特に、長鎖DNAの精製が可能なGenomic-Tipの利用が、安定した配列構築に寄与したと考えられる。しかし、Genomic-Tipの実務上の課題として、DNA精製工程における所要時間の不安定さが挙げられる。Genomic-Tipを用いたカラム精製では、菌株によってカラムへの透過速度が異なり、精製に多大な時間を要する場合がある。また、溶出後のDNAを適切なバッファーで再懸濁し、安定した濃度を得るための溶解プロセスにも時間を要する。以上の点から、DNA精製工程がNanopore解析全体のボトルネックとなっており、これは地方衛生研究所で実際にシーケンシングに従事している職員との共通認識でもある。今後、NanoporeによるWGS解析を迅速な検査体制として実装させるためには、解析時間の安定化および短縮を実現するためのDNA精製手法の最適化が急務であると思われる。

地方衛生研究所における解析環境の教育的支援

SNPcasterの導入により、地方衛生研究所におけるWGS解析の心理的・技術的なハードルは大幅に低下した。しかし、ツールの操作性と並行して、その背景にあるWGS解析の基礎知識を十分に習得している職員は必ずしも多くはなく、衛生研究所間においても知識の乖離が見られる。特に、数年単位で人事異動が発生する地方衛生研究所の組織特性から、解析技術および知識の継承は極めて困難な課題である。講演会や実技指導といった対面形式の教育は重要であるが、時間的・物理的な制約から頻繁に開催することは困難である。そこで本年度に実施した動画教材による情報共有は、時間や場所に縛られず、必要なタイミングで学習できる点で非常に有効であった。近年の動画制作ツールの普及と配信プラットフォームの整備により、こうした教材の作成と共有は比較的容易に実施可能となっている。動画教材を用いて、SNPcasterを運用するために最低限必要な基礎知識を効率的に伝達する仕組みを構築できれば、職員の入れ替わりがあっても解析精度を維持できる「安定した運用動線」を確保できると考えられる。

E. 結論

本研究により、Nanoporeシーケンシングを用いたWGS解析が、集団食中毒事例におけるEHEC菌株の解析および伝播経路の推定において十分に有用であることが明らかとなった。また、地方衛生研究所との連携による技術指導を通じて、取得したゲノム配列の公共データベースへの登録および国際誌への公表を実現し、地域の解析能力向上と学術的貢献を同時に達成した。また、離島コホート研究由来のEHECおよび集団食中毒事例由来のカンピロバクター菌株についてもWGS配列を決定し、公共データベースへの登録に向けた基盤を構築した。さらに、動画教材を活用した知識伝達モデルを提示し、九州地域の地方衛生研究所におけるWGS解析の普及と、持続可能な情報共有体制の構築に寄与した。

F. 健康危険情報

なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

Kakita T, Iyoda S, Taira H, Kudaken T, Akeda Y, Ohnishi M, Nakamura K. Closed genome sequences of 39 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Okinawa, Japan. *Microbiology Reso*

2. 学会発表

1. 中村 佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏. ナノポアリードのみを用いた全ゲノム配列比較による細菌検査方法の検討. 第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 福岡, 2025. 本研究で構築したゲノム配列決定方法を用いて決定した腸管出血性大腸菌株のゲノム配列の精度に関して検討した結果を報告した。
2. 中村 佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏. 完全長ゲノム配列の比較解析に基づく腸管出血性大腸菌感染症起因菌のゲノム変化の解明. 九州微生物研究フォーラム2025. 沖縄, 2025. 本研究で構築したゲノム配列決定方法を用いて、集団食中毒事例の原因菌の解析と伝播経路の推定を行った結果を報告した。

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7年度）： 国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所応用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・食中毒の広域散発事例を早期に探知し、迅速な行政対応につなげるためには、感染症発生動向調査（NESID）に基づく患者発生情報、食中毒情報、及び MLVA 型別や全ゲノムシーケンス等の分子疫学情報を、可能な限り早期に連結して評価することが重要である。本分担研究では、これまでに構築・改良してきた EHEC 広域食中毒アラートシステムを令和7年度も継続運用し、改訂したベースライン及びアラート判定基準に基づき、NESID データを用いた週次解析を実施した。

2025 年 12 月時点で、0157VT2 及び 0157VT1VT2 を中心とする複数の広域散発疑い事例を検知し、厚生労働省へ情報提供を行った。レベル 2.5 相当の事例 2 件、レベル 4 相当の事例を含む複数事例が確認され、継続事例の可能性が高いものを含め、計 7 件のアラート発出に相当する運用実績が得られた。検知された事例の一部では、地域的集積や時間的集中が認められ、自治体で対応された食中毒事案との整合が確認されたものもあった。一方で、アラートによる早期探知後に感染源の関連性を評価し、再発防止に結びつけるためには、MLVA 等による事後検証、病原体情報との迅速な連結、及び関係部局間の情報集約体制の強化が引き続き課題であった。

また、令和7年度は、カンピロバクター感染症に続発し得る重篤な健康影響としてギラン・バレー症候群（Guillain-Barré syndrome : GBS）に着目した疫学調査を実施した。2023 年以降に特定地域で報告数の増加が指摘された GBS 症例について、医療機関の協力を得て後方視的に情報を収集し、症例定義に基づく症例把握、記述疫学的解析、先行症状の整理を行った。その結果、GBS 症例の増加、先行症状としての胃腸炎の多さ、及び一部症例・関連食中毒事例から分離された *Campylobacter jejuni* における GBS 発症リスクが高いとされる遺伝的特徴の存在が確認された。これらの結果は、食品衛生対策を急性胃腸炎の予防にとどめず、GBS 等の重症合併症を含む疾病負荷の低減という観点から評価する必要性を示すものである。

研究協力者（令和7年度の主たる所属）：
土橋 西紀（同・応用疫学研究センター）
高橋 琢理（同・感染症サーベイランス研究部）
高原 理（同・感染症サーベイランス研究部）
加藤 博史（同・応用疫学研究センター）
八幡裕一郎（同・応用疫学研究センター）
村井 達哉（同・応用疫学研究センターFETP）

A. 研究目的

本分担研究の目的は、詳細な菌株情報が得られていない発生初期の段階において、NESID に基づく EHEC 患者届出情報から広域散発事例又は集団発生疑いを早期に探知し、厚生労働省及び関係自治体による迅速な調査・対応につなげることである。広域に流通する食品を原因とする食中毒では、各自治体においては散発例として認識される症例であっても、全国的には共通の感染源に由来する広域事例である可能性がある。そのため、患者報告数、

地理的分布、血清型、VT 型、HUS 等の重症度情報を早期に整理し、過去データから算出したベースラインとの比較により、通常と異なる増加を迅速に検出することが重要である。

令和7年度は、3 年計画の最終年度として、これまでに改良してきた EHEC 広域食中毒アラートシステムを実際に運用し、その有用性と限界を評価することを目的とした。具体的には、改訂したベースライン及びアラート判定基準に基づく週次解析を継続し、検知された事例について厚生労働省への情報提供を行うとともに、検知後の解釈、情報共有、事後検証、及び分子疫学情報との連結に関する課題を整理することを目指した。

加えて、令和7年度は、カンピロバクター感染症に続発し得る GBS を、食中毒に関連する重篤な健康影響として位置づけ、カンピロバクター感染、食中毒発生状況、病原体情報、及び臨床情報を統合的に検討することを目的とした。特に、特定地域で報

告数の増加が指摘された GBS 症例について、疫学的・病原体学的情報を整理し、感染症対策部門、食品衛生部門、臨床部門、病原体解析部門が連携した One Health 型のリスク評価・情報共有体制の構築に向けた課題を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

EHEC 広域食中毒アラートについては、NESID から得られる EHEC 患者報告情報を用い、集団発生による一時的な報告数増加の影響を考慮しつつ、患者イベント数を過去データに基づくベースラインと比較した。アラートレベルは、患者イベント数と、ベースラインからの逸脱度を組み合わせて評価し、レベル 1 からレベル 4 までに区分した。レベル 2+ までは内部注意喚起及び継続監視、レベル 3 は年齢・性別分布、地理的偏り、重症度等を確認したうえで厚生労働省への情報提供要否を総合的に判断し、レベル 4 は厚生労働省関係部局への情報提供を行う運用とした。

令和 7 年度は、改訂したベースライン及びアラート判定基準に基づき、週次で NESID データを解析し、血清型、VT 型、診断週、HUS の有無、症例数、地理的集積の有無等を確認した。検知された事例については、厚生労働省への情報提供を行うとともに、食中毒事案として自治体に対応した情報との整合性、及び MLVA 等の分子疫学情報による事後検証の必要性を整理した。また、COVID-19 流行後の EHEC 患者報告数の推移を踏まえ、アラート基準の再改訂の必要性についても検討した。

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

図 1. アラート閾値設定

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

図 2. アラートレベルの設定 (COVID-19 前の 2018 年に準拠)

GBS 及びカンピロバクター感染との関連に関する

検討では、2023 年以降に特定地域で報告数の増加が指摘された GBS 症例について、医療機関の協力を得て後方視的に症例情報を収集した。症例定義に基づき症例を把握し、発症時期、年齢、性別、先行症状、胃腸炎症状の有無、鶏肉喫食歴、検査情報等を整理した。また、一部症例及び関連する食中毒事例から分離された *Campylobacter jejuni* について、MLST 型、LOS クラス等の分子疫学的情報を収集し、GBS 発症リスクが高いとされる遺伝的特徴の有無を確認した。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)

倫理面では、EHEC 広域アラートの運用・評価は、主として集計情報及び既存の発生動向情報を用いるものであり、個人を特定するラインリスト作成を目的としない。GBS 関連調査については、現時点では感染症法に基づく積極的疫学調査に関連した対応であり、また集計され感染研 HP 等に公表された情報については本報告書については対象とするところであるが、今後の実施内容に応じて、関係機関の倫理審査及び個人情報保護に関する手続を適切に行っていく。同調査に関連するところとして、高知県における鶏肉の生食と背景要因等に関する研究については倫理審査に向けた手続を実施している。

C. 研究結果

令和 7 年度は、EHEC 広域食中毒アラートシステムを継続運用し、2025 年 12 月時点で複数の広域散発疑い事例を検知した。レベル 2.5 相当として厚生労働省へ情報提供した事例が 7 月から 8 月にかけて 2 件あり、いずれも O157VT2 であった。また、8 月から 9 月にかけて、O157VT2 によるレベル 4 相当の事例が 3 件検知され、厚生労働省へ情報提供した。これら 3 件は、診断週及び症例群の重なりから、継続事例である可能性が示唆された。さらに、11 月には O157VT2 の事例、12 月には O157VT1VT2 の事例が検知され、厚生労働省へ情報提供された。以上により、継続の可能性が高い事例を含め、2025 年 12 月時点で計 7 件のアラート発出に相当する運用実績が得られた。

検知された事例の多くで、地域的集積又は時間的集中の可能性が認められた。特に、診断週第 48 週に検知された O157VT1VT2 事例では、九州地方における患者報告の集積が確認され、実際に自治体により対応された食中毒事案に関する情報とも整合する状況が認められた。これにより、本アラートシステムは、食中毒としての届出や自治体対応に先行又は並行して、広域散発疑い事例の可能性を迅速に把握する手段として有用であることが示され

た。

一方で、検知された事例の中には、その後の情報収集において感染源や共通曝露の特定に至らないものも多かった。アラートは早期探知の端緒として有用であるが、原因食品や感染源の同定、再発防止策の検討に結びつけるためには、MLVA 型別や全ゲノムシーケンス等の分子疫学情報との迅速な連結、自治体をまたぐ症例情報の整理、及び食品衛生部局・感染症対策部局・地方衛生研究所等の情報共有体制が不可欠であることが確認された。

COVID-19 流行後の患者報告数の推移を踏まえてアラート基準の再検討を行ったが、2025 年時点において EHEC 発生動向は 2011～2019 年の水準と大きく乖離していないと判断された。このため、令和 7 年度中のアラート基準の再改訂は実施しなかった。

GBS 関連調査では、2023 年以降に特定地域で報告数の増加が指摘された GBS 症例について、後方視的な症例情報収集及び記述疫学的解析を実施した。その結果、近年の GBS 症例増加が確認されるとともに、先行症状として胃腸炎を呈する症例の割合が高いことが明らかとなった。また、一部症例及び関連する食中毒事例から分離された *Campylobacter jejuni* について分子疫学的解析情報を収集したところ、GBS 発症リスクが高いとされる遺伝的特徴を有する菌株が確認された。これらの所見は、国内においてもカンピロバクター感染と GBS 発症との関連を示唆する基礎的情報である。

