

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)  
総括研究報告書

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究

研究代表者： 大西 真 (国立感染症研究所)

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) のサーベイランスにおいて、現在、主に反復配列多型解析 (multi locus variable tandem repeat analysis: MLVA) 法が使われている。MLVA データを基盤とするため継続的に全国のEHEC分離株を解析した。また、血清群O157、O26、O111については地方衛生研究所から直接MLVAデータが送付されMLVA型の付与が行われている。今年度も約600株について解析し型名を付与した。このうち約半数の株について感染研でもMLVA法による解析を行い、データの精度確認を行った。

新たにEHEC分離株が得られた際に、国内外の大腸菌ゲノムと迅速に比較解析を行うためのcore genome single nucleotide polymorphism (cgSNP) および core genome multilocus sequence typing (cgMLST) パイプラインを構築した。同パイプラインを利用し、感染研・細菌第一部でゲノムを解読した国内EHEC 2,248株のデータベース化を行った。以上の研究により、15万件以上の国内外の大腸菌ゲノムとの比較が迅速に行える体制を確立した。

本報告書では分担研究を総括した。

研究分担者

林 哲也 (九州大学大学院医学研究院細菌学分野 教授)

砂川 富正 (国立感染症研究所感染症疫学センター 室長)

工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・部長)

寺嶋 淳 (岩手大学農学部共同獣医学科・教授)

平井 晋一郎 (国立感染症研究所感染症・感染症危機管理研究センター・主任研究官)

## 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の事例調査のためにこれまで各種の分子型別法が開発され、利用されてきた。反復配列多型解析法（MLVA法）が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主にMLVA法を用いた解析が行われている。本研究ではこれまで蓄積されてきたMLVA型データを基盤に有効性を明確にし（R2年度）、R3年度には、MLVA型が一致した場合あるいは類似型であった場合の検査結果の評価の仕方を整理し、R3-R4年度にかけて、集団事例における評価を行うことで検証する。地方衛生研究所におけるMLVA解析の利用を一層進めるために、検査結果の正確性を担保するための精度管理手法の確立を行う。R2年度には、精度管理手法のためのマニュアルを整備し、R3年度に地方衛生研究所の協力で試行し、R4年度にはMLVA解析を実施している地方衛生研究所に対して精度管理を実施する計画とする。また食中毒事例由来株、家畜由来株の体系的な収集システムの構築を目指す。

## 研究方法

### MLVA法の有効性の検証・精度管理手法の確立

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

### 腸管出血性大腸菌等の検査法（全ゲノム解析）の開発

cgSNPは、解析時に供試する全株に共通する領域（コアゲノム）を抽出する必要があるため、計算機への負荷が高く、時間がかかるため、snippy (<http://github.com/tseemann/snippy>) およびBactSNP (<http://platanus.bio.titech.ac.jp/bactsnp>) を組み合わせた解析パイプラインを構築した。事前の検討では、snippyは再解析が容易であるものの一部のデータで多数のSNPを誤って検出することが示されている。一方、BactSNPは精度の高いSNP抽出が可能であるものの、SNPのデータベース化や数百株以上の解析が困難であった。そこで、BactSNPで得られたSNP情報をsnippyで利用できる形に変換するプログラムを作製することで、高精度なSNPのデータベース化と迅速な再解析が可能となるパイプラインを構築した。一方、cgMLSTは大腸菌の大部分の株が保有する2,513遺伝子を対象としたMLSTであり、Enterobase上で手法が公開されている。そこで、各遺伝子のリアルタイム情報をダウンロードし、BLAST解析をベースにした自製cgMLST解析パイプラインの構築を行った。

以上のパイプラインを利用し、これまでに細菌第一部でWGSを解読したEHEC計2,248株のcgSNPおよびcgMLSTデータベース化を行った。さらに、新たにEHECのゲノム情報が得られた際に、迅速に国内外の大腸菌ゲノムとの比較を容易にするパイプライン構築を行った。

### 諸外国における解析実態の調査

国内でWGS解析を利用した事例調査を効率的に実施するために求められる解析手法とデータベース

の必要要件等を明らかにするため、本年度は、諸外国におけるWGSの導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査を行い、我が国の現状を踏まえた活用法について検討した。具体的には、英国、他のヨーロッパ諸国、米国、カナダ等で用いられているWGS解析手法（データの取得方法、解析法と解釈の基準、データベースの整備状況、データフォーマット等も含む）を、論文情報等を基に調査した。データの取得方法や解析法に関しては、WGSの適用を早くから進めている英国Public Health Englandの状況を中心に調査したが、同一クローンの判定基準などのデータ解釈に関しては、解析法によって異なる場合もあり、国際的にもコンセンサスが得られていないため、各国の状況あるいは主要機関での状況を調査する必要があった。

