

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  
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

明田幸宏（国立感染症研究所 細菌第一部 部長）

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）

伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

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 900 株について解析し型名を付与した。このうち約 6 割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。

地方衛生研究所における全ゲノム配列解析の課題を抽出する目的で、沖縄県衛生環境研究所と協同して、Oxford Nanopore 社（ONT）シーケンサーによるデータ解析および全ゲノム配列解析環境の構築を行った。ONT データの解析では、沖縄県内での腸管病原性大腸菌の解析を行い、イルミナシーケンサーと同等の解像度の型別を行えることが示された。解析環境の構築では、沖縄衛研で全ゲノム配列解析環境を構築した。同環境は、現在食中毒疑い事例の調査等で活用されている。また分担研究者の成果の概略も併せて示す。

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）のサーベイランスではこれまでパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）が主要な解析手法であったが、2018年6月29日付の厚生労働省事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により、反復配列多型解析（multi locus variable 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、多くの地方衛生研究所において次世代シーケンサーが導入されている。しかし、Oxford Nanopore 社（ONT）シーケンサーについては、単一塩基多型（SNP）等を用いた菌株間の関連性解析の知見が少ない。そこで、沖縄県衛生環境研究所（沖縄衛研）と協同して、ONT データを用いた病原性大腸菌事例の解析を行った。さらに、イルミナシーケンサーによるデータも含めた情報解析環境の構築を、沖縄衛研にて試験的に行った。

## B. 研究方法

### MLVA 法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研に送付された腸管出血性大腸菌 2022 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。

### 地方衛生研究所と協同した WGS 解析

沖縄県で 2022 年に発生した腸管病原性大腸菌（EPEC）O153 感染事例について、協同して WGS 解析を行った。本事例では、家族内感染 2 株および散発例 1 株が近い時期に分離されていた。そこで、沖縄衛研にて 3 株のゲノム DNA を抽出し、Rapid Barcoding Kit（Oxford Nanopore）でライブラリー抽出した後に、MinION にて R9.4 のフローセル（Oxford Nanopore）を用いてシーケンス解析を行った。得られた Fast5 ファイルを感染研に送付後、Guppy basecaller にて、3 種のモデル（Rapid, High accuracy, Super accuracy）でベースコールを行った。それぞれの条件で得られた FastQ ファイルを用いて、Tricycler にてアセンブリを行った。アセンブリによって得られたコンプリートゲノムから ART を用いて疑似ショートリードを作製し、Lee ら（2021. Emerg Infect Dis 27:1509-1512）の方法を用いて core genome (cg)SNP を抽出した。また、解析を行った 3 株については、MiSeq (Illumina) でも全ゲノム配列の解読を行った。上記と同様の方法で cgSNP を抽出し、ONT データによる結果との比較を行った。

### 地方衛生研究所における WGS 解析環境の構築

沖縄県衛生環境研究所における WGS 解

析環境を構築するために、同所のワークステーションへの Linux 仮想環境の構築および感染研・細菌第一部使用プログラムのインストールおよび動作確認を行った。

## C. 研究結果

### MLVA 法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研細菌第一部において、2564 株について分子型別解析を実施した。このうち 2275 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 95 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 665、O26 が 182、O111 が 55、O103 が 42、O121 が 19、O145 が 16、O165 が 5、O91 が 26 であった。得られたデータは 2023 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、34 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 884 株であった。このうち 482 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 92% 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。

### 地方衛生研究所と協同した WGS 解析

Oxford Nanopore シークエンサーによるデータを解析した結果、ベースコールモデルによって結果が大きく異なっていた (図 X1)。すなわち、精度が最も低い Rapid によるベースコールでは、最も多数の