D. 考察

EHEC 広域食中毒アラートシステムは、食中毒としての探知以前又は自治体単位では散发例として扱われる段階で、全国的な患者発生情報から広域散发疑い事例を把握する仕組みであり、令和 7 年度の運用実績からも一定の実用性が確認された。特に、複数の O157VT2 事例及び O157VT1VT2 事例について厚生労働省へ情報提供できたこと、また一部事例で自治体に対応した食中毒事案との整合が認められたことは、本システムが行政対応の早期化に資する可能性を示すものである。

一方で、本システムの限界も明らかとなった。第一に、アラートは通常と異なる患者発生の増加を検知するものであり、単独で感染源や共通曝露を特定するものではない。第二に、広域散发事例では、各自治体にとっては単発又は少数例として認識されるため、自治体単位での情報収集だけでは全体像の把握が困難である。第三に、感染源の推定には、患者情報、喫食歴、食品流通情報、MLVA 型別、全ゲノムシーケンス等を組み合わせた総合的評価が必要であるが、現時点ではこれらを迅速に統合する体制に課題が残る。

COVID-19 流行後の EHEC 発生動向については、2025 年時点で 2011～2019 年の水準と大きく乖離

していないことから、基準再改訂は行わなかった。ただし、患者報告数、受診行動、検査実施状況、食品提供・外食行動等は社会状況の影響を受ける可能性があるため、今後もアラート基準の妥当性を継続的に検証する必要がある。

GBS 関連調査では、カンピロバクター感染症を単なる急性胃腸炎としてではなく、GBS 等の重症合併症を含む疾病負荷として評価する必要性が示された。特に、GBS 症例の増加、胃腸炎の先行、及び高リスク株と考えられる *Campylobacter jejuni* の検出は、食品衛生対策が重症合併症の予防にも寄与し得ることを示唆する。一方で、本調査は症例数が限られた地域相関研究であり、症例対照研究等による因果関係の直接的証明は行っていない。また、GBS 及びカンピロバクター感染症の全国的な発生動向を体系的に把握するサーベイランス体制は十分ではなく、今後は診療情報、病原体情報、食中毒情報、食品衛生情報を統合する枠組みが必要である。

以上より、EHEC 広域アラートと GBS 関連カンピロバクター調査はいずれも、感染症対策、食品衛生、病原体解析、臨床情報を横断的に統合する必要性を示している。特に、養鶏場、と殺、食肉処理、流通、消費、臨床・公衆衛生に至る一連の過程を対象とした One Health 型の情報共有とリスク評価体制の構築が今後の重要課題である。

E. 結論

本研究で得られた成果は、EHEC 広域散发疑い事例の早期探知、厚生労働省等への情報提供、及び検知後の分子疫学情報との連結・事後検証体制の改善に活用する。

また、カンピロバクター感染と GBS 等の重症合併症に関する知見は、食品衛生対策を重症化予防の観点から評価し、感染症対策、食品衛生、臨床、病原体解析部門が連携したリスク評価体制の検討に活用する。

F. 研究発表

1. 論文発表

特記事項無し

2. 学会発表

○Tatsuya Murai et al. 高知県におけるギラン・バレー症候群の発生状況の発表。
2nd SAFETYNET Conference、2025 年 9 月 25 日（クアラルンプール市）

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

○村井達哉、他．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)．全国衛生微生物技術協議会レファレンスセンター等連絡会議カンピロバクター分科会：第 45 回研究会、2025 年 7 月 16 日 (札幌市)

○砂川富正．ギラン・バレー症候群とカンピロバクターの関連性、現状と課題について．内閣府食品安全委員会微生物・ウイルス専門調査会、2025 年 12 月 18 日 (東京都)

令和7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

腸管出血性大腸菌（EHEC）は、重症化リスクの高さから重要な食中毒起因菌とされている。本研究では、食品関連サンプル由来 EHEC 株に関する分子疫学的知見の蓄積を目的として、牛由来 EHEC 0157 株の MLVA 解析結果と分離年および *stx* subtype 保有パターンとの関連を解析するとともに、牛関連食品検体からの EHEC 分離を実施した。牛由来 EHEC 0157 41 株について MLVA 解析結果に基づく Minimum spanning tree を作成した結果、分離年による明確なクラスターは認められなかった一方で、*stx2c* 単独保有株によるクラスターが認められた。また、市販牛関連食品 49 検体および牛盲腸 66 検体から EHEC 分離を実施した結果、市販食品検体では 8 検体から 9 株、牛盲腸検体では 16 検体から 20 株の EHEC が分離された。市販食品由来株は全て *eae* 陽性であり、Og103 および Og157 などヒト感染事例で報告頻度の高い O 遺伝子型も検出された。一方、牛盲腸由来株では *eae* 陰性株が多く認められた。以上の結果から、*stx* subtype 保有パターンと系統学的背景との関連性が示唆された。また、牛関連食品および牛盲腸には多様な EHEC が存在しており、その一部にはヒト感染症との関連が懸念される血清群や遺伝子型が含まれることが示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）による食中毒は、届出数の多さや重症化リスクの高さから、日本におい

て特に重要な食中毒対策対象となっている。EHEC 集団感染事例発生時には、感染源および感染経路を迅速に把握し、感染拡大を防止す

るため、患者由来株や食品由来株の迅速かつ高精度な菌株解析が求められる。近年では、反復配列多型解析法（multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis：MLVA 法）が迅速性および識別能に優れることから、国内の分子疫学解析に広く利用されている。EHEC 食中毒の原因食品としては、牛肉、牛レバー、チーズなど牛関連食品が多く報告されている。EHEC は哺乳動物や鳥類の腸管内を主な生息場所とし、特に牛の腸管内容物や糞便から高頻度に分離されることが知られている。そのため、牛糞便による食品汚染や、牛関連食品中に残存した EHEC が食中毒発生に関与している可能性が指摘されている。そこで本研究では、食品関連サンプル由来 EHEC 株に関する分子疫学的知見の蓄積を目的として、令和 5～6 年度に収集した牛由来 EHEC 0157 株について、MLVA 解析結果と分離年および *stx* subtype 保有パターンとの関連を解析した。さらに、食品関連由来株を追加収集するため、牛関連食品検体からの EHEC 分離を実施した。

B. 研究方法

1. 牛由来 EHEC 株の MLVA 型と分

離年および *stx* subtype 保有パターンの関係の解析

1) 供試菌株

令和 5 年度および令和 6 年度に国内食肉処理施設に搬入された牛の糞便から分離された EHEC 0157 41 株を供試した。

2) 分離年および *stx* subtype 保有パターンの解析

供試菌株の MLVA 型、分離時期および *stx* subtype 保有パターンの関連を明らかにするため、令和 6 年度までに取得した MLVA 解析結果に基づき、各遺伝子座のリポート数を用いて GrapeTree により菌株間の比較解析を行った。作成した Minimum spanning tree (MST) 上に各菌株の分離年および *stx* subtype 保有パターンを図示した。

2. 牛関連食品検体からの EHEC 株の分離

1) 検体

小売店で購入した食品検体（牛小腸 12 検体、牛大腸 25 検体および牛スライス肉・牛小間切れ肉 12 検体：計 49 検体）および家畜の内蔵臓器専門店を介して入手した牛盲腸検体（66 検体）を供試した。

2) EHEC の分離培養

小売店で購入した食品検体 50 g

に modified Tryptic Soy Broth (mTSB) 150 mL を加え、ストマッカー処理後に $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22～24 時間培養した。培養液から DNA をアルカリ熱抽出し、表 1 のプライマーおよびプローブを用いて multiplex real-time PCR で *stx*、*eae* および主要 7 血清 O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 関連遺伝子をスクリーニングした。*stx* 陽性かつ O26、O45、O103、O111、O121、O145 あるいは O157 のいずれかが陽性となった培養液は、陽性血清群を対象とした免疫磁気ビーズ法で濃縮した。濃縮液を塩酸で酸処理し、濃縮液および酸処理液をソルビトールマッコンキー培地 (SMAC)、セフィキシム・亜テルル酸添加 SMAC (CT-SMAC)、クロモアガー STEC 培地 (CHSTEC)、セフィキシム・亜テルル酸添加 CHSTEC (CT-CHSTEC) に塗抹し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18～24 時間培養した。*stx* 陽性かつ O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 のいずれかも陰性であった培養液は、免疫磁気ビーズ法を実施せず、酸処理後に同様に培養した。培地上に形成された大腸菌様コロニーから DNA を熱抽出し、上述の multiplex real-time PCR で *stx* 陽性となったコロニーを単離

し、市販食品分離株として保存した。

牛盲腸検体 25g に mTSB あるいは NmEC 225 mL を加え、ストマッカー処理後に $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22～24 時間培養した。以降の分離培養は、市販食品検体と同様の手順で実施した。分離株のうち、multiplex real-time PCR でいずれの 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 遺伝子型を決定した。本報告書では、*stx* 陽性大腸菌を EHEC と表記した。

C. 研究結果

1. 牛由来 EHEC 株の MLVA 型と分離年および *stx* subtype 保有パターンの関係の解析

菌株の MLVA 型による MST と分離年の関係を図 1 に示した。分離年による偏りは認められなかった。また、菌株の MLVA 型による MST と保有する *stx* subtype パターンの関係を図 2 に示した。*stx2c* を単独保有するクラスターが認められた。

2. 牛関連食品検体からの EHEC 株の分離

市販食品検体 49 検体のうち 8 検体が EHEC 分離陽性となり、9 株

の EHEC が分離された（表 1）。各検体からの分離株の内訳は、牛小腸検体から 0g103 が 1 株、牛大腸検体から 0g103 が 3 株、0g157 が 3 株および 0gUT が 1 株、牛スライス肉検体から 0g103 が 1 株であった。全ての分離株が *eae* 陽性であった。また、牛盲腸検体 66 検体のうち 16 検体が EHEC 分離陽性となり、20 株の EHEC が分離された（表 2）。分離株の内訳は、0g103 が 5 株、0g109 が 1 株、0g116 が 2 株、0g119 が 1 株、0g157 が 1 株、0g171 が 1 株、0g5413 が 8 株および 0gN10 が 1 株であった。分離株のうち、0g103、0g109 および 0g157 は全て *eae* 陽性であった。

D. 考察

本研究では、牛由来 EHEC 0157 株の MLVA 型と分離年および *stx* subtype 保有パターンとの関連を解析するとともに、牛関連食品検体および牛盲腸検体からの EHEC 分離を実施した。牛由来 EHEC 0157 株の MLVA 解析では、分離年ごとの明確なクラスター形成は認められなかったことから、特定年度に限定して流行した菌株が優占しているというよりも、複数系統の菌株が継続的に牛群内に維持されている可能性が示唆された。一方で、

stx subtype 保有パターンとの関連性解析では、*stx2c* 単独保有株が一定のクラスターを形成していた。*stx* subtype は志賀毒素産生性や病原性評価に関連する重要な指標であり、本結果は、特定の *stx* subtype 保有パターンと系統学的背景との間に一定の関連が存在する可能性を示していると考えられた。

牛関連食品検体からの EHEC 分離では、市販食品検体 49 検体中 8 検体から 9 株の EHEC が分離された。特に牛大腸検体からは 0g103、0g157 および 0gUT が分離され、牛内臓肉が EHEC 汚染源となり得ることが改めて確認された。また、市販食品由来株はいずれも *eae* 陽性であり、付着因子を保有する株が一定頻度で流通食品中に存在していることが示された。0g103 および 0g157 は国内外のヒト感染事例でも報告頻度の高い血清群であることから、牛関連食品における継続的な監視の必要性が示唆された。牛盲腸検体では、66 検体中 16 検体から 20 株の EHEC が分離され、市販食品検体と比較して多様な O 遺伝子型が検出された。特に 0g5413 が最も多く分離された一方で、0g103 および 0g157 も検出された。さらに、*eae* 陽性株は

Og103、Og109 および Og157 に限られ、多くの株は *eae* 陰性であった。本報告書では *stx* 陽性大腸菌を EHEC として取り扱ったが、*eae* 陰性 *stx* 陽性大腸菌についてはヒトに対する病原性が明確でない株も含まれる可能性がある。その一方で、牛腸管内には多様な *stx* 保有大腸菌が存在していることが示され、牛が *stx* 遺伝子保有菌の重要なリザーバーであることを支持する結果と考えられた。

E. 結論

牛関連食品および牛盲腸には多様な EHEC が存在しており、その一部にはヒト感染症との関連が懸念される遺伝子型が含まれることが示された。今後は、全ゲノム配列を用いた臨床分離株との比較解析を組み合わせることで、牛由来株、食品由来株およびヒト感染事例との関連性をさらに詳細に評価する必要があると考えられた。