### データベース構築の準備

これまでに蓄積されている国内分離株のWGSデータを収集・整理し、データベースの整備作業を開始した（プロトタイプデータベース構築）。これらのデータは、分担者が中心となって算出したものが多いが、それ以外のデータは公共のWGS情報データベース（主にNCBI/EMBL/DDBJのゲノム情報データベースとENTEROBASE）から収集した。また、分担者が取得している未発表データもデータベースに加えた。さらに、分担者や本研究班の代表者らが既に収集している分離菌株の解析（WGS情報の取得）を開始した。配列情報の取得には、基本的にはイルミナ社のシーケンサ（サンプル数に応じてMiSeq, HiSeq, NovaSeqのいずれかを使用し、ショートリード配列を取得）を利用したが、必要に応じて（新規性が高く参照配列になりうる株等）、ナノポアMInIONを用いたロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。

### MLVA法の有効性の検討および精度管理用菌株の選定

#### 1. 供試菌株の選定

全国の各地で感染者から分離されたEHEC菌株は、厚生労働省の通知に基づき地衛研を介して感染研に集積される。本研究のために、過去に感染研に搬入された全国のEHEC菌株の中から、千葉県で分離された菌株を抽出した。次に、抽出した菌株の中からEHEC O157については2016～2019年に、EHEC O26とO111については、2015～2019年に分離された菌株を抜き出した。抜き出された352菌株のEHEC O157、102菌株のEHEC O26、及び22菌株のEHEC O111の各血清型について、感染研で実施済みのMLVA法の結果を基に、MLVA-mateを使ってMinimum Spanning Treeを作成した<sup>5)</sup> (図1)。供試菌株を多様な特徴を持つ集まりとするために、MST上の位置で偏りが出ない様に菌株を選定した。その結果、10菌株のEHEC O157、5菌株のEHEC O26及び5菌株のEHEC O111が選ばれた。

#### 2. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査

詳細は分担報告書を参照。

#### 3. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査

詳細は分担報告書を参照。

### 牛のSTECの分離収集と性状解析

岩手県食肉衛生検査所において調べたと畜牛の直腸便285検体を収集した。Stx陽性株について、PCRによる毒素のサブタイピング、O抗原の決定及びパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて詳細な性状解析を行った。詳細は分担報告書を参照。

### 食中毒事例由来の原因食品から分離株の検証

過去の食中毒事例由来の原因食品から分離した保存株について、MLVA解析を行い患者株との一致率と多様性について検討した。加えて、輸入食品の検査の際に分離された菌株について、同様にMLVA型の多様性について検討した。詳細は分担報告書を参照。

### MLVAデータとNESIDデータの連携と活用法の検討

本分担グループでこれまでに開発した突合ツールにより、MLVAデータとNESIDデータの紐づけが行われていないデータに対して突合を行い、広域発生MLVAクラスタ (同一MLVA complexの症例群) について、クラスタサイズ別の発生頻度を調べた。ここでは、2保健所以上にまたがる場合を広域発生と定義した。クラスタサイズは、突合したNESIDデータを基に家族内感染が疑われる症例群をクラスタ化し、1家族内感染クラスタ、クラスタ化されない孤発例をそれぞれ1としてカウントした。

### NESIDデータに基づく広域事例疑いの早期探知

前年と同じアルゴリズム、アラート閾値を用いて、年間を通して広域食中毒が疑われる事例の発生を監視した。アラート探知時の対応も前年に用いた方法を踏襲した。

## A. 研究結果

### MLVA法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研細菌第一部において、2497株について分子型別解析を実施した。このうち2232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86施設であった。各血清群において同定された型数は、O157が565、O26が189、O111が55、O103が54、O121が25、O145が12、O165が4、O91が28であった。得られたデータは2021年5月号のIASRのEHEC特集号において公表される。MLVA型別を実施する地方自治体は、現在25施設であった。これらの施設は、感染研に各自治体で解析した菌株のMLVAデータを送付し、感染研において統一型名を付与した。その菌株数は597株であった。このうち300株については、菌株が感染研に送付され、感染研の結果と比較し精度確認が行われた。感染研の結果と一致したものは96%であり、それ以外の株もほとんどすべてが1遺伝子座違いであった (図1)。

