

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業  
令和6年度総括研究報告書

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

研究代表者	明田幸宏 国立感染症研究所細菌第一部 部長
研究分担者	中村佳司 (九州大学大学院医学研究院) 砂川富正 (国立感染症研究所実地疫学研究センター) 廣瀬昌平 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部) 平井晋一郎 (国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター) 大西 真 (沖縄県衛生環境研究所 感染症研究センター)
研究協力者	李 謙一 (国立感染症研究所 細菌第一部) 泉谷 秀昌 (国立感染症研究所 細菌第一部) 土橋 西紀 (国立感染症研究所 実地疫学研究センター) 加藤 博史 (国立感染症研究所 実地疫学研究センター) 八幡裕一郎 (国立感染症研究所 実地疫学研究センター) 高橋 佑紀 (国立感染症研究所 実地疫学研究センターFETP) 後藤 滉平 (国立感染症研究所 実地疫学研究センターFETP) 高橋 琢理 (国立感染症研究所 感染症疫学センター) 高原 理 (国立感染症研究所 感染症疫学センター) 佐藤 梢 (国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター) 小野 論子 (長野県環境保全研究所 感染症部) 松山 満貴 (長野県環境保全研究所 感染症部) 久手堅 剛 (沖縄県衛生環境研究所) 平良 遥乃 (沖縄県衛生環境研究所) 柿田 徹也 (沖縄県衛生環境研究所)

**研究要旨：**

食中毒は国民に対して甚大で直接的な影響を及ぼす。そのため食中毒の発生予防や発生した際には迅速な原因究明を実施し、その健康被害の拡大抑止が必要不可欠である。特に腸

管出血性大腸菌 (EHEC) による食中毒は、その届出数や重症度も相まって日本の食中毒対策として最も警戒が必要となっている。これまで EHEC 感染症の事例調査のため各種の分子型別法が開発・利用されてきた。MLVA 法が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている。本研究では地衛研における MLVA 法運用のさらなる効率化迅速化を目指した技術導入および精度向上、MLVA 型別データと発生動向を利用した EHEC 食中毒アラート発出システムの構築、その評価を進めた。また食品や動物由来株を含めたゲノムデータベースの拡充化を進め、さらにゲノムデータを利用した原因究明に利用可能なゲノム解析パイプラインを構築し、複数の地方衛生研究所等での試用、フィードバックを得た。その試用を通じた評価および改良から次年度には全国地方衛生研究所への配布を進める予定である。さらに EHEC 感染症の起因菌と食材等感染源の関連性解析および本研究で構築された食中毒アラートシステム及び検査解析スキーム評価のため、他の地域からの食品流通などの影響を受けにくい離島 (沖縄県) でのコホートを確立し、それらの解析・評価を進めた。またカンピロバクター感染症が原因と推定されるギランバレー症候群 (GBS) の発生と食中毒事例の関連性についても事例集積の観点から解析を進めた。

#### A. 研究目的

食中毒は国民に対して甚大で直接的な影響を及ぼす。そのため食中毒の発生予防や発生した際には迅速な原因究明を実施し、その健康被害の拡大抑止が必要不可欠である。特に腸管出血性大腸菌 (EHEC) による食中毒は、その届出数や重症度も相まって日本の食中毒対策として最も警戒が必要となっている。これまで EHEC 感染症の事例調査のため各種の分子型別法が開発・利用されてきた。MLVA 法が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている。前身の研究班では、本法の活用に重点を置き、地衛研における実施の精度向上のため、その精度管理を進めてきた。また MLVA 法を利用して全国で分離された EHEC 菌株の分子疫学的解析を実施することで個々の事例の関連性について検討を重ね、さらにその情報を利用した注意すべき事例の探知及びアラート発出を試

みてきた。また EHEC 血清型によって MLVA 法の解像度が異なることから、海外株や食品・動物由来株を含む様々な EHEC 菌株の全ゲノム配列の取得を行い、MLVA 型別との関連性を評価するとともに、大規模なゲノム情報のデータベース化を進めている。その結果、EHEC 食中毒の早期探知のための技術基盤が構築されつつあり、それらを利用した実際の運用に着手する段階に来ている。以上より、本研究計画では地衛研における MLVA 法運用のさらなる効率化迅速化を目指した技術導入および精度向上、MLVA 型別データと発生動向を利用した EHEC 食中毒アラート発出システムの構築、その評価を実施する。また世界的には食中毒を含む感染症の分子疫学解析が全ゲノム情報を用いたものとなっており、食品や動物由来株を含めたゲノムデータベースの拡充化を進めることで MLVA 法との優劣性を明らかにし、将来的な運用に資する基盤を構築する。またゲノムデータを利用した原因究明に利用可