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

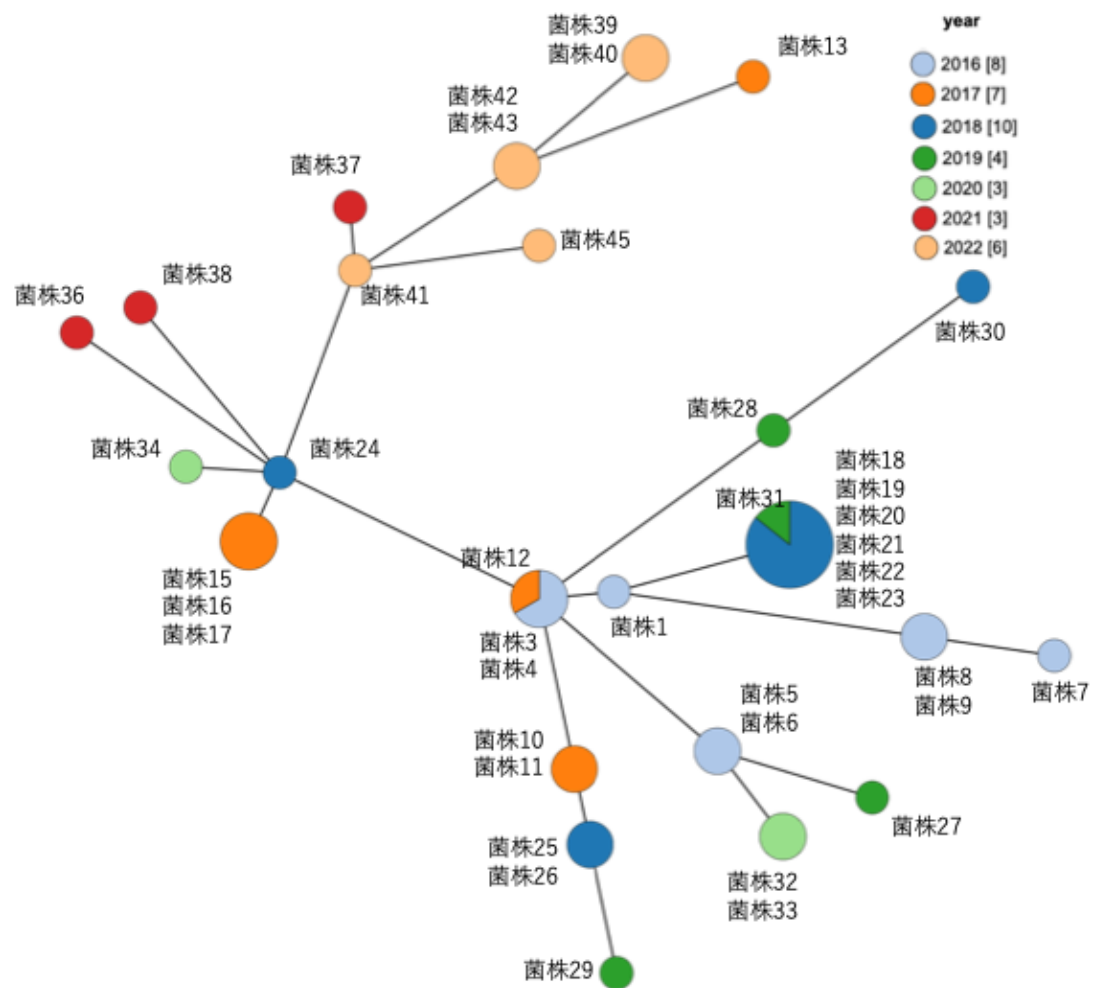


図1 牛由来 EHEC O157 株の MLVA 型に基づく Minimum spanning tree と分離年との関連

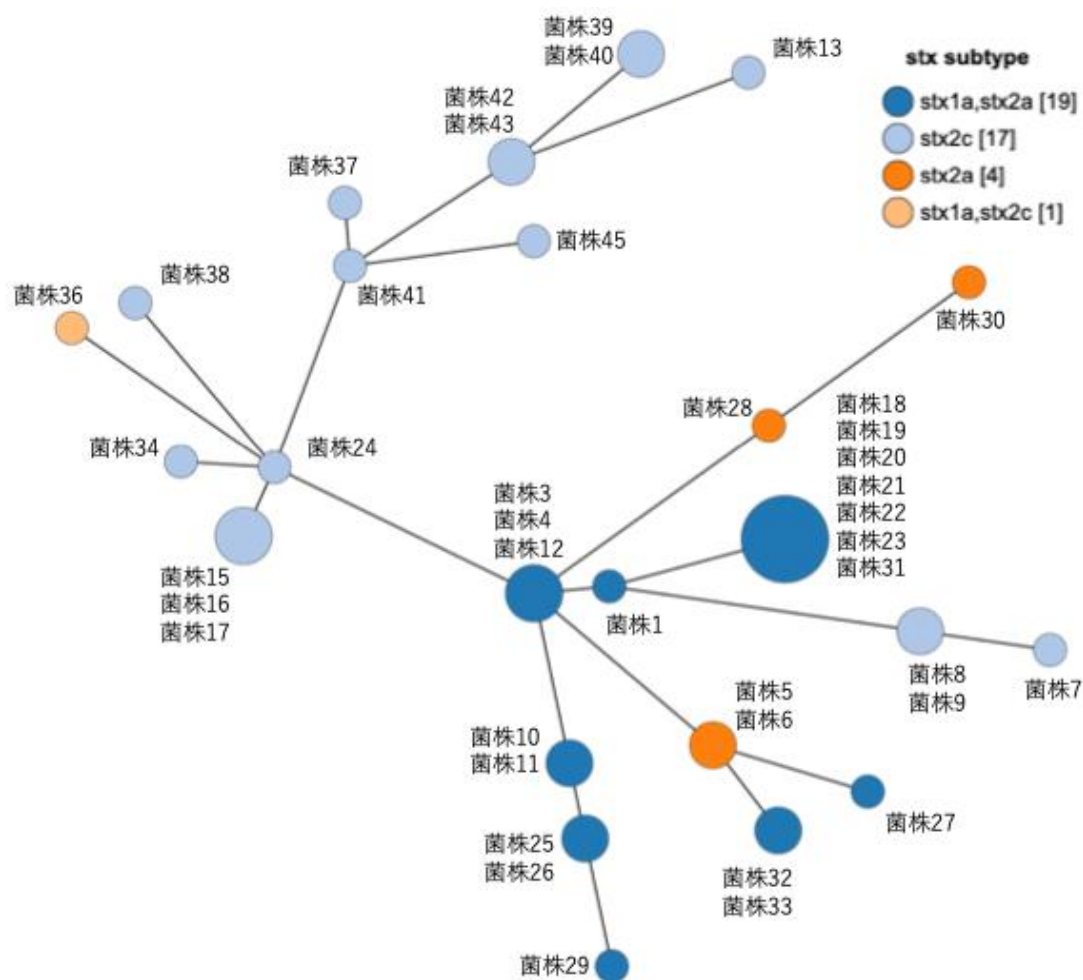


図2 牛由来 EHEC O157 株の MLVA 型に基づく Minimum spanning tree と *stx* subtype 保有パターンとの関連

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	TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC	
	<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	
Assay5	WzxO103	Wzx O103-F	TTGGAGCGTTAACTGGACCT	USDA
		Wzx O103-R	ATATTCGCTATATCTTCTTGCGGC	
		Wzx O103-P	AGGCTTATCTGGCTGTTCTTACTACGGC	
	WzxO145	Wzx O145-F	AACTGGGATTGGACGTGG	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. 市販の牛関連食品からの EHEC 分離結果

検体種類	検体数	分離陽性検 体数	分離株			
			O遺伝子型	stx	eae	菌株数
牛小腸	12	1	Og103	+	+	1
牛大腸	25	6	Og103	+	+	3
			Og157	+	+	3
			OgUT	+	+	1
牛スライス肉・ 牛小間切れ肉	12	1	Og103	+	+	1
計	49	8				9

表 3. 牛盲腸検体からの EHEC 分離結果

検体種類	検体数	分離陽性検 体数	分離株			
			O遺伝子型	stx	eae	菌株数
牛盲腸	66	16	Og103	+	+	5
			Og109	+	+	1
			Og116	+	-	2
			Og119	+	-	1
			Og157	+	+	1
			Og171	+	-	1
			Og5413	+	-	8
			OgN10	+	-	1
計	66	16				20

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改良版研修会の実施、及びゲノムデータベースを活用した*in silico* MLVAによる性能評価

研究代表者	明田 幸宏	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	平井 晋一郎	国立感染症研究所 検査診断技術研究部
研究協力者	佐藤 梢	国立感染症研究所 検査診断技術研究部
研究協力者	松山 満貴	長野県環境保全研究所 感染症部
研究協力者	重村 洋明	福岡県保健環境研究所 保健科学部

地方衛生研究所における腸管出血性大腸菌(EHEC)の分子疫学サーベイランスでは、反復配列多型解析(MLVA)法が広く用いられている。本研究では、MLVA法の検査精度向上を目的として、解析実習を強化した改良版研修会を実施するとともに、公開ゲノムデータを活用した*in silico* MLVA解析により本法の性能評価を行った。

研修会では、GeneMapperによるデータ解析及び実務上の課題への対応に重点を置き、実習時間の拡充を行った。その結果、研修生の理解度及び業務への活用度はいずれも高い評価を示し、特に講義・実習の量及び速度については、昨年度の研修会と比較して明らかな改善が認められた。

in silico MLVA解析では、分離菌株数が主要3血清型と比較して限られているO145及びO165を対象に性能評価を行った。その結果、O145では既報と概ね一致した結果が得られた一方、O165では複数の領域において欠損率に差異が認められた。これらの差異は、プライマー配列とアセンブル配列の不一致や標的領域の欠失等に起因する可能性が示唆された。

以上より、*in silico* MLVA法は実際のMLVA法の性能を評価する有用な手法であり、分離菌株数が限られている血清型においても、本法の改善に資する知見を得ることが可能であると考えられた。

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、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⁾。本研究班では、これまで精度管理試験、トラブルシューティング集の作成、及び研修会の実施を通じて、地衛研におけるMLVA法の検査精度向上を支援してきた。

昨年度は、MLVA法に関する解析ソフトの操作及び実験手技の確実な習得と改善を目的として、講義及び実習から成る研修会を実施した²⁾。その結果、研修全体としての理解度及び活用度は高かった一方で、MLVA法データの解析実習については、「実習量に対して時間が不足している」との意見が約半数を占めた。これらの結果から、検査能力のさらなる向上を図るためには、解析ソフト実習の内容を強化した改良版研修会の実施が必要と考えられた。

一方、国内の地衛研におけるMLVA法は、これまで主にO157、O111及びO26の主要3血清型を対象として運用されてきたが¹⁾、近年ではO91、O103、O121、O145及びO165に対するMLVA法も開発されている³⁾。しかし、これらの血清型は主要3血清型と比較して分離菌株数が限られてお

り、既報において供試菌株数が十分でない血清型も存在する。

近年、全ゲノム解析の普及により、公開データベースに蓄積されるゲノム情報は飛躍的に増加している。特定の血清型においては、地域によって系統の分布⁴⁾や生化学的性状の陽性率が異なると報告されている⁵⁾。ゲノムデータを活用することで、地域性に依存しない多様な菌株の解析が可能となる。これにより、MLVA法の性能をより詳細に評価できると考えられる。

そこで本年度は、地衛研におけるMLVA法の検査精度向上を目的として、解析実習を強化した改良版研修会を実施するとともに、ゲノムデータベースを活用した*in silico* MLVA解析により、本法の性能評価を行った。

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8年2月3日(水)、5日(木)及び6日(金)に実施し、講義及び実習で構成した(表1)。研修内容は概ね前年度と同様とし、初日はZoomによる遠隔形式で、MLVA法の基礎、異同判定及びトラブルシューティングに関する講義を実施した。2日

目及び3日目は、国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所(感染研)村山支所において集合形式で実習を行った。

実習では、異なるクローン由来のEHEC O157、O26及びO111の18菌株を使用し、各研修生に3菌株ずつを血清型が判別できないよう配布した。これらを用いて、DNA抽出、PCR反応、電気泳動及びGeneMapperによるMLVAデータ解析を行った。

前年度のアンケート結果を踏まえ、今年度は「GeneMapperによるデータ解析」及び「事前に募った質問や問題点への回答」に重点を置き、実習時間を拡充した。具体的には、解析実習を1区分2時間から3区分(区分:実習③、⑤及び⑥)計5時間に増加させ、質問等への回答(区分:実習⑦)を30分から1時間に延長し、昨年度に指摘された課題の改善を図った。

(2)研修生定員及び対象者

今年度の研修会においても、研修生の定員は、MLVAデータからタンデムリピート(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6台借用し、1台を講師用、残り5台を研修生用とした。研修会では1台のPCを3名で使用する体制とし、1班3名・全5班構成、計15名を定員とした(図1)。これにより、各班に1台のPCが割り当てられた。また、前年度と比較してPCを1台追加で確保したことにより、定員を1班増加させた。

研修会の対象者は、前年度と同様に、EHECのMLVA法を導入予定の地衛研等の検査機関、または新たに本法の担当となった職員とし、導入から3年以内又は実施経験3年以内の職員を要件とした。

(3)研修生の選考

研修会の募集及び参加者の選定は、概ね前年度と同様に実施した。令和7年10月20日(月)に、66施設の地方衛生研究所及び20施設の中核市・特別区の検査機関に対して研修会の実施を通知し、同年11月21日(金)を申込締切日とした。申込時には、施設のMLVA法導入年数や職員の経験年数等を基に研修参加の必要性を評価するとともに、研修機会の均等化に配慮して参加者の選定を行った。選定結果は同年11月28日(金)に通知した。

(4)落選者へのフォロー対応

選考の結果、落選した者に対しては、講義の受講機会を提供した。前年度は研修会の講義を録画し、事後に動画配信サイトを通じて公開したが、今年度は提供内容を見直し、初日の講義のみ当選者と共に受講可能とした。一方、当選者については、すべての講義及び実習を受講可能とした。

(5)アンケートによる評価

研修会終了後、参加者(講義及び実習の両方に参加した者)を対象にアンケートを実施した。アンケートの内容及び評価方法は前年度と同様とし、研修会の課題の把握に用いた。

2. *in silico* MLVA 法による性能評価

(1)解析対象菌株の決定及びデータ取得

解析対象とする血清型の候補として、泉谷らの報告³⁾において供試菌株数が50株未満であった血清型(O91、O145及びO165)を選定した。これらの血清型について、米国国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information: NCBI)のSequence Read Archive(SRA)において“E. coli”、“Shiga toxin”及び各血清型をキーワードとして検索し、50株以上のデータが取得可能な血清型を解析対象とした。取得したショートリードデータ(Illumina プラットフォームによるpaired-end リード)はCLC Genomics Workbench(Qiagen)を用いてde novo アセンブルを行った。得られたアセンブリに対し、Leeらにより開発された*in silico* PCR法(isPCR)を用いて、O-genotyping⁶⁾及び*stx*遺伝子⁷⁾の検出を行い、解析対象菌株の精査を行った。

(2)*in silico* MLVA 法の実施

MLVA解析は、泉谷らの報告³⁾に基づくプライマー配列を用い(17領域からなるMLVA17及び43領域からなるMLVA43)、アセンブリデータに対してisPCR(未公開、in-house スクリプト)を実施した。プライマーの一致率は85%を基本条件とした。得られた増幅産物について、配列及びサイズ情報から各MLVA領域のTR数を算出した。また、isPCRにおいて一方のプライマーのみがヒットした領域についても抽出し、周辺配列を基にTR数の推定を試みた。さらに、(3)に示す分離能評価の結果、既報と大きく乖離した領域については、プライマー一致率を変更して再解析を行い、結果の妥当性を検証した。

(3)*in silico* MLVA 法の性能評価

各MLVA領域について、多様性指数(Simpson's diversity index; D値)及び欠損率(null率)を算出し、既報³⁾との比較により*in silico* MLVA法の分解能を評価した。また、得られたMLVAプロファイルを基に、BioNumerics(Applied Maths)を用いてminimum spanning tree(MST)を作成し、菌株間の関係性の可視化及び分解能の評価を行った。

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7施設の中核市の検査機関から各1名の応募があり、全ての施設が参加要件を満たしていた。研修参加の必要性及び研修機会の均等化に配慮して選考を行った結果、13施設の地衛研及び2施設の中核市の検査機関の参加を許可した。また、応募の際、2施設から講義のみの参加を希望する申し出があった。これら2施設については、選考で落選した14施設と併せて、初日に遠隔で実施する講義への参加を認めた。

(2)研修会の実施

初日の講義は、参加者、落選者及び講義のみ参加希望者の計31名が受講した(表1)。初日の講義

終了後、参加者15名のうち、1名が体調不良により欠席した。2日目以降の実習は大きなトラブルなく実施できたが、GeneMapperによるMLVA法データの解析(1)及び(2)(区分:実習③及び⑤)において、進捗が遅れた。そこで、GeneMapperによるMLVA法データの解析(3)(区分:実習⑥)は、初日に実施した講義「MLVA法におけるトラブルシューティング」(区分:講義⑤)の実技に相当する内容であった。そのため、未実施であっても習得効果への影響は小さいと考えられたため、本実習を取りやめた。

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回答を行ったが(区分:実習⑦)、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」、「PCR産物の希釈倍率」及び「その他」の5つに大別された。最終日は予定時刻どおりに研修会を終了した。なお、研修後のフォローとして、全ての実習で取り扱った、又は取り扱う予定であったデータ及び課題を参加者に送付した。

(3) アンケートによる評価

講義及び実習の両方に参加した14名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、昨年度、変更の要望が多かった「日数」及び「カリキュラムへの要望」について、今年度は90%以上が肯定的に評価した(図2)。「時期」については4名から要望があったが、年度の早い時期、年度末、年度末以外の時期、インフルエンザ流行期以外の時期と、意見は分かれた。「Zoomの音声・画像」については2名が問題ありと回答したが、そのうち1名は、音声の途切れは直ぐに解決し、受講への影響はなかったと回答した。

各講義及び実習への評価として、「理解度」及び「業務への活用」では、全ての講義及び実習について、上位2段階の評価または最上位の評価のみであった(図3A、B)。「講義・実習の量」及び「速度」については、昨年度の研修会では「【実習】GeneMapperによるMLVA法データの解析」及び「【その他】事前に募集したご質問への回答」について、約半数の研修生が適切ではないと回答していたが、今年度は大半が適切と回答した(図3C、D)。なお、講義の速度が速すぎると回答した研修生は同一の班(5班)に属していた(図1)。

講義の速度が速すぎるとの回答が同じ班に集中した理由を明らかにするため、寄せられたコメントを精査したところ、「経験の浅い研修生が集まっていたため、実習課題を最後まで仕上げる時間が足りなかった。試行錯誤するための時間がもう1日欲しかった。」及び「スクリーンに映し出された講師の操作画面が非常に小さく、操作説明についていけなかった。」との記載があった。実習テキストにはGeneMapperの実際のPC上の画面のスクリーンショットを掲載したが、そのみでは不十分だったことが示唆された。

2. *in silico* MLVA 法による性能評価

(1) 解析対象菌株の決定及びデータ取得

NCBIにおいてキーワード検索を行った結果、

O145及びO165について、それぞれ50以上のSRAデータが得られたため、これら血清型のデータをダウンロードした。取得したSRAをアセンブルした後、isPCRによりO-genotyping及びstx遺伝子の検出を行った。その結果、O165の1データにおいて血清型が判定不能(O群不明)であったため、解析対象から除外した。最終的に、O145及びO165のSRAは、それぞれ104株及び79株となった。

(2) *in silico* MLVA法の実施及び性能評価

本研究の*in silico* MLVA法と既報³⁾の間でD値を比較したところ、O145ではMLVA17及びMLVA43のいずれにおいても、本研究の方がやや高値を示した(表2)。一方、O165では、MLVA17においては既報の方が高値を示し、MLVA43では同程度であった。

本研究及び既報³⁾のMLVAにおける各領域の検出状況を比較したところ、O145では全ての領域において欠損率及びD値に明らかな差は認められなかった(表3A)。本研究では、isPCRにおいて遺伝子増幅と判定するプライマー一致率を85%とした。既報では領域O157-17及びO157-19の欠損率はそれぞれ6%及び0%であるが、*in silico* MLVAにおいて遺伝子増幅ありの一致率を90%とした場合、これらの欠損率は100%となった。なお、領域O157-17及びO157-19についてプライマー配列とアセンブル配列を比較したところ、フォワード又はリバースプライマーにおいて4塩基の不一致が認められた(表4)。

次に、O165について比較したところ、EHC-6、EH111-8、O157-37及びq1705の4領域では、既報³⁾における欠損率は0%であるのに対し、本研究では61%~100%と高値を示した(表3B)。これらの領域について、isPCRにおける増幅判定のプライマー一致率を70%まで低下させても、欠損率に変化は認められなかった。領域EHC-6(欠損率72%)については、TR数を算出できたアセンブル配列を確認したところ、不明塩基(N)が多く含まれており、アセンブルが適切に行われていないことが欠損率の上昇に寄与した可能性が示唆された。一方、領域EH111-8(欠損率100%)では、全菌株のアセンブルにおいて、フォワード又はリバースプライマーのいずれか一方に一致する配列すら検出されなかった。また、領域O157-37(欠損率61%)では、29菌株のアセンブルにおいてフォワードプライマーとほぼ一致する配列が検出されたが、リバースプライマーに近似する配列は検出されなかった(表4)。さらに、領域q1705(欠損率68%)では、isPCRで増幅が認められなかった54菌株のアセンブルにおいても、プライマーに近似する配列は検出されなかった。これら4領域とは対照的に、領域q1720では、既報における欠損率がほぼ100%であるのに対し、本研究で増幅ありの場合のプライマー一致率を85%とすると欠損率が27%と低値を示した。遺伝子増幅ありと判定されたアセンブルでは、プライマーとほぼ一致する配列が確認された(表4)。なお、増幅ありと判定するプライマー一致率を95%にすると、欠損率100%となり既報に近い値を示した。

本研究では、O165においてMLVA17のD値が既報³⁾より低値を示したことから、*in silico* MLVAの結果に基づきMSTを作成し、分解能の詳細を検討した(図4)。その結果、MLVA17では79菌株中22菌株が集積する大きなノードが形成された。このノードに含まれる菌株は、MLVA43では複数のノードに分散した。さらに、当該22菌株では、既報と欠損率が大きく異なったEHC-6、EH111-8及びO157-37の各領域において、いずれもTRが検出されなかった。これらの結果から、MLVA17における巨大ノードの形成は、これら特定領域の欠損に起因し、結果としてD値の低下に寄与した可能性が示唆された。

D. 考察

アンケートの結果、今年度のMLVA研修会では全体及び各講義・実習に対する研修生の評価は高く、本研修会が有効性の高い研修であったことが示された。昨年度の研修会では、GeneMapper実習及び質問等への回答に十分な時間を確保できないという課題が残ったが²⁾、今年度は各実習時間を延長したことで、この課題は概ね解消した。

しかし、同じ班に属する研修生から、昨年度と同様に時間が足りないとの回答があった。GeneMapper実習(表1 区分: 実習③、⑤及び⑥)及び事前に募集した日常検査における質問や問題点への回答(区分: 実習⑦)について、時間不足と回答した研修生が同じ班に集中していた。その原因として、(1)経験年数の少ない研修生が同じ班に集まっていたこと、(2)講師用PCの画面を投影するスクリーンから遠い座席であったため、作業内容を把握しづらい環境であったこと、の2点が考えられた。(1)への対策として、研修生募集時に経験年数等を照会するだけでなく、年間に実際に検査する検体数を確認することで、研修生の検査レベルをより適切に把握することが有効と考えられた。(2)への対策としては、スクリーンに加えて講義室後方に大型モニターをサブ画面として設置し、HDMI分配器を用いて操作画面を複数箇所に投影することが有効と考えられた。また、講師用PCのOSがWindowsであることから、画面拡大機能(Windowsキーと「+」及び「-」キーの同時押し)の活用が有効であったと考えられた。

本研究では、全ゲノム解析の普及に伴い公開データベースに蓄積されたゲノムデータを利用し、*in silico* MLVA法により本法の性能を評価した。その結果、本研究の所見は概ね既報³⁾を支持するものであったが、いくつかの新たな知見も得られた。例えば、O145では、既報において領域O157-17及びO157-19の欠損率はそれぞれ6%及び0%とされているが、本研究では遺伝子増幅ありの基準をプライマー一致率90%とした場合、これらの領域の欠損率は100%となった。これは、これらの領域においてフォワードまたはリバースプライマーの5'末端側の4 bpがアセンブル配列と一致しなかったことが原因と考えられた。しかし、実際のMLVA法では伸長性の高いマルチプレックスPCR酵素を用いることから、5'末端側の数塩基の不一致が存在しても、遺伝子増幅が認められる可能性がある。これらのプラ

イマーはO145以外の血清型にも対応しているため、O145用に新たにプライマーを設計し直すことも一案であるが、MLVA法は複数の血清型を同一のプライマーミクスチャーで検出できる利便性を有する。従って、プライマーの追加や再設計の必要性については、実際の菌株を用いた検討結果を踏まえて判断すべきと考えられる。

O165では、既報³⁾において欠損率0%とされているに関わらず、*in silico* MLVA法では欠損率が60%以上となった4領域(EHC-6、EH111-8、O157-37及びq1705)が認められた。アセンブル不良が示唆されたEHC-6を除く3領域について見ると、領域EH111-8では、全菌株においてフォワードまたはリバースプライマーに対応する配列が認められず、欠損率が異なった原因の推定は困難だった。領域O157-37では、29菌株においてフォワードプライマーにほぼ一致する配列がアセンブル中に認められた一方、リバース側の配列は検出されなかった。このことから、*in silico* MLVA法では標的外領域を検出し、本来のTR領域についてはプラスミド上にあり脱落している可能性も考えられた。領域q1705では、全菌株のアセンブルにおいてプライマー配列に近い領域が認められなかったことから、本プライマーに対応しないクローンが存在する可能性が示唆された。

一方、領域q1720では、既報³⁾において欠損率100%とされているのに対し、本研究では遺伝子増幅ありと判定するプライマー一致率を85%とした場合、欠損率は27%となり、大きく異なった。遺伝子増幅産物ありの菌株についてTR数を求めると全て1であり、TRの存在を確実に確認することは困難であった。そのため、この遺伝子増幅が非典型的なものであるのか、あるいは既報では把握されていなかったこの領域にTRを持つクローンが存在することを示しているのかは明らかではない。従って、本研究で遺伝子増幅が認められた菌株については、実際の菌株を用いた実験的検証が必要である。

本研究には次のリミテーションがある。*in silico* MLVA解析は公開データベースに登録されたゲノムデータに依存するため、菌株の多様性の影響を受ける。本研究ではNCBIに登録されているO145及びO165のSRAデータを網羅的に収集して解析したが、その多くは国内の特定施設により取得されたデータであり、多様性に偏りが存在する可能性がある。一方で、本研究で得られた分離能は国内サーベイランスに基づく既報³⁾と概ね一致しており、本データセットが国内の菌株集団を一定程度反映している可能性が示唆された。さらに、既報では示されていない新たな知見も得られたことから、本データセットは本法の性能評価において一定の有用性を有すると考えられる。

以上のように、本研究で実施した*in silico* MLVA法は、公開ゲノムデータを活用することで、実際のMLVA法の性能を多角的に評価する有効な手段であると考えられた。特に、O165において認められた複数領域での欠損率の差異は、MLVA17の分離能やMST構造にも影響を及ぼしており、本法の特性を理解する上で重要な知見と考えられる。今後、これらの知見について実際の菌株を用いた検証を

行うことで、MLVA法の適用範囲及び解析精度に関する理解がさらに深化し、本法の改良や運用の最適化に資することが期待される。

E. 結論

MLVA法の改良版研修会の実施により、解析実習の内容を強化したことで、昨年度の研修会と比較して、より効果的な技術指導を行うことができた。また、ゲノムデータベースを活用した*in silico* MLVA解析を実施することで、分離菌株数が限られている血清型についても、MLVA法の改善に資する知見を得ることができた。

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。ご多忙の中、本年度のMLVA法研修会に応募、またはこちらに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. 2019; 36(1): 10-12.
- 2) 明田ら. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)総括研究報告書「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」. 2024; 52-65.
- 3) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481-490.
- 4) Mellor GE et al. J Clin Microbiol. 2014; 53(2): 579-586.

- 5) Karch H et al. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2043-2049.
- 6) Iguchi A et al. J Clin Microbiol. 2015; 53(8): 2427-2432.
- 7) Scheutz F et al. J Clin Microbiol. 2012; 50(9): 2951-2963.

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimabukuro S, Kobayashi T, Yokoyama E, Ando N, Kikuchi T, Momose F, Kageyama T, Matsuoka H, Ishioka T, Hirai S. Establishment of autoclave conditions for disaccharide-containing liquid media using spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. Journal of Microbiological Methods. 2026; 245: 107487.

2. 学会発表

- 1) 平井晋一郎. 腸管出血性大腸菌感染症のMLVA解析について. 分子疫学を活用した感染拡大防止対策立案研修(長崎県開催、オンライン発表). 令和8年2月25日.

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

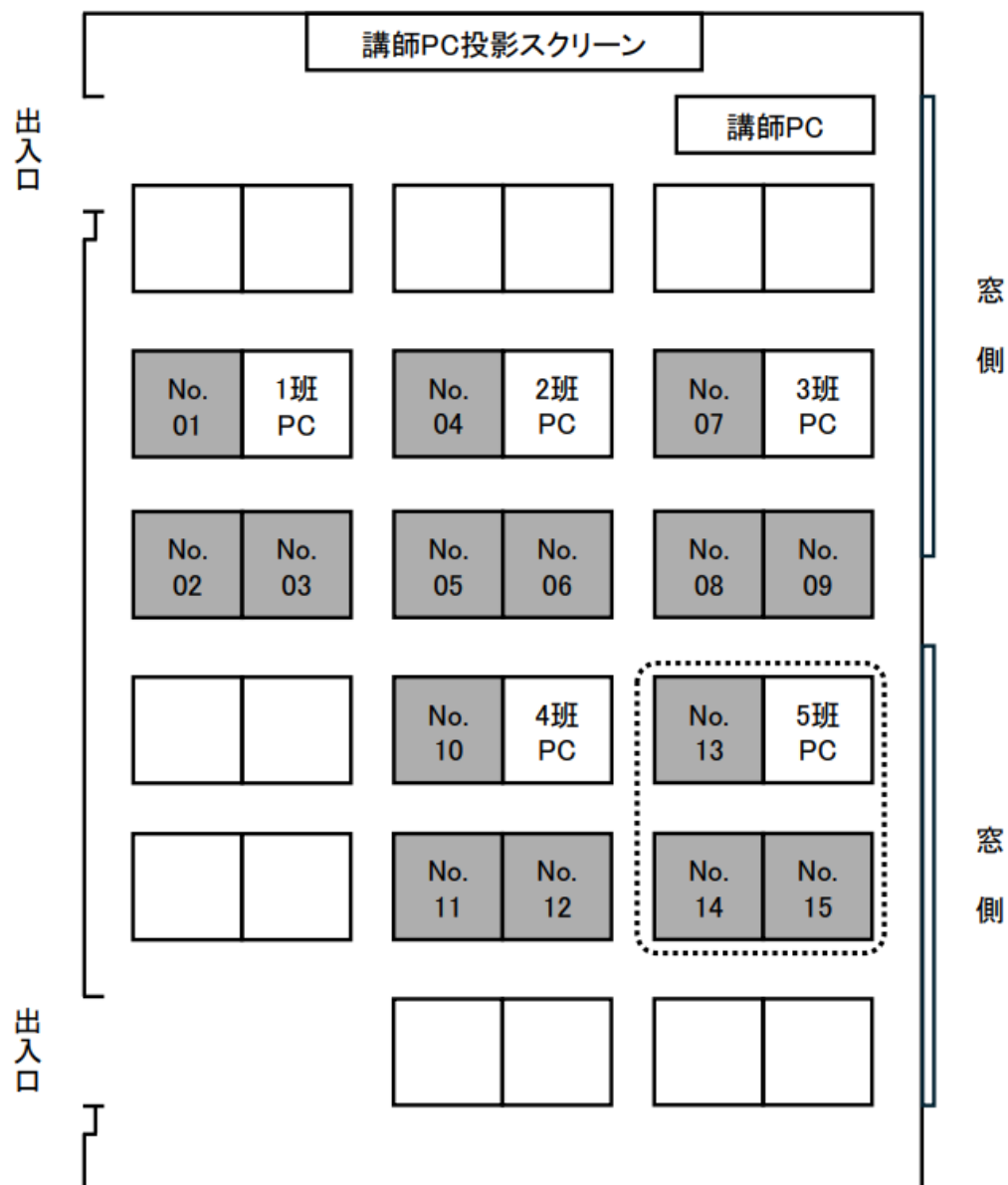


図 1 MLVA 法研修会の講義室における班及び研修生の位置

No.は研修生の番号を示し、No. 01-03 が 1 班、No. 04-06 が 2 班、No. 07-09 が 3 班、No. 10-12 が 4 班、No. 13-15 が 5 班の研修生。

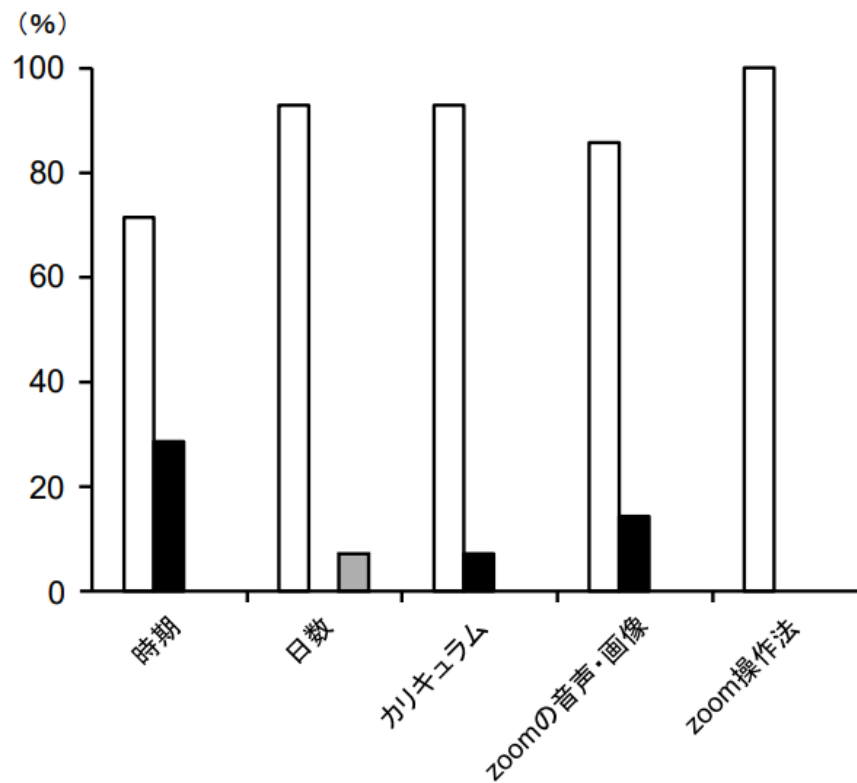
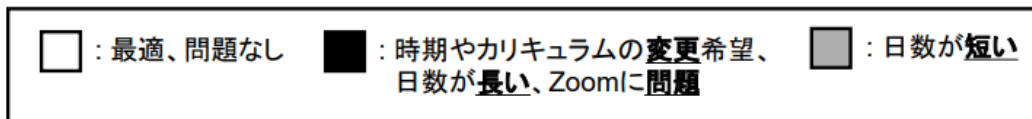
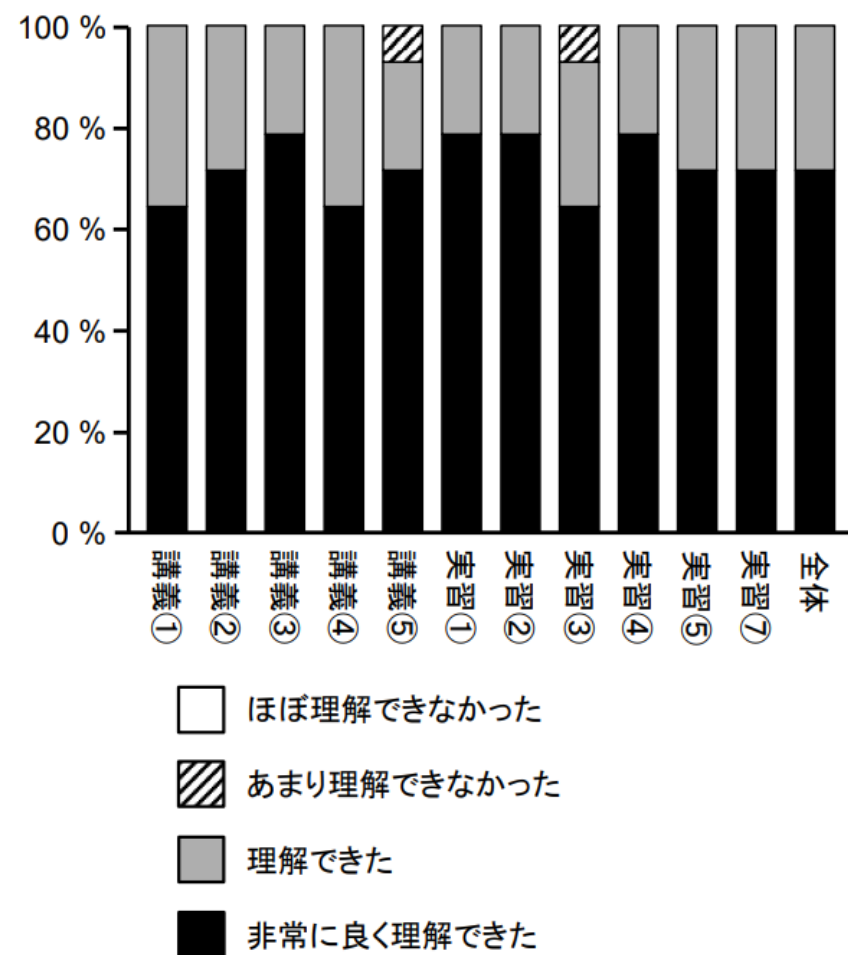