SNP が認められた。精度が中間の High accuracy および精度が最高の Super accuracy によるデータでは、菌株 22-13 および 22-18 間の SNP の数は同一であり、ゲノム中の位置も概ね同一であった。High accuracy では 22-17 および 22-18 間の SNP は検出されなかったが、Super accuracy では両株間に 2 カ所の SNP が認められた。イルミナシークエンサーによる cgSNP 解析では、22-13 および 22-17/22-18 間で 2 カ所の SNP が認められた。22-17 および 22-18 間での差異は認められなかった。これらの SNP の位置は、ONT における High accuracy データと概ね一致していた。各条件で得られたコンプライート配列を比較したところ、Super accuracy およびイルミナ (ONT データで得られた配列をイルミナデータで修正した配列) によって得られた配列間では 47 か所、High accuracy およびイルミナ間では 241 か所の違いが認められた。これらの大部分はホモポリマー (同一塩基が連続する配列) 上に存在していた。

### 地方衛生研究所における WGS 解析環境の構築

沖縄衛研の解析ワークステーションに、基本的な WGS 解析 (アセンブリおよび cgSNP 解析) を行うことが可能な環境を構築した。同環境は、現在沖縄衛研においてセレウス菌等の食中毒調査に活用されている。

## D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年より約 10% 増加した。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 900 株に上った。このうち 55%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 92%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概ねないと考えられた。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。

地方衛生研究所と協同した WGS 解析の結果、ONT シークエンサーによって得られたデータは、High accuracy または Super accuracy のベースコールを行うことで、イルミナデータと同等の cgSNP 解析が行える可能性が示唆された。ONT によるデータは精度が低いとされる。実際にホモポリマー部分ではイルミナデータとの齟齬が認められたが、このような部分は insertion/deletion (indel) とされ cgSNP 解析には含まれない。このため、cgSNP 解析結果には影響がなかったと考えられる。今後、より多数の事例の解析によって、ONT データ解析の妥当性を評価する必要がある。一方、ONT データは容量が非常に大きい (数 G byte 以上) ため、送付時にデータが破損する例が見られた。このため、地方衛研である程度の解析を行った後に情報を共有するのが効率的と考えられた。

データ解析環境の構築では、感染研・細菌第一部で使用中のプログラムのインストールを行ったが、一部専門知識が必要

であり、情報解析に慣れない担当者が行うのは困難であることが判明した。今後、より簡易に解析環境を構築可能な体制を整える必要がある。

## E. 結論

地方衛生研究所と協同した WGS 解析や解析環境構築によって、ONT シークエンサーでもイルミナシークエンサーと同様な菌株間関連性解析が可能であることが示唆された。一方で、解析データや解析環境の共有についてはより簡易・効率的な方法が必要であると考えられた。

### 分担研究の概略

腸管出血性大腸菌等の検査法 (全ゲノム解析) の開発 (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) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症の事例調査のために各種の分子型別法が開発されてきたが、国内では反復配列多型解析法 (MLVA 法) がその迅速性・精微性から主に用いられてきた。本研究班は、MLVA に関する蓄積データの検証や地方衛生研究所における利用促進のための精度管理手法の確立などを行うとともに、EHEC 等の検査への全ゲノム解析 (WGS) の適用に関する検討を行うことを目的としている。本分担者は、他の分担者とともに後者の課題を担当するとともに、並行して行われる食品及び動物分離菌株の WGS データの収集を随時サポートし、WGS データベースに組み込んで解析する役割も担っている。本年度は、前年度までに引き続き、我が国で WGS を利用したサーベイランスと事例

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、欧米諸国における WGS の活用状況、使用する解析パイプラインやデータベース等の調査を文献情報を基に行うとともに、我が国での活用法について検討した。これと並行して、前年度までに収集している国内分離株の WGS データの整理や再シーケンスを進めるとともに、本研究班代表者らが既に収集している分離株の WGS データを追加取得し、公共データベースからの WGS データの追加収集を行った。参照配列になりうる株については、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、0165、0103、0157 EHEC の WGS 情報に関するデータベースの構築と更新を行なった。また、0145 に関しては、WGS を利用して Stx1 フェージの多様性に関する詳細な解析も行った。