能なゲノム解析パイプラインを構築しその試用を通じて評価および改良を進める。さらに EHEC 感染症の起因菌と食材等感染源の関連性解析および本研究で構築された食中毒アラートシステム及び検査解析スキーム評価のため、他の地域からの食品流通などの影響を受けにくい離島でのコホートを確立し、それらの解析・評価を進める。また本年度は、高知県で確認された GBS 集積とカンピロバクター食中毒事例について、その関連性を明らかにする目的で解析を実施した。

## B. 研究方法

(ゲノム解析パイプライン構築、評価)

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

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

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

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

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

(ゲノム情報収集、データベース拡充化)

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

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

よび mlst program v2.23.0 (<https://github.com/tseemann/mlst>; Achtman のスキームを使用)によって各菌株の血清型および Sequence type (ST)を決定するとともに、BLASTN に基づいた方法 (Nakamura K, et al. PLoS Pathog, 2021) によって、志賀毒素 (*stx*) 遺伝子およびインチミン (*eae*) 遺伝子の保有の有無を解析した。

#### (MLVA 法の精度管理)

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

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

#### (食品関連サンプル由来 EHEC 株の収集、解析)

食品をターゲットとした EHEC 菌株の分離は、その分離率が低いとため、対象を食品食

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

本年度は国内食肉処理施設より提供されたウシ糞便から分離された EHEC 菌株について性状解析、遺伝学的解析を進めた。

#### (離島コホート研究)

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

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

年4月から9月にA地域及びB地域において、ウシの糞便各50検体合計100検体を収集した。なお、2023年にも同数の検体を収集しており、累計で200検体となった。

加えて、2023年に主に子ウシ舎での業務にあっていた従業員がEHEC感染症(O26, *stxI*)に罹患した農場において、子ウシからの糞便30検体を収集した。その後、検体の増菌培養、リアルタイムPCRによるベロ毒素遺伝子(*stx*)スクリーニング、EHEC分離、*stx*, *eae*及びO抗原遺伝子(O157, O111, O103, O26, O145, O165, O121)検出コンベンショナルPCR(MP1 Plus)を実施した。

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

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

(食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析)

広域食中毒アラートを検出し、具体的な発出する方法としては、集団発生(ポイントソース)による報告数増加の影響を除くため、集団発生症例(家庭内感染含む)をクラスタリングした件数(=イベント数)を過去と比較することとなる。アラートレベルは患者イベント数/過去と比べてどの程度多いか(週とベースラインからの逸脱度:標準偏差によって分類)の組み合わせとなり、分かりやすさを重視してレベル1-4と区分し(図1)、レベルごとに対応を規定した。

このアラートレベルの設定と各レベルにおける分担研究グループによる対応の具体的な内容については以下ようになる。

#### 【レベル2+まで】

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

#### 【レベル3】

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

#### 【レベル4】

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

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

(ギラン・バレー症候群(GBS)とカンピロバクター食中毒事例の関連性評価)

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

## C. 研究結果

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

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

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

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

アンケートは 11 機関から回答を得られた。用いる情報解析端末については、多くの機関 (n = 6) では用いる情報解析端末はプロキシ設定が不要であったが、一部機関で設定が必要であった。そのため、プロキシの設定についても詳細に記述する必要があると考えられた。インストールについては、多くの機関ではマニュアルのみでインストールが可能であった (n = 7)。一方、自力でインストールできなかった機関では、docker のインストールが許可されない設定の解析端末を用いていたことが原因であった。同機関では、docker のインストールするために解析端末を購入した企業のサポートを受ける必要があった。また、メモリやプロキシの確認方法について調査する必要があった機関が存在した。プログラムについては、大部分の機関で全てのプログラムが動作しているとの回答が得られた (n = 8)。1 機関では checkM が動作しない事例が報告された。調査の結果、Windows 上で docker を動作させる際のメモリの割り当てを設定する必要があることが判明した。機能については、全ての機関から必要な機能が揃っていたとの回答が得られた。マニュアルについては、7 機関から「分かりやすかった」との回答が得られた。追加機能については、BLAST 解析や、菌株のリスト化などのプログラムの要望が得られた。

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

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

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

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

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

## 2. ゲノム情報収集、データベース拡充化

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

能であることが示唆された。また MLVA 型別とそのデータ蓄積において 3,074 株について分子型別解析を実施した。このうち 2,573 株について MLVA 法による解析を実施した。解析依頼施設数は延べ 97 施設であった。各血清群において同定された型数は、0157 が 810、026 が 169、0111 が 90、0103 が 62、0121 が 15、0145 が 19、0165 が 8、091 が 40 であった。得られたデータは 2024 年 5 月号の IASR の EHEC 特集号において公表される。MLVA 型別を実施しデータを送付した地方自治体は、延べ 44 施設であった。MLVA データを送付し、感染研において統一型名を付与した菌株数は約 1300 株であった。