図2 反復配列多型解析 (MLVA) 法研修会全体における評価

(A)理解度



(B)業務への活用

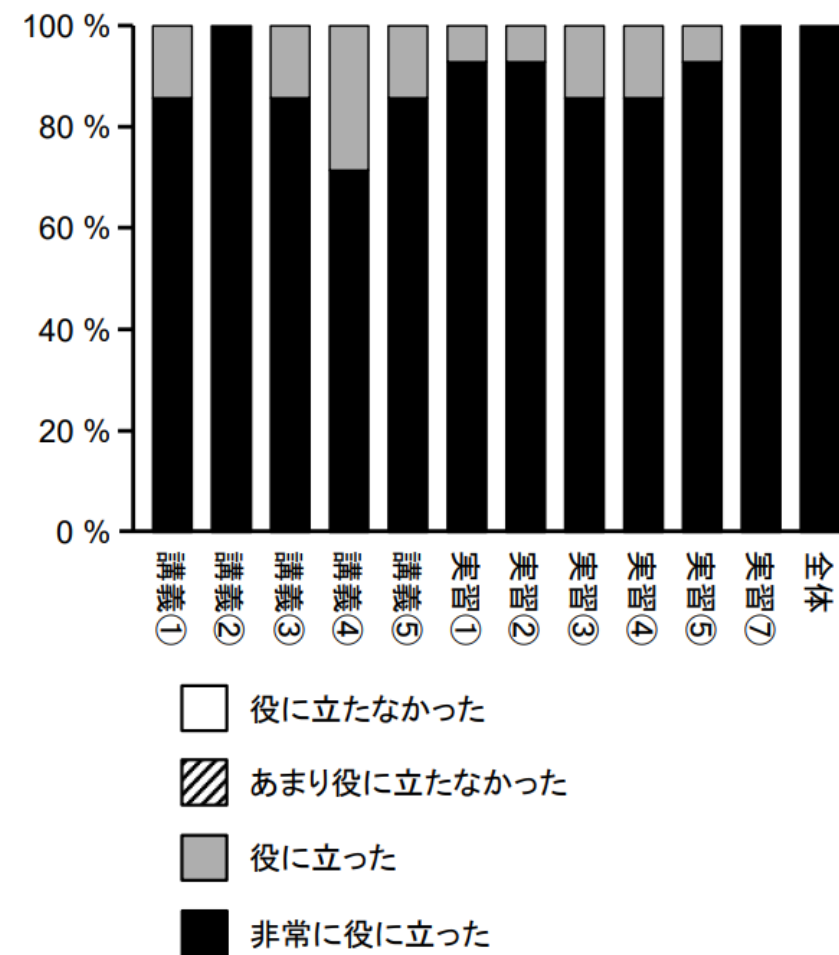
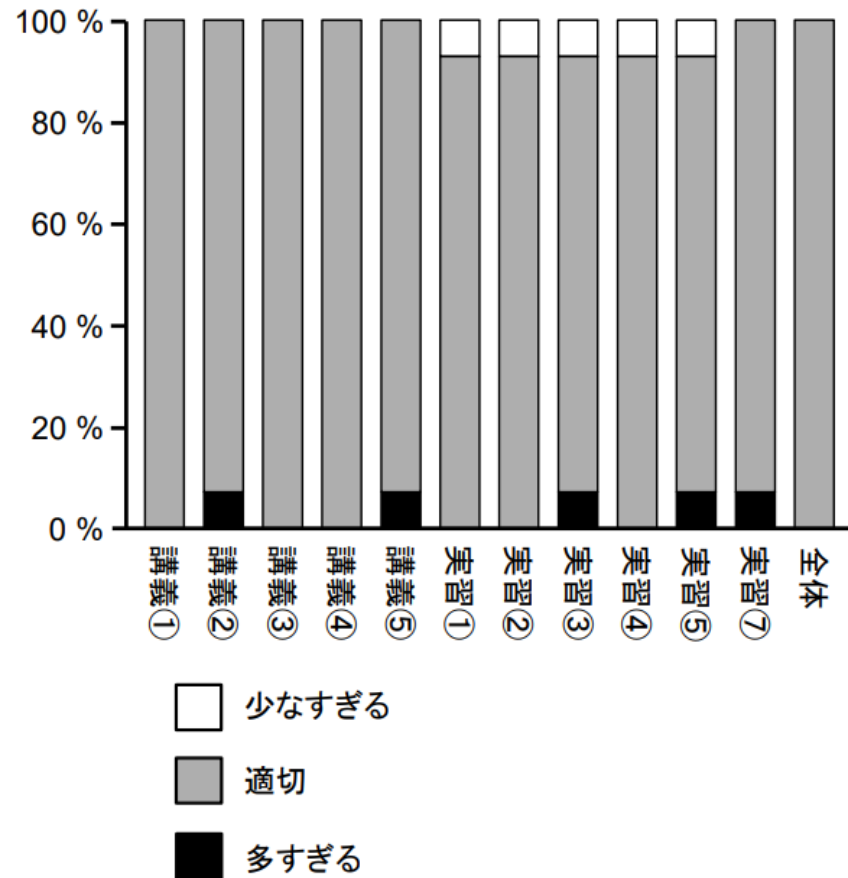


図3 MLVA 法研修会における各講義・実習の評価

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。

(C) 講義・実習の量



(D) 講義・実習の速度

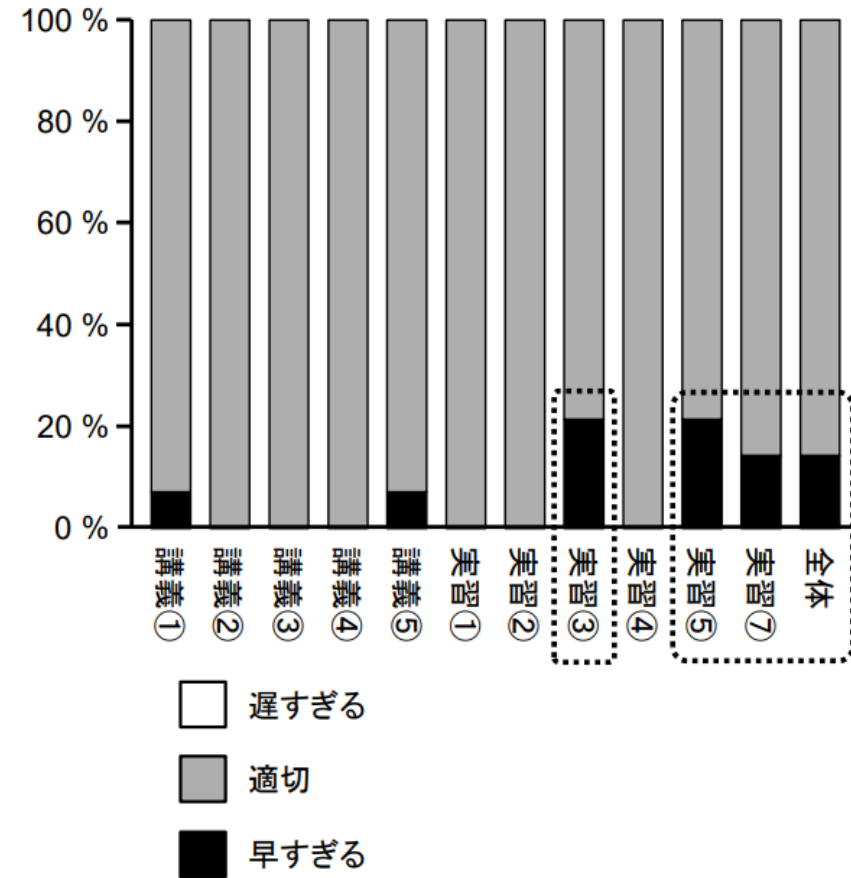
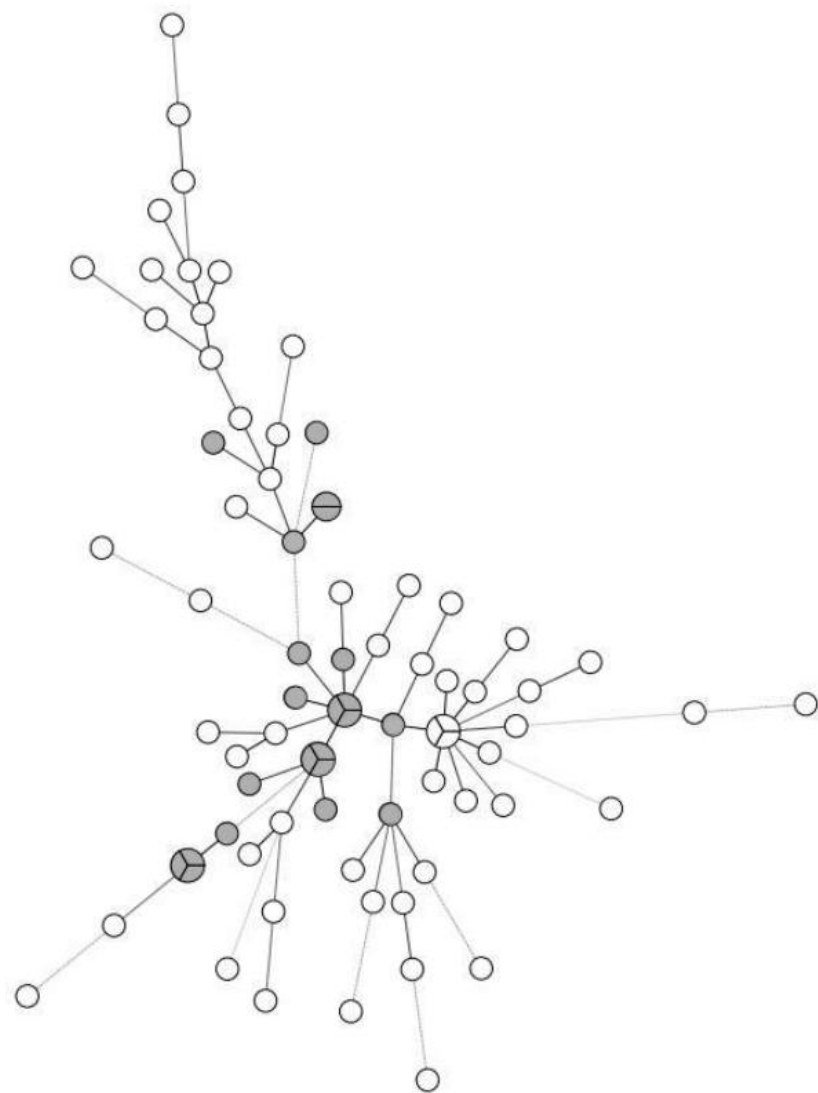


図 3(続き) MLVA 法研修会における各講義・実習の評価

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。

(A) MLVA43



(B) MLVA17

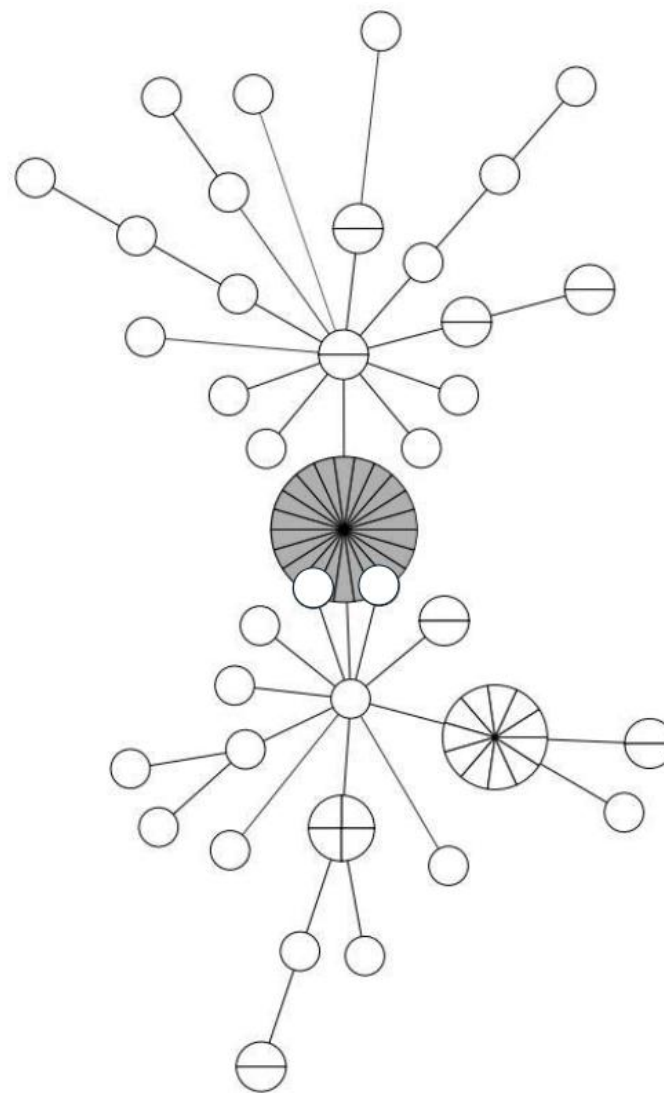


図 4 O165 の *in silico* MLVA の結果を基に作成した minimum spanning tree

灰色は MLVA17 で最も大きな node に含まれる菌株と、MLVA43 における各菌株の node を示した。

表 1 MLVA 法研修会で実施された改良版カリキュラム

1 日目: Zoom

時間	区分	題名	内容(昨年度からの変更点)
10:30-10:35(5 分)	その他	開会挨拶	-
10:35-11:00(30 分)	その他	オリエンテーション	-
11:00-12:00(1 時間)	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
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	MLVA 総論・各論
14:00-15:00(1 時間)	講義③	MLVA 法の異同判定	MLVA 法の結果の解釈 (Zoom に変更)
15:00-15:15(15 分)	その他	休憩	-
15:15-15:45(30 分)	講義④	MLVA 法で使用する代替・解析ツールの紹介	MLVA 法のツールの紹介 (Zoom に変更)
15:45-16:15(30 分)	講義⑤	MLVA 法におけるトラブルシューティング	MLVA 法でのトラブルと解説法 (Zoom に変更)

2 日目: 集合

時間	区分	題名	内容(昨年度からの変更点)
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	キレックス樹脂を利用して DNA 抽出
11:00-12:00(1 時間)	実習②	PCR 反応	異なる 2 つのメーカーの製品を使用してマルチプレックス PCR を実施
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改良版カリキュラム

2 日目: 集合

時間	区分	題名	内容(昨年度からの変更点)
13:00-15:00(2 時間)	実習③	GeneMapper による MLVA 法データの解析(1)	Panel と Bin のインポート/ サイジング(3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加)
15:00-15:20(20 分)	その他	休憩	-
15:20-16:00(40 分)	実習④	PCR 産物の電気泳動	キャピラリーゲルシーケンサーで PCR 産物を電気泳動
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(昨年度からの変更点)
10:00-12:00(2 時間)	実習⑤	GeneMapper による MLVA 法データの解析(2)	Bin の修正/ データの解析(3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加)
12:00-13:00(1 時間)	その他	休憩	-
13:00-14:00(1 時間)	実習⑥	GeneMapper による MLVA 法データの解析(3)	トラブル事例への対応(3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加)
14:00-15:00(1 時間)	実習⑦	事前に募集した質問や問題点へ回答	1 時間に増加

表 2 *in silico* MLVA 及び既報 MLVA における分離能の比較

血清型	解析法	MLVA 数(菌株型数)		D 値(95 %信頼区間) ^{a)}			
		本研究 ^{b)}	既報 ^{c)}	本研究 ^{b)}		既報 ^{c)}	
O145	MLVA17	36 (104)	16 (50)	<u>0.873</u>	<u>(0.864–0.873)</u> ^{d)}	0.802	(0.710–0.895)
	MLVA43	86 (104)	27 (50)	<u>0.991</u>	<u>(0.993–0.988)</u>	0.940	(0.905–0.974)
O165	MLVA17	38 (79)	24 (31)	0.903	(0.892–0.914)	<u>0.983</u>	<u>(0.981–1.002)</u>
	MLVA43	70 (79)	27 (31)	<u>0.996</u>	<u>(0.993–0.998)</u>	0.991	(0.961–0.995)

a) 多様性指数(Simpson's diversity index; D 値)。

b) 本研究で実施した *in silico* MLVA。

c) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481–490.

d) 本研究と既報において D 値が高い方を下線部で示した。

表 3 *in silico* MLVA 及び既報 MLVA における各領域の検出状況

(A) O145

領域	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	EH26 -7	EH111 -8	EH111 -11	EH111 -14	EH157 -12	O157 -3	O157 -9	O157 -17	O157 -19	O157 -25	O157 -34	O157 -36	O157 -37
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	0	99	92	88	100	0	0	100	1	100	84	<u>15</u> ^{c)}	<u>0</u> ^{c)}	0	1	100	99
既報の 欠損率(%) ^{b)}	2	96	98	88	100	0	0	98	0	100	78	6	0	0	2	100	92
本研究の D 値 ^{a)}	0.426	0.019	0.148	0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.294	0.541	0.038	0.000	0.019	0.000	0.019
既報の D 値 ^{b)}	0.544	0.079	0.040	0.224	0.000	0.040	0.000	0.040	0.040	0.000	0.389	0.259	0.040	0.000	0.040	0.000	0.154

領域	q1701	q1702	q1704	q1705	q1707	q1708	q1710	q1711	q1712	q1714	q1715	q1716	q1717	q1718	q1720	q1721	q1722
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	100	0	96	4	5	3	4	0	99	1	99	99	91	100	100	100	100
既報の 欠損率(%) ^{b)}	98	0	92	4	8	6	6	0	96	0	98	98	86	98	100	100	100
本研究の D 値 ^{a)}	0.000	0.038	0.075	0.295	0.164	0.264	0.667	0.000	0.019	0.019	0.019	0.019	0.160	0.019	0.000	0.000	0.000
既報の D 値 ^{b)}	0.040	0.000	0.150	0.190	0.187	0.224	0.633	0.000	0.078	0.000	0.040	0.040	0.246	1.246	0.000	0.000	0.000

領域	q1723	q1724	q1725	q1726	q1727	q1728	q1729	q1730	q1731
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	1	1	39	99	0	1	99	100	14
既報の 欠損率(%) ^{b)}	0	2	30	96	0	2	98	100	4
本研究の D 値 ^{a)}	0.019	0.019	0.741	0.019	0.148	0.038	0.019	0.000	0.249
既報の D 値 ^{b)}	0.000	0.079	0.766	0.079	0.154	0.079	0.040	0.000	0.078

a) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481-490.

b) 本研究で実施した *in silico* MLVA。

c) プライマー一致率 90%で PCR の増幅ありとした場合、欠損率 100%になった数値を下線で示した。

表 3(続き) *in silico* MLVA 及び既報 MLVA における各領域の検出状況

(B) O165

領域	EHG -1	EHG -2	EHG -5	EHG -6	EH26 -7	EH111 -8	EH111 -11	EH111 -14	EH157 -12	O157 -3	O157 -9	O157 -17	O157 -19	O157 -25	O157 -34	O157 -36	O157 -37
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	0	100	44	<u>72</u> ^{c)}	100	<u>100</u> ^{c)}	0	100	1	100	100	100	0	0	0	100	<u>61</u> ^{c)}
既報の 欠損率(%) ^{b)}	0	100	42	0	100	0	0	100	3	100	100	100	0	0	0	100	0
本研究の D 値 ^{a)}	0.426	0.019	0.148	0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.294	0.541	0.038	0.000	0.019	0.000	0.019
既報の D 値 ^{b)}	0.544	0.079	0.040	0.224	0.000	0.040	0.000	0.040	0.040	0.000	0.389	0.259	0.040	0.000	0.040	0.000	0.154

領域	q1701	q1702	q1704	q1705	q1707	q1708	q1710	q1711	q1712	q1714	q1715	q1716	q1717	q1718	q1720	q1721	q1722
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	100	0	92	<u>68</u> ^{c)}	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	<u>100</u> ^{d)}	100	100
既報の 欠損率(%) ^{b)}	100	0	97	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	97	100	100
本研究の D 値 ^{a)}	0.000	0.038	0.075	0.295	0.164	0.264	0.667	0.000	0.019	0.019	0.019	0.019	0.160	0.019	0.000	0.000	0.000
既報の D 値 ^{b)}	0.040	0.000	0.150	0.190	0.187	0.224	0.633	0.000	0.078	0.000	0.040	0.040	0.246	1.246	0.000	0.000	0.000

領域	q1723	q1724	q1725	q1726	q1727	q1728	q1729	q1730	q1731
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	0	0	3	100	0	0	100	100	100
既報の 欠損率(%) ^{b)}	0	0	0	100	0	0	100	100	100
本研究の D 値 ^{a)}	0.019	0.019	0.741	0.019	0.148	0.038	0.019	0.000	0.249
既報の D 値 ^{b)}	0.000	0.079	0.766	0.079	0.154	0.079	0.040	0.000	0.078

a) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481–490.

b) 本研究で実施した *in silico* MLVA。

c) プライマー一致率 70%で PCR の増幅ありとした場合でも、欠損率は変化しなかった数値を二重下線で示した。

d) プライマー一致率 85%で PCR の増幅ありした場合、欠損率が 27%となったが、増幅の基準を一致率 95%に変更した場合、欠損率が 100%となった数値を下波線で示した。

表 4 既報と欠損率が異なった領域におけるプライマー配列とアセンブルで一致した配列

血清型	領域	位置	種類 ^{a)}	配列 (5'-3') ^{b)}
O145	O157-17	フォワード	プライマー	<u>GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA</u>
			アセンブル	TTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA
		リバーズ	プライマー	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGTTGGCGATC
			アセンブル	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-19	フォワード	プライマー	GCAGTGATCATTATTAGCACCGC <u>TTT</u>
			アセンブル	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCGTT
		リバーズ	プライマー	<u>CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGT</u> TAAGC
			アセンブル	CAGGGGATAAGACCACCTGTTAAGC
O165	O157-37	フォワード	プライマー	AATCAGAGC <u>AG</u> CAGGAAAAAGAAGA
			アセンブル	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA
		リバーズ	プライマー	<u>GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG</u>
			アセンブル	類似領域なし
	q1720	フォワード	プライマー	GCGAACAGCTGTATCTTAATGAGTT
			アセンブル	GCGAACAGCTGTATCTTAATGAGTT
		リバーズ	プライマー	GAGGATTTAATTTTCC <u>CA</u> ACTGTTC
			アセンブル	GAGGATTTAATTTTCTAACTGTTC

a) プライマーは泉谷ら (Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481-490) の報告。アセンブルは本研究において作成。

b) アセンブル配列と一致しなかったプライマーの配列を下線で示した。

別添 4

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

人口当たり STEC 感染症届け出数が多い市町村のうち 2 地域を選定し、それぞれの地域のウシ糞便を収集した。令和 7 年度は A 地域の 1 農場および B 地域の 3 農場から計 114 検体を採取し、加えて令和 6 年度に引き続き B 地域の食肉センターより 50 検体を収集したところ増菌培養後ペロ毒素遺伝子（*stx*）陽性率は農場由来検体で 91.2%、食肉センター由来検体で 24%だった。*stx* 陽性 116 検体から計 105 株の STEC 株が分離された。分離株のうち、A 地域の農場のウシから分離された O157:H7 の MLVA を実施したところ、2024 年に発生した集団感染事例と 1 locus 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 STEC の原因分析につながる可能性がある。

A. 研究目的

STEC 感染症、食中毒事例の原因となる STEC 菌株の原因食材等の究明は、STEC 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、STEC 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

2024 年に引き続き、沖縄県における人口あたり STEC 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 2025 年 5 月から 10 月に B 地域の食肉センターにおいて、ウシの糞便各 50 検体を収集した。なお、2023 年、2024 年にも検体を収集しており、累計で 250 検体

となった。

加えて、2023 年に従業員が STEC 感染症(O26, *stx1*)に罹患した B 地域の農場において、ウシの糞便を 2024 年は 30 検体を収集したが、2025 年は引き続き約 3 カ月おきに計 79 検体を収集した。さらに A 地域においても 3 農場から計 35 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 によるペロ毒素遺伝子(*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。

STEC 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ボイル抽出により DNA を抽出し、上記リアルタイム PCR を実施し、陽性コロニーについて *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°Cで保存した。