**感染症発生動向調査 (NESID) をベースとした腸管出血性大腸菌感染症を原因とする広域食中毒探知と対応の取り組み (研究分担者 砂川富正 国立感染症研究所実地疫学研究センター センター長)**

広域食中毒アラートとして、迅速な集団発生・広域散发事例の探知を目的として、食中毒情報以前の感染症情報である感染症発生動向調査 (NESID) データを活用し、過去データに基づくベースラインとの比較により、特異な EHEC 患者報告数の増加を迅速に探知することを目的として、レベル 1 - 4 のアラートシステムの開発に取り組んできた。また、広域食中毒アラートを端緒とした感染源の分析からさらに

汚染源へと迫る広い追及についても本分担研究グループの研究目的の一つとした。2019 年から 2022 年までの状況として、全体を通してレベル 4 は 2019 年第 44 週に探知した 0157VT1VT2 による 1 回のみであった。レベル 3 以上の年毎の検知回数/厚生労働省への情報提供回数は、2019 年 (5 回/4 回)、2020 年 (2 回/1 回)、2021 年 (1 回/0 回)、2022 年 (3 回/3 回) であった。2022 年は 19 週から 22 週にかけて、NESID 上では東日本を中心に例年を上回る 0157VT1VT2 症例数の増加を認めたが (2 週連続で +1SD 以上となり、またイベント数 20 前後で推移したことからレベル 3 相当)、原因究明に繋がる情報は得られなかった。レベル分けの根拠とした情報は 2018 年のデータであり、直近の 3 年間は新型コロナウイルス感染症によるパンデミックによる大きな影響を受けていたと考えられる。厚生労働省への情報提供 (注意喚起) は、アラートレベルの見に拠らず、MLVA の時間的・空間的拡がりについても加味したことから、2022 年の厚生労働省への情報提供回数は 3 回と比較的多いように見えるが、実際には他の要因が含まれる。アラートレベルの設定及び情報提供のあり方について検討を進める必要がある。また、実際にこの 3 年間に、本研究をベースとした広域としての調査事例が無かったことから、省庁を超えた分析には至らなかった。

**食品由来株の収集 (研究分担者 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)**

本研究では、食品から分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の同一検体由来株間における反復配列多型解析 (MLVA) 型の多様性を明らかにするため、食品由来 STEC 菌株を MLVA 法に供試し、MLVA 型多様性を解析した。その結果、MLVA 法に供試した STEC 菌株は、殆どが由来食品ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であり、1 株のみ 1 遺伝子座のリピート数が異なる株であった。同一検体中に MLVA 型が大きく異なる STEC が存在する可能性は低いことから、食中毒検査で同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一の MLVA 型の報告が過去に複数の自治体からあったことから、一層、食品を汚染する STEC の分離と分離株の MLVA 型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低い但し複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

**動物由来株の収集と分子型別 (研究分担者 寺嶋 淳 岩手大学農学部共同獣医学科 教授)**

腸管出血性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : STEC) は牛が腸管内にしばしば保菌していることが知られており、食肉や二次的に汚染し

た多様な食材や食品が STEC 食中毒の感染源となっている。また、豚では STEC による浮腫病が知られているがヒトへの病原性は低いと考えられており、Non-0157 STEC による食中毒が報告されている状況でも豚の保有する STEC に関する情報は少ない。したがって、汚染源となり得る牛及び豚の STEC 保菌状況を知ることは STEC 感染症の制御にも極めて有効な情報と考えられる。

本研究では 2021 年の 4 月から 2022 年の 8 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された豚 521 頭の直腸便における STEC について stx 遺伝子の PCR スクリーニングを行い対象豚の STEC 保持状況を調査した。分離できた STEC について凝集試験または Og-typing PCR 法にて O 抗原型、Og 型を調べた。また PCR によって stx サブタイプ、病原因子遺伝子を調べた。さらに、薬剤感受性試験を実施し株の薬剤耐性について調査し、パルスフィールドゲル電気泳動法によって遺伝的類似性を比較した。

**反復配列多型解析法の有効性の検証・精度管理手法の確立 (研究分担者 平井晋一郎 国立感染症研究所感染症危機管理研究センター主任研究官)**

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学的解析法である反復配列多型解析 (MLVA) 法は、地方衛生研究所 (地衛研) における食中毒サーベイランスで用いられている。類似したタンデムリピート (TR) パターンを持つ EHEC 菌株が広域に蔓延することが、毎年、サーベイランスで確認されている。MLVA 法が分子疫学的解析法として有効で

あるためには、蔓延が一定期間で終わる原因が、菌株の多様性増加により MLVA 法で同一クローン由来と判断できなくなったためでないことを示す必要がある。また、MLVA 法が持つ能力をサーベイランスで活かすには、地衛研の検査精度も高くなければならない。そこで、蔓延菌株に対する MLVA 法の有効性を検証するために、長期的な継代培養を行い、蔓延菌株を模擬的に作成し、TR 数の変化を観察した。継代培養した LB Broth を平板培地に画線培養し、得たコロニーについて MLVA 法を行ったところ、培養 30 日目以降、TR 数が変化していた。150 日目まで継代培養を続けても、コロニーの TR 数の変化は 2 領域以内であり、同一クローン由来と判定できる範囲内だった。継代培養は、蔓延菌株が晒される環境と同じでないことを考慮する必要があるが、MLVA 法は宿主外で長期間に渡って変異が蓄積した菌株にも有効と思われた。次に、全国の地衛研を対象に MLVA 法の精度管理試験を行ったところ、参加した 37 施設中 30 施設が全検体に正しく回答した。不正解の検体があった施設に実験工程を照会したところ、基本的な工程を正しく行えていなかった。例えば、解析ファイルの Bin 設定が適切でなかった施設、電気泳動の際に DNA の添加を忘れた施設があった。これら施設に改善法を示したが、全地衛研の約 3 割は本研究で実施してきた精度管理試験に未参加である。我が国のサーベイランスの精度を上げるためにも、MLVA 法の検査精度試験の継続が必要だろう。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 誌上発表

なし

### 2) 学会発表

泉谷秀昌：分子疫学解析の現状と問題点、課題など（総括）。令和3年度希少感染症診断技術研修会、2022年2月オンライン

泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真、明田幸宏：腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析（2021年）。第43回日本食品微生物学会学術総会、2022年9月、東京都

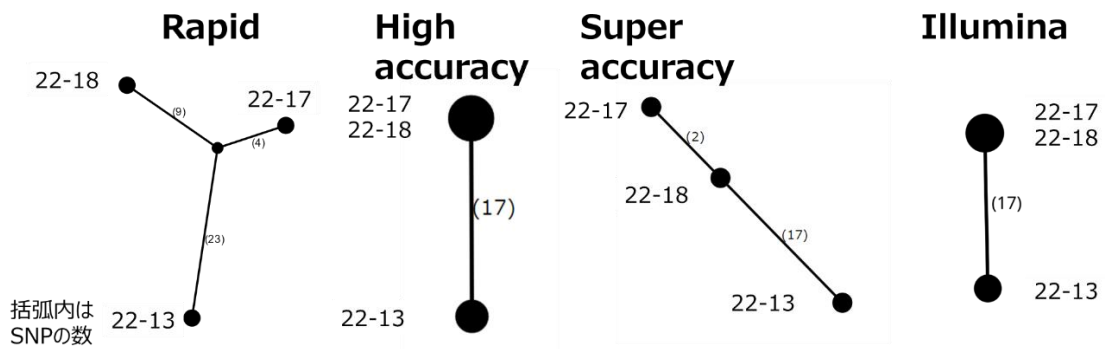
## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし



**図 X1. ベースコールモデルおよびシーケンサー別にみた EPEC O153 における SNP による median joining tree**

各ノード（丸印）は菌株を示す。カッコ内は SNP の数を示す。Rapid、High accuracy、および Super accuracy は Oxford Nanopore シーケンサーデータのベースコールモデルを示す。Illumina は、Illumina HiSeqX によって得られたデータを示す。