2024 年度は 55 施設から約 1200 株分のデータについて照会があり、感染研で精度確認を行った（上記型名付与を行った株のデータを含む）。全遺伝子座における正解率（平均値）は約 98%であった。株毎の正解率（平均値）は約 87%であった。

## 3. MLVA 法の精度管理

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

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

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

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

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

#### 4. 食品関連サンプル由来 EHEC 株の収集、解析

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

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

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

#### 5. 離島コホート研究

(A 市および B 市で飼養されるウシの EHEC 保有率)

ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いて培養した増菌液から DNA を抽出し、*stx* 検出リアルタイム PCR を実施した結果、2024 年に収集した 100 検体中 19 検体で *stx* が検出された。*stx* 陽性となった検体はすべて B 市で収集された検体だった。*stx* 陽性検体から *stx* 保有菌株の分離を試みたところ、9 株の EHEC が分離された。2023 年と 2024 年を合わせると、*stx* 陽性は、A 市 100 検体中 6 検体、B 市 100 検体中 45 検体であり、A 市からは 2 株、B 市からは 22 株が分離された。その内訳を表 1 に示した。0-genotyping についての結果としては、2024 年は、0g157 が 2 株分離されたが、7 株

はシグナルを得ることができず、MP1 Plus で推定できる 0 群以外であると判定した (0gNT)。2023 年の結果と合わせると 24 株中 19 株が 0gNT、つまりヒトから分離される EHEC の頻度の高い 7 つの血清群ではないことが示された。

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

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

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

## 6. 食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析

広域食中毒アラート発出に関する研究について 2019 年から 2024 年までの情報について列挙する。レベル 3 以上の年毎の検知回数 / 厚生労働省への情報提供回数は、2019 年 (5 回 / 4 回)、2020 年 (2 回 / 1 回)、2021 年 (1 回 / 0 回)、2022 年 (3 回 / 3 回)、2023 年 (3 回 / 3 回)、2024 年 (3 / 4 回) であった。2024 年の厚生労働省への情報提供回数は 3 回で、2022 年、2023 年と並ぶ件数であった。2024 年の EHEC 症例報告数は 2011 ~ 2019 年の報告数と同等の水準まで増加していたが、アラート検知回数は 2019 年より少なかった。

2024 年のアラート情報の 1 回については、リアルタイムな監視の状況 (2024 年 37-38 週) として、0157VT2 が海外渡航者で多い等の疫学的な偏りを認めた。2024 年 9 月 25 日の情報提供の内容は以下のとおりである。全国で診断週 2024 年 37 週から 38 週にかけて、感染症サーベイランスシステム上では例年を上回る 0157VT2 症例数の増加を認め、特に診断・週 38 週にかけては、明らかに 0157VT2 に起因するイベント数の増加がみられた (過去平均 + 2SD 以上となり、またイベント数 20 以上で推移したことからレベル 4 相当)。

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

### ・高知県 GBS 症例の調査結果

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

着が確認され、観察できうる範囲で死亡例は確認されなかった。

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

#### ・高知県内食中毒事例の調査結果

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

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

## D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年より

約 12%減少した。解析結果は定期的あるいは不定期に厚生労働省 NESFD に MLVA リストとして掲載された。この中には食中毒事例関連株、有症苦情関連株も含まれ、厚労省及び各自治体における対応に活用された。

地方衛生研究所から型名付与のために送付された MLVA データは約 1300 株に上った。感染研で行った精度確認では菌株ベースで 87%、遺伝子座ベースで 98%一致しており、昨年度とほぼ同レベルで推移した。MLVA データ送付にあたっては、地衛研におけるデータの信頼性が重要であり、今後も引き続きモニタリングしていく必要がある。

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

細菌の進化の過程では、ファージなどの可

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

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

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

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

国内の合計 39 の集団事例を用いた解析の結果、疫学的関連性のある菌株間の SNPs 数は 8 以内に収まることが明らかとなった。前年度行った海外事例（計 5 事例）の菌株を用いた解析では、5 SNPs が同一クローン判定のひとつの基準となることが示唆されていた。また、前年度の解析により、互いに疫学的関連性のない菌株同士の遺伝的距離は 13 SNPs よりも大きくなることも明らかとなっている。これらのことから、国際的に整合性のある同一クローンの判定基準の候補として、10 SNPs はある程度妥当な数値であると考えられた。