ウシから分離した O157:H7 の 3 株、O111:H8 の 2 株については、患者との遺伝的関連を確認するため、MLVA を実施した。また、O116:H16 株について core genome Single Nucleotide Polymorphism (SNP)解析を実施した。

2024 年、2025 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するとともに、外部委託によりショートリードシーケンスを実施し、血清型、*stx* subtype, *eae* type を決定した。

（倫理面への配慮）

ウシからの菌株分離とその解析のため研究倫理申請は必要ない。調査地域および農場名については匿名化した。

C. 研究成果

A, B 地域の食肉センターでサンプリングしたウシの STEC 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、2025 年に収集した 50 検体中 12 検体で *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、6 株の STEC が分離された。2023-2025 年を合わせると、増菌液にお

ける *stx* 陽性は、A 地域 100 検体中 6 検体、B 地域 150 検体中 57 検体であり、A 地域からは 2 株、B 地域からは 28 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、2025 年は、6 株全て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）。2023-2024 年の結果と合わせると 30 株中 25 株が OgNT、つまりヒトから分離される STEC 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 8 株（26.7%）、*stx2* 陽性株が 24 株（80.0%）、うち両毒素遺伝子陽性株は 2 株であった。*eae* 陽性株は 11 株（36.7%）存在した。2023-2025 年の分離株（再解析中 3 株を除く）のゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 22 株は 18 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。

A, B 地域の特定農場におけるウシの STEC 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、A 地域 3 農場 35 検体中 32 検体(91.4%)、B 地域 1 農場 79 検体中 72 検体で *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、A 地域 3 農場 25 検体(71.4%)から 29 株の STEC が、B 地域 1 農場 54 検体（77.1%）から Og157, *stx2*, *eae* 陽性 3 株および Og111, *stx1*, *eae* 陽性 2 株を含む 70 株の STEC が分離された。2024 年の分離株と合わせてその内訳を表 3 に示した。現在解析中の 24 株を除く 46 株のゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 93 株は 18 種類の血清型に分けられた。O116:H16, *stx2a* 陽性 11 株、O171:H2, *stx2d* 陽性 8 株を含む内訳を 2024

年に分離された株と合わせて表 4 に示した。だった。

分離株のうち、O157:H7 の 4 株、O111:H8 の 1 株について MLVA を実施したところ、A-1 農場由来 O157:H7 株については、2024 年に同地域で発生した集団感染事例由来株の Single Locus Variant (SLV) だった。国立感染症研究所に問い合わせたところ、他の 4 株については国内分離株の中では類似 MLVA プロファイルは見いだせなかった。

また、ゲノム解析結果が得られている B-1 農場由来 O116:H16 の 11 株について core genome SNP 解析を実施したところ、core genome 数 4,270,896 中、菌株間の SNP は 0-17 だった。他の農場から O116:H16 は検出されなかった。

考察

2025 年は、食肉センターでサンプリングした 50 頭のウシ糞便検体から 6 株の STEC が分離され、2023 年から 2025 年までに累計 30 株の分離に成功した。また、特定農場においてサンプリングした 114 検体から 99 株の STEC が分離され、2024 年と合わせて累計 114 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。

STEC 患者が従事していた B 地域の農場におけるウシ糞便の *stx* 陽性率は 2025 年も引き続き 86.2% と非常に高く、A 地域の 3 農場においても 91.4% と非常に高かった。特に A 地域

で発生した集団感染事例由来株と A-1 農場由来株については MLVA により近縁であることが示唆された。この MLVA 型は沖縄県内ではこの地域に特異的ではある一方、県外において 2025 年散发事例株の SLV が報告されている。県内集団感染事例における牛肉の喫食やウシとの接触といった感染経路は不明であり、県外 SLV 株との関係もまた不明である。また、B-1 農場由来における 2024-2025 年の継続的な調査で、O116:H16 といった同一クローン株が農場内に長期間残存していることが明らかとなった。今後すべての株の全ゲノム解析を完了させ、農場内 STEC の採取時期、個体や牛群、使用環境による変動について解析していく予定である。

2006 年から 2024 年までの沖縄県のヒトの STEC 感染症例由来の株 309 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し、DDBJ へ登録した。今後これらヒト由来 STEC とウシ由来 STEC との比較解析、さらには沖縄県以外でのヒト症例由来 STEC との比較解析を同時に進めていく必要がある。

D. 結論

2023 年から 2025 年までに、ウシ糞便から STEC 株の分離を試み 144 株の分離に成功した。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 STEC の原因分析につながる可能性がある。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表 1 件

Closed genome sequences of 39 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains

isolated from healthy cattle in Okinawa, Japan. Kakita T, Iyoda S, Taira H, Kudeken T, Akeda Y, Ohnishi M, Nakamura K, Microbiol Resour Announc. 2025 13;14(11):e0081625.

2. 学会発表 4 件

ウシ農場で発生した腸管出血性大腸菌感染症一子牛の保菌調査とゲノム解析一、柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遙乃、久手堅剛、照屋盛美、喜屋武向子、大西真 第 5 4 回沖縄県獣医学会 (2025 年 7 月)

ナノポアリードのみを用いた全ゲノム配列比較による細菌検査方法の検討、中村佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏、第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2025 年 9 月)

完全長ゲノム配列の比較解析に基づく腸管出血性大腸菌感染症起因菌のゲノム変化の解明、中村 佳司、柿田 徹也、大西真、明田 幸宏、九州微生物研究フォーラム 2025 (2025 年 9 月)

ウシ農場で発生した腸管出血性大腸菌感染症一子牛の保菌調査とゲノム解析一、柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遙乃、久手堅剛、照屋盛美、喜屋武向子、大西真 令和 7 年度獣医学術九州地区学会 (2025 年 10 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

表 1 食肉センターにおけるウシ由来 STEC 分離株の性状

地域	O-genotyping	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2023	2024	2025	計
A	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0	0	1
A	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0	0	1
B	Og157		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2	2	0	4
B	OgNT		<i>stx2</i>		5	5	6	16
B	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0	0	1
B	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		1	1	0	2
B	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	2	1	0	3
B	OgNT	<i>stx1</i>			1	0	0	1
B	O111	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0	0	1

表 2 ゲノム解析による食肉センターのウシ由来 STEC 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	2025 年	計
A	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	0	0	1

A	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	1	0	0	1
B	O157:H7		<i>stx2c</i>	<i>gamma1</i>	2	2	0	4
B	O109:H16		<i>stx2a</i>	-	2	0	1	3
B	O174:H21		<i>stx2c</i>	-	1	0	0	1
B	O104:H7		<i>stx2a</i>	-	1	0	0	1
B	O111:H8	<i>stx1a</i>		<i>theta</i>	1	0	0	1
B	O177:H25		<i>stx2c</i>	<i>beta1</i>	1	0	0	1
B	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	1	0	2
B	O88:H25	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	1	0	0	1
B	O181:H49		<i>stx2a</i>	-	0	1	1	2
B	O181:H51		<i>stx2a</i>	-	1	0	0	1
B	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	0	0	0	0
B	OgGp3 (O118/O151):H16	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1	0	0	1
B	O8:H4	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>	-	0	1	0	1
B	O8:H8		<i>stx2a</i> , <i>stx2d</i>	-	0	1	0	1
B	O171:H2		<i>stx2d</i>	-	0	2	0	2
B	O2:H45		<i>stx2d</i>	-	0	0	1	1
B	OUT:H7	<i>stx1a</i>		-	1	0	0	1
B	OUT:H20		<i>stx2g</i>	-	0	1	0	1

表3 特定農場におけるウシの STEC 分離株の性状

地域	農場	O- genotyping	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2024	2025	計
A	A-1	OgNT		<i>stx2</i>		0	1	1
A	A-1	Og157		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	0	1	1
A	A-2	OgNT		<i>stx2</i>		0	3	3
A	A-2	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		0	1	1
A	A-3	OgNT		<i>stx2</i>		0	19	19
A	A-3	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		0	3	3
A	A-3	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	0	1	1
B	B-1	OgNT		<i>stx2</i>		11	38	49

B	B-1	OgNT		stx2	eae	0	1	1
B	B-1	OgNT	stx1		eae	4	3	7
B	B-1	Og26	stx1		eae	1	0	1
B	B-1	OgNT	stx1			0	6	6
B	B-1	OgNT	stx1	stx2		0	17	17
B	B-1	Og157		stx2	eae	0	3	3
B	B-1	Og111	stx1		eae	0	2	2

表4 ゲノム解析による特定農場のウシ由来 STEC 分離株の血清型、stx typing

地域	農場	血清型別	stx1	stx2	eae	2024 年	2025 年	計
B	B-1	O26:H11	stx1a		beta1	1	0	1
B	B-1	O104:H7		stx2a	-	1	1	2
B	B-1	O116:H16		stx2a	-	8	3	11
B	B-1	OgGp3(O118/O151):H16	stx1a		beta1	1	1	2
B	B-1	O171:H2		stx2d	-	1	7	8
B	B-1	O5:H9	stx1a		beta1	1	0	1
B	B-1	O84:H2	stx1a		zeta3	1	0	1
B	B-1	O168:H8		stx2a	-	1	0	1
B	B-1	O111:H8	stx1a		theta	0	2	2
B	B-1	O112:H21	stx1a		-	0	3	3
B	B-1	O113:H21		stx2d	-	0	2	2
B	B-1	O113:H4		stx2d	-	0	7	7
B	B-1	O153/O178:H19	stx1a	stx2a	-	0	1	1
B	B-1	O157:H7		stx2c	gamma1	0	1	1
B	B-1	O174:H21		stx2c, stx2d	-	0	2	2
B	B-1	O177:H25		stx2c	beta1	0	1	1
B	B-1	O2:H25		stx2a	-	0	1	1
B	B-1	O21:H25		stx2a	-	0	1	1
B	B-1	O8:H49	stx1a	stx2d	-	0	2	2
B	B-1	O8:H8		stx2a	-	0	3	3
B	B-1	O82:H8	stx1a	stx2c, stx2d	-	0	4	4
B	B-1	O87:H16		stx2b	-	0	1	1

B	B-1	O88:H25	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	0	2	2
B	B-1	OUT:H11		<i>stx2a</i>	-	0	1	1

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

- 1) Kakita T, Iyoda S, Taira H, Kudeken T, Akeda Y, Ohnishi M, Nakamura K. Closed genome sequences of 39 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Okinawa, Japan. *Microbiol Resour Announc*. 2025 13;14(11):e0081625.
- 2) Shimabukuro S, Kobayashi T, Yokoyama E, Ando N, Kikuchi T, Momose F, Kageyama T, Matsuoka H, Ishioka T, Hirai S. Establishment of autoclave conditions for disaccharide-containing liquid media using spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods*. 2026; 245: 107487.
- 3) 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2024 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 46 巻、103-104、2025 年 5 月
- 4) Kubomura A, Lee K, Iyoda S, Akeda Y. 2025. Complete genome sequence of three atypical diarrheagenic *Escherichia coli* O166:H15 strains from foodborne outbreaks. *Microbiol Resour Announc* 14:e0074625.
- 5) Ooka T, Arai S, Lee K, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J. 2025. Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene, *astA*, in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 16:1635769.
- 6) Imai Y, Okuno M, Hoshiko Y, Kaneko H, Sato T, Noguchi A, Lee K, Yamamoto T, Nakayama-Imahiji H, Kuwahara T, Iyoda S, Ogura Y. 2025. Genomics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from asymptomatic carriers in Japan highlights risk-adaptive control. *Commun Biol* 9.
- 7) Morita M, Lee K, Sugiyama A, Kojima N, Kawai Y, Izumiya H, Akeda Y. 2026. A case of laboratory-acquired *Salmonella* Typhi infection due to phage typing in Japan: whole-genome sequencing confirms the source of infection. *Access Microbiol* 8.

厚生労働大臣 殿

機関名 国立健康危機管理研究機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 國土 典宏

次の職員の令和7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) 国立感染症研究所細菌第一部 部長

(氏名・フリガナ) 明田 幸宏・アケダ ユキヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		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
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(元号) 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)	☐ ☒	☐		☐
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 国立健康危機管理研究機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 国土 典宏

次の職員の令和7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) 国立感染症研究所応用疫学研究センター・センター長
(氏名・フリガナ) 砂川 富正 (スナガワ トミマサ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☒ ☐	☒	国立感染症研究所	☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ ☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ ☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐ ☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

令和8年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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・第二室長
(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 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：)

厚生労働大臣 殿

機関名 国立健康危機管理研究機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 國土 典宏

次の職員の令和7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) 国立感染症研究所検査診断技術研究部・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7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 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: 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: 国立健康危機管理研究機構)
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。