また精度管理手法の確立のための分担研究によって、継代培養が各菌株のTR数の変化に与える影響を調査した。EHEC O157は10菌株中3菌株で、EHEC O26は5菌株中3菌株で、EHEC O111は5菌株中1菌株でTR数の変化が確認された。これらコロニーで変化した領域は1つのみであった。コロニー

変化の詳細は以下の通りである。菌株co170503については、10継代以降も継続して領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが取れた。菌株co190202については、採取した全てのコロニーで同一の変異が観察された。これらコロニーでは、領域O157-37における増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であり、数を判定できなかった。菌株co190173については、10継代で領域157-10のTR数が変化したコロニーが確認されたが、15継代以降、この領域が変化したコロニーは取れなかった。菌株co152166については、5継代でのみ、領域EHC-1が変化したコロニーが取れた。菌株co190892及びco150594は、本来、領域O157-3にTRを持たないが、TRと誤判定される非特異的な遺伝子増幅が見られた。

継代培養後のTR数の変化がどの領域で起きているかで整理した。18領域中5領域でTR数の変化が見られた。領域EHC-1及びO157-10では、3菌株においてTR数の変化が観察された。領域O157-37が変化した菌株はco190202のみだった。領域O157-3では、本来、TRを持たない菌株において非特異的な遺伝子増幅が確認された。

冷凍、冷蔵及び常温の各温度で、2 ng/μlの菌株co161058のDNAを1日、2日及び3日間保存した後、Mltiplex PCRを用いて、領域O157-34のTRの増幅したところ、C<sub>T</sub>値の範囲は20.51~22.13であり、検出限界は全て2 x 10<sup>-4</sup> ng/μlだった。C<sub>T</sub>値についてカイ二乗検定を行ったところ、各温度について保存日数間で有意な増減は無かった。また、異なる保存温度間でもC<sub>T</sub>値に有意な違いはなかった。

### 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発

BactSNPおよびsnippyを利用した解析パイプラインの構築により、SNPのデータベース化が可能となった。SNPの抽出には1株あたり20分~1時間程度を要する。既にSNP情報が存在する株を対象とした再解析では、100株の解析が19秒、500株の解析が75秒で可能であった。また、cgMLST解析では、98%がデータベース上に同一型が存在しない新規STとなった。cgSNPおよびcgMLSTデータベース化した2,248株の血清型は、表1のような割合であった。

### 諸外国におけるWGSの導入状況、活用状況、解析パイプラインやデータベース整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討

世界各国でのシーケンシングの主流は、イルミナのシーケンサ (MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq) を用いたショートリード配列の取得であるが、最近ではMGI社のシーケンサを利用したショートリード配列の取得も始まっている。ロングリードシーケンサの利用は研究面にとどまっている。解析パイプラインは研究機関によって様々であり、WGSの取得に関しては、i)参照配列に対するリード配列のマッピング、ii)リード配列のアセンブリのいずれかである。後者で使用されるアセンブラーはSPAdesとVelvetの使用が多いが、CLCのアセンブラーやPatanusなども使用されている。WGSを用いた菌株の実際の解析に関しては、i)コアゲノム配列に基づく系統解析、ii)コア遺伝子の配列に基づく系統解析、iii)コアゲノム配列に基づくwgMLST (Multi Locus Sequence Typing) のいずれかが使用されてい

る。また、集団事例に関連するクローンの判定基準としては、現時点では、コアゲノムまたはコア遺伝子のSNP距離（例えば、5 SNPs）を採用している報告が多いが、解析対象によって異なり、国際的なコンセンサスはない。

### 国内・国外分離株のWGSデータの収集と解析および基本的なWGSデータベースの構築：

主要EHEC血清群に関して、本分担者がこれまでに取得したデータ、新規に取得したデータ、公共データベースから取得したデータ（基本的に海外株のデータ）の収集を進めた。現時点での収集数は、O157は4,515株（国内は2,525株）、O26は540株（国内は314株）、O145は246株（国内は88株）、O103は979株（国内は103株）、O121は638株（国内は211株）、O165は96株（国内は71株）となっている。最も重要なO157に関しては、別プロジェクトで取得した2005年、2010年、2015年の国内分離株の大部分を網羅する2,219株と牛由来の260株が含まれる。また、O157の中で特に病原性が高いと推察されているClade 8株に関して、特に重点的な収集・整備と解析を行い、511株（国内は150株）の情報を整備するとともに、Clade 8内の亜系統を代表する18株を選び、ロングリードシーケンシングを行った。現在、ショートリード配列とのハイブリッドアッセムブリの作業中である。

### 牛のSTECの分離収集と性状解析

牛の直腸便285検体から作製したDNA抽出物を使用し、*stx1*及び*stx2*遺伝子 に対するスクリーニングを実施したところ46 検体（16.1%）が*stx*陽性となった。その内11検体が*stx1*のみ陽性、25検体が*stx2*のみ陽性*stx1*及び*2*陽性が10検体となった。*stx*遺伝子が陽性となった46検体のうち、さらに コロニーPCRで陽性となり菌が分離できた検体は12検体（4.2%）14 株であった。

分離株に関して血清型別を実施し、O157、O136、O103が各一株存在することが示された。O抗原が特定出来なかった9検体11株に対してはO抗原遺伝子の有無を標的としたPCRを行い、その結果をOg抗原として特定した（Og typing PCR）。Og39、Og8、Og171、Og2またはOg50、Og130がそれぞれ1検体ずつとなりOg113は2検体4株（同一農場検体）、Og22が2検体（異なる農場検体）となった。

### 食中毒事例由来菌株のMLVA解析

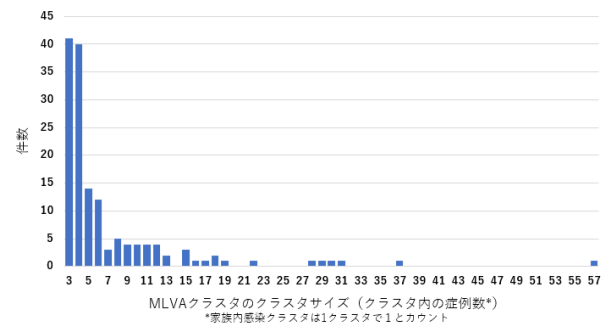
腸管出血性大腸菌食中毒事例A由来のO157菌株26株のうち、22株はMLVA特定17遺伝子座のリピート数が患者分離株と全て同一であり、MLVA型は18m0541であった。患者分離株と1遺伝子座（O157-9）のリピート数のみが異なる株が3株（ESC678、687、688）確認された。このうち1株は1遺伝子座において2本のピークが認められた。リピート数が1遺伝子座において異なるsingle locus variant（SLV）など関連性が推測される型をcomplexとしてまとめると、これらの3株は患者分離株18m0541のcomplexと考えられる。一方で、1株（ESC693）は17遺伝子座中11遺伝子座のリピート数が患者分離株と異なることが確認された。食中毒事例A由来株の生化学性状を解析したところ、同一MLVA型complexの25株は運動性を示さなかったのに対し、ESC6

93は運動性を示すことが明らかになった。また同様に同一MLVA型complexの25株は*eae*遺伝子陽性であるのに対し、ESC693では*eae*遺伝子陰性であった。一方で食品B由来のStx陽性大腸菌O128菌株36株はすべての遺伝子座で同一のリピート数を示した。食品C由来のStx陽性大腸菌O8菌株5株も同様に、すべての遺伝子座で同一のリピート数を示した。

### MLVAデータとNESIDデータの連携と活用法の検討

MLVAクラスタのクラスタサイズ別の発生頻度を見ると、クラスタサイズが小さいほど発生頻度が高く、クラスタサイズが大きくなるにつれて発生頻度は減少した（図1）。クラスタサイズが7以上で発生頻度は大きく低下し、7以上のMLVAクラスタの発生回数は41回（全体に占める割合は15%）であった。また、クラスタサイズが10以上の発生回数（割合）は、29回（10%）であった。

図 2. 2019 年のデータにおける MLVA クラスタのクラスタサイズ別発生頻度（暫定結果）



### NESIDデータに基づく広域事例疑いの早期探知

2020年は、レベル1以上のアラートは11回発生し、O血清群の内訳は、O157が4件、O26が3件、O103が2件、O121が1件、O血清型不明が1件であった（表1）。最終的にレベル3まで到達した事例は1回（O157VT2・診断週44週）、レベル4に至った事例は1回（O157VT1VT2・診断週38週）であった。前者は、探知時点では急激な増加傾向は認められず、HUS発症例（重症例）の報告もなかったことから、厚生労働省（食品監視安全課及び結核感染症課）への即時の情報提供は行わず、内部での注視を継続することとした。その後、報告数が減少に転じたことから、最終的に情報提供の必要性は低いと判断した。後者においては、探知当初はレベル3であったが、患者の発生が関東に偏っていたこと、年齢性別分布に通常と異なる偏り（30代の女性に多い）が見られたこと等を考慮し、早めの情報提供を行うこととした。

表 2.2020 年に探知したアラート



探知日時	血清群-毒素型	診断週	レベル
2020/1/25	O26-VT1	04-06週	1
2020/6/21	OUT-VT1	25週	1
2020/6/29	O103-VT1	26週	1
2020/7/17	O103-VT1	29-30週	1
2020/8/28	O121-VT2	34-35週	1
2020/9/17	O157-VT1VT2	36週	2+
2020/9/18	O157-VT1VT2	38-40週	4*
2020/9/23	O26-VT1	38週	2
2020/10/2	O157-VT1VT2	40週	2+
2020/11/2	O157-VT2	44-45週	3
2020/11/4	O26-VT1	44週	1

赤字はレベル3以上の事例。\*は実際に厚生労働省への情報提供を行った事例。

## B. 結論・考察

MLVA法により解析した菌株数は昨年比で2割程度減少したが、大きな傾向の変化は観察されなかった。解析結果は定期的に厚生労働省NESFDにMLVAリストとして掲載された。地方衛生研究所から送付されたMLVAデータは約600株に上った。このうち約半数の株が、後日感染研に送付され、感染研で実施したMLVAデータと比較した。結果としては96%が一致し、一致しなかった株についても1若しくは2遺伝子座の違いのみであった。これらの地衛研については技術的な問題はほぼないと考えられた。MLVAデータ送付にあたっては、地衛研におけるデータの信頼性が重要であり、今後も引き続きモニタリングしていく必要がある。

MLVA法の精度管理手法の確立が重要である。そのためには、MLVA法による結果の安定性を検証していくことが必要である。EHEC菌株の継代培養で変異の影響を受けず、分子疫学的解析法としての有効であった。供試した19菌株のEHECについて、20日連続の継代培養を行ったところ、7菌株についてTR数が変化したり、非特異的な遺伝子増幅が見られたコロニーが確認された。特に、2菌株では同じTR数の変化を持つコロニーが継続的に確認された。例えば、菌株co170503では領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが、10継代以降、継続して確認された。この現象はTR数が変化したクロンが何回も発生したのではなく、変化したクロンが分離平板上で増加し一定の割合以上を占めたためだろう。また、菌株co190202では採取した全てのコロニーにおいて、領域O157-37での増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であった。以前に感染研でMLVA法を実施した際は、co190202の領域O157-37のTR数は7だった。本研究でco190202を使用するまでの保存中に領域O157-37で塩基の欠損が起きたのだろう。他にも、5菌株のコロニーでTR数が変化していたが、全てのコロニーにおいて変化した領域は1つであった。泉谷らは、MLVA法では2領域違いまでの菌株を同一クロン由来と判定できると報告している。従って、継代培養によるTR数の変異は、MLVA法による類似性の判定に大きな影響を与えないと思われる。

継代培養によるTR数の変化頻度の調査の結果から、精度管理試験に適したEHEC菌株を選定できた。精度管理試験において、TR数が変異し易い菌株やTRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が起こる菌株を配布すると、受験機関の回答が誤ってい

た場合、その原因の特定が困難となる。本研究で用いた19菌株のEHECの内、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認されなかった12菌株を精度管理試験で用いると良いと思われる。一方で、本研究では、泉谷らの報告に従い18領域を解析した<sup>2)</sup>。しかし、感染研及び地衛研では、同一の食中毒事例由来のEHEC菌株間で領域O157-10のTR数は頻りに異なっていることから、この領域を解析対象から除いている。本研究でも、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認された5領域の内、変異した菌株数が最も多かった領域はO157-10であり、この領域の変異頻度は高いことを示している。以上より、精度管理試験を行う場合、領域O157-10を除いた17領域で行うべきである。

精度管理試験で配布するDNAの抽出法として、InstaGene Matrixを用いた方法は適していた。菌株のDNAを精度管理試験の検体とする場合、日本郵便株式会社や民間の配送事業を利用し、常温、冷蔵又は冷凍の温度で全国の地衛研に送ることになる。これら事業を利用すると、感染研から最も輸送日数がかかる沖縄県には2日間を要する。InstaGene Matrixを用いたDNA抽出法では、菌体に樹脂入りの液体を混ぜた後、加熱して遠心分離後、上清を抽出液とする。この方法では樹脂でPCR反応を阻害する金属イオン等を取り除いているが、DNAの精製効果は低い。そのため、InstaGene Matrixにより抽出したDNAでは不純物の存在により輸送中に品質が低下し、MLVA法の結果に影響を与えることが考えられる。本研究では、InstaGene Matrixで抽出した菌株のDNAを冷凍、冷蔵及び常温で保管し、1日目、2日目及び3日目に領域O157-34における遺伝子増幅の効率を調査した。その結果、各温度について保存日数の経過でC<sub>T</sub>値及び検出限界のDNA濃度に有意な低下は見られず、更に、異なる温度間でも有意な低下も確認されなかった。以上より、InstaGene Matrixで抽出したDNAは輸送中にMLVA法の結果に影響を与える様な品質低下を起こさないとと思われる。

ゲノム解析によって得られる情報を有効に利用することが今後重要と考えられる。本研究においてcgSNPおよびcgMLST解析手法の確立を行い、国内EHEC計2,248株のWGSデータのデータベース化を行った。本手法によって、新たなる集団感染株等が得られた際に迅速に近縁株を抽出することが可能となった。特に、O157以外の血清型ではMLVAが利用可能でないO群や、利用可能なO群であっても十分な型別能を有さない事例が存在する。そのような事例では、WGS解析が特に有効であると考えられる。また、本手法では参照株をEHEC O157 Sakai株に統一したが、O157以外のO群を対象とした解析ではSNP数が過小評価される可能性がある。先行研究から、より近縁な参照株を用いた際に増加するSNPは数カ所程度と考えられるが、今後評価が必要である。

## 諸外国におけるWGSの導入状況等を踏まえた活用方法についての検討

WGS解析の主流は、イルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であるが、解析パイプラインは各国あるいは研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクロンの判定基準についても国際的なコンセンサスはない。地方衛生研究所などでは、コア遺伝子セットの配列に基づくwg

MLSTが比較的取り入れやすい手法かもしれないが、一般のMLSTのようなSTの整備が行われていないため、国際的なシステムが構築される必要がある。そのため、影響力の大きい米国CDCの方針などに注意して継続的に調査する必要があると思われる。

(2) 国内・国外分離株のWGSデータの収集と解析および基本的なWGSデータベースの構築：

上記のように、主要EHEC血清群のうち、O157、O26、O145、O103、O121、O165のWGSデータの収集・整理を行ったが、公共データベースへの登録が急速に進んでおり、継続的な収集とデータベースのアップデートが必要と思われる。また、公共データベース間でのデータ重複の問題等があるため、収集したデータに関しても、追加の整理作業が必要である。さらに、データベースのスリム化を図るために近縁クローンなどの重複を一定の基準で除外することも検討する必要がある。これらの作業と同時に、参照配列となりうる代表株に関しては、ロングリードシーケンサを用いて完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備することも重要であると思われる。この作業においては、EHECのゲノムには複雑な繰り返し配列が存在するため、ショートリード配列とのハイブリッドアッセムブリのプログラム等について検討する必要がある。

2019年のMLVA・NESID突合データにおいて、クラスタサイズが10以上のMLVAクラスタの発生頻度は全体の10%程度であり、比較的稀であることがわかった。MLVAクラスタのクラスタサイズが10を超えた場合にアラートを発するといった活用方法が考えられるが、今回の結果は暫定的なものであり、さらに詳細な検討が必要である。広域事例疑いをより早期に探知することができれば、事例発生時の初動調査および介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上の貢献が期待出来る。NESIDの届出データを用いた広域事例疑いの早期探知の取り組みにより、2020年においては、広域食中毒疑いとして厚生労働省への情報提供を1回実施し、複数の自治体に対する喫食状況調査等の対策の実施に結びつけることができた。2020年に用いたアラート閾値は2019年に用いたもの<sup>2)</sup>と同じであり、これは2018年実績に基づく暫定的なものである。感度、特異度、発生頻度等のバランスを考慮しつつ、より迅速に探知するための探知アルゴリズムの改良、アラート閾値の最適化を検討することが重要である。また、早期探知により早められた調査開始を汚染源の同定につなげるための全体のスキームについて、関係機関との調整や調査手法の改良を含めた検討を行うことも今後の課題である。NESIDデータ・MLVAデータの統合データの活用法についても、引き続き重要な検討課題である。

ゲノム解析を含めた分子型別手法とサーベイランスを連携して、実務として対策・対応に結びつけていくことが重要であるが、同時に家畜・食中毒事例による食品からの分離菌株の体系的な収集とそのデータベース化も重要である。その活動は緒についたばかりであ流が、継続的に実施していく必要がある。

F. 健康危険情報  
該当なし

C. 研究発表

論文発表

1. Kimata K, Lee K, Watahiki M, Isobe J, Ohnishi M, Iyoda S. Global distribution of epidemic-related Shiga toxin 2 encoding phages among enteroaggregative *Escherichia coli*. Sci Rep. 2020 Jul 16;10(1):11738. doi: 10.1038/s41598-020-68462-9.
2. Kato H, Yahata Y, Hori Y, Fujita K, Ooura N, Kido T, Yoshimoto K, Matsui T, Izumiya H, Ohnishi M, Oishi K. A shigellosis outbreak associated with a sports festival at a kindergarten in Kitakyusyu City, Japan. J Infect Chemother. 2020 26; 1146-1151.
3. Izumiya H, Lee K, Ishijima N, Iyoda S, Ohnishi M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: focus on serogroups O103, O121, O145, O165, and O91. Jpn J Infect Dis. 2020 Nov 24;73(6):481-490. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.095.

学会発表

1. 李 謙一, 綿引正則, 磯部順子, 大西 真, 伊豫田淳, 大規模集団感染由来 O104:H4 と同一の Stx2a ファージを有する志賀毒素産生性腸管凝集性大腸菌 (Stx-EAEC) O86 の解析, 第 163 回日本獣医学会学術集会、2020 年 9 月 14-30 日、Web 開催
2. 品川正臣, 和賀萌美, 山崎朗子, 寺嶋淳 岩手県の食肉処理場に搬入された牛の直腸便における腸管出血性大腸菌の保持状況 日本食品衛生学会第 116 回学術講演会(WEB 開催)令和 2 年 11 月 24 日 (火) ~ 令和 2 年 12 月 8 日 (火)
3. 李 謙一, 井口 純, 宇田和宏, 松村 壮史, 宮入烈, 石倉健司, 大西 真, 伊豫田淳, EHEC Working Group in Japan. 小児重症例から分離された腸管出血性大腸菌新規血清群 OX18 および関連株のゲノ

ム解析 第 94 回日本細菌学会総会、2021 年 3 月 23-25 日、岡山（オンライン）

4. 林哲也：腸管出血性大腸菌のゲノム解析：次世代シーケンサを用いた感染症と病原体の解析の例として（教育講演）。

第 90 回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第 63 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 68 回日本化学療法学会西日本支部総会（合同学術集会）、2020 年 11 月 5～7 日、福岡。

5. 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也：プロファージ内プロファージによる大腸菌への 3 型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム。

第 15 回日本ゲノム微生物学会年会, 2021 年 3 月 4～6 日, 福岡。

6. 宮田達弥, 小椋義俊, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊豫田淳, 伊藤武彦, 大西真, 林哲也：EHEC O157 clade 8 のゲノム多様性と Stx2 と Stx2 ファージのバリエーション。

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23～25日, 岡山。

7. 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也：プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム。

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23～25日, 岡山。

8. 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也：腸管出血性大腸菌 O26:H11 における Stx ファージの遺伝的多様性とダイナミクス。

第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23～25日, 岡山。

D. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1. データベース化を行った菌株の血清型別菌株数

血清型	菌株数
O111:H8	1,020
O26:H11	274
O103:H2	176
O121:H19	153
O146:H21	62
O103:H25	41
O145:H28	41
O91:H14	39
O165:H25	37
O5:H9	36
O115:H10	29
O111:HUT	27
O103:H11	23
OX18:H19	20
O123:H2	16
O177:H25	14
OUT:H8	13
O69:H11	11
O76:H19	10
その他*	206
計	2,248

\*O103:H8 等 82 種の血清型

図1. 送付 MLVA データと菌株データの結果の比較