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

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

本年度の MLVA 法研修会では、参加対象

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

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

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

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

離島コホート研究においては、2024 年は、100 頭のウシ糞便検体から 9 株の EHEC (STEC) が分離され、2023 年の 15 株と合わせて累計 24 株の分離に成功した。これらの分離株は国立感染症研究所細菌第一部と共有し、それぞれの施設で保管することとした。また、ゲノム配列情報は、本研究班分担研究者である中村 (九州大学) に依頼して取得してもらい、国立感染症研究所細菌第一部、中村 (九州大学) と共有した。菌株およびゲノムデータは解析終了後速やかにナショナルバイオリソースプロジェクト 病原細菌拠点および公的データバンク (DDBJ) への登録を予定している。広く活用できるようにすることで、今後の領域発展に貢献できると考える。

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

沖縄県のヒトの EHEC 感染症例由来の株のゲノムデータに関して、本研究班代表明田らと連携して取得を現在進めている。これらヒト由来 EHEC とウシ由来 EHEC との比較解析、さらには沖縄県以外でのヒト症例由来 EHEC との比較解析を同時に進めていく必要がある。

広域食中毒アラート発出は、行政と連携して実施し、公衆衛生上の成果を上げることが必要である最たるものである。本研究班分担研究グループが最大の目的とした EHEC 患者の届出情報から早期に広域事例疑いを探知し、迅速な調査開始につなげることについては、食中毒の前段階での EHEC 患者の届出時点を対象にしていることから、探知という点では一定の有用性を認めるシステムになっているものとする。さらなる情報の深堀については、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課による自治体に対する詳細な情報収集が試みられた場面も少なくなかったが、総じて広域事例は各自治体においては単

発・散発として発生していることは少なくなく、事例全体の情報収集やまとめを新たに追加的に行うことは出来なかった。広域事例全体の一部の可能性のある死亡例が発生した事例についての情報収集を、国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース (FETP) により実施出来た例はあったが、広域事例全体の感染源等の同定には至らなかった。各自治体にとっては散発である広域事例 (の可能性のある事例) に対する調査体制の整備が必要である。また、これまで、原因の可能性のあるメニュー・食品・食材に辿り着いても、その食品の汚染源までは分からず、多くは回収、再発防止策への取り組みに繋がってこなかった状況があったが、2023~2024 年は特筆すべき事例発生としては、2024 年の韓国渡航歴のある生肉喫食に関連した症例であったと考えられた (IASR vol146, No. 5: p17-18)。国内でのエビデンスの集積と活用を厚生労働省のみならず農林水産省を含め、関係省庁全体で行える連携体制作りが重要である。

新型コロナウイルスを踏まえた研究実施にあたっての工夫としては、結果の項に記載したように、レベル 3 以上の年毎の検回数 / 厚生労働省への情報提供回数は、2019 年 (5 回 / 4 回)、2020 年 (2 回 / 1 回)、2021 年 (1 回 / 0 回)、2022 年 (3 回 / 3 回 ⇒ 実際には 1 回)、2023 年 (3 回 / 3 回) 2024 年 (3 回 / 4 回) あった。COVID-19 がパンデミックとなった 2020 年からの回数の減少は明らかであり、その後回復したものの、COVID-19 パンデミック中のベースラインの変化に合わせたアラートレベルの設定変更の検討は今後必要である。

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

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

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

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

## E. 結論

コロナ禍において報告数の減少がみられた EHEC 感染症を含む食中毒、食品由来感染症もコロナ収束とともに増加へ転じている。EHEC 菌株の解析精緻化、迅速化が原因究明の要となることから、本研究で開発、改良している解析パイプラインは地方衛生研究所等への配布は目前となり、その普及が今後期待される。また現行型別法である MLVA 法の精度管理をすすめることで、ゲノム解析と比較してより迅速な事例間の関連性解析を進めることが理想的であろう。また、これまで以上に幅広い対象物より EHEC 菌株を分離し、その遺伝学的性状を明らかにすることは、複雑な疫学的リンクを明らかにし、迅速な食中毒アラートの発出に有用であることは自明であり、さらに研究開発を進める必要がある。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1) 誌上発表

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

conferred by a mutation in the promoter region of uncommon tellurite resistance gene *tehB* in the *ter*-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. 2024. *Appl Environ Microbiol* 90:e0228323.

2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2023年に分離された腸管出血性大腸菌のMLVA法による解析。IASR、第45巻、80-82、2024年5月

## 2) 学会発表

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

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

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

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

5. 鈴木麻友、瀬戸順次、的場洋平、

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

6. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析（2023年）。第45回日本食品微生物学会学術総会、2024年9月、青森県青森市。

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

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

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

10. 泉谷秀昌：EHEC O157、O26、O111のMLVA。令和6年度腸管出血のMLVA研修会、2025年1月、東京都

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

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

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし