

厚生労働省科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業  
「広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した  
調査法の確立に資する研究」

(23KA0501)

研究分担報告書

分担研究課題

「2024 年度 EHEC 検出状況と EHEC の WGS 解析パイプライン構築」

研究分担者 明田幸宏（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

柿田徹也（沖縄県衛生環境研究所）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC）のサーベイランスにおいて、現在、主に反復配列多型解析（multi-locus variable-number tandem repeat analysis : MLVA）法が使われている。MLVA データを基盤とするため継続的に全国の EHEC 分離株を解析した。MLVA 法により解析した 2024 年分離株は 2,573 株であった。また、血清群 O157、O26、O111 については地方衛生研究所から直接 MLVA データが送付され MLVA 型の付与を実施した。今年度データを解析し型名を付与した株は約 1300 であった。

広域食中毒の調査に全ゲノム配列解析を用いるためには、標準的な解析法の整備が必要である。そこで、前年度に確立した解析パイプラインを docker プラットフォームを用いて試験的に配布し、評価を行った。地方自治体を主とする 20 機関に配布したところ、大部分の機関でマニュアルのみでインストールが可能であった。アンケートおよび講習会から得られたバグ等について修正を行い、次年度に一般公開を目指す。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）のサーベイランスではこれまでパルスフィールドゲル電気

泳動法（PFGE）が主要な解析手法であったが、2018 年 6 月 29 日付の厚生労働省事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」

(2023 年 6 月 28 日再周知) により、反復配列多型解析 (multi-locus variable-number tandem repeat analysis : MLVA) 法が血清群統一手法として用いられている。

このような現状から、分子疫学手法としては、8 種の O 群 (O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165、O91) では multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) が、その他の O 群ではパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法が用いられている。本分担研究では全国の MLVA による解析結果の総括並びに、事務連絡に基づいて送付された地方衛生研究所からの MLVA データについて解析を行った。また近年、高速シーケンサー (NGS) の実用化により、集団感染等の調査に全ゲノム配列 (whole-genome sequence : WGS) を用いた解析が取り入れられつつある。実際の解析時には、NGS で WGS を解読した後に、生データのクオリティチェック (quality check, QC) を行い、その後 single nucleotide polymorphism (SNP) 解析等を行う必要がある。そのために用いるソフトウェアや解析サーバーは数多く存在するが、使用法やデータの評価基準等が記された体系的なマニュアルは存在せず、精度管理上の課題がある。さらに、Linux OS で動作するソフトウェアの場合、端末によってインストールが困難な場合がある。このため本分担研究では、地方自治体等における集団感染調査の際に特に必要とされる解析パイプラインの確立と共有化を目的とした。本年度は、前年度に作製した解析パイプラインのマニュアル作製および試験的な配布を行った。

## B. 研究方法

### 1. MLVA 法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研に送付された腸管出血性大腸菌 2024 年分離株に対して MLVA 法により解析した。方法は Izumiya ら (2008、2020) の方法に従って実施した。血清群 0157、026、0111 については 17 か所、0103、0121、0145、0165、091 については 43 か所の遺伝子座を用いた。地方衛生研究所から MLVA 型付与のために送付された MLVA データ (血清群 0157、026、0111) も併せて解析を行った。

### 2. WGS 解析パイプラインのマニュアル作製および試験的配布

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

### 3. 講習会およびアンケートの実施

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

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

### 4. プログラム修正

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

## C. 研究結果

### 1. MLVA 法の有効性の検証・精度管理手法の確立

感染研細菌第一部において、3,074 株について分子型別解析を実施した。このうち 2,573 株について MLVA 法による解析を実施した。解析依頼施設数は延べ 97 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 810、O26 が 169、O111 が 90、O103 が 62、O121 が 15、O145 が 19、O165 が 8、O91 が 40 であった。得られたデータは 2024 年 5 月号の IASR の EHEC 特集号において公表される。

MLVA 型別を実施しデータを送付した地方自治体は、延べ 44 施設であった。MLVA データを送付し、感染研において統一型名を付与した菌株数は約 1300 株であった。

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

### 2. WGS 解析パイプラインのマニュアル作製および試験的配布

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

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

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

### 3. 講習会およびアンケートの実施

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

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

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

#### 4. プログラム修正

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

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

#### D. 考察

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

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

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

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

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

## E. 結論

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

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

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 誌上発表

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

Environ Microbiol 90:e0228323.

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

### 2) 学会発表

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

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

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

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

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

6. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明

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

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

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

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

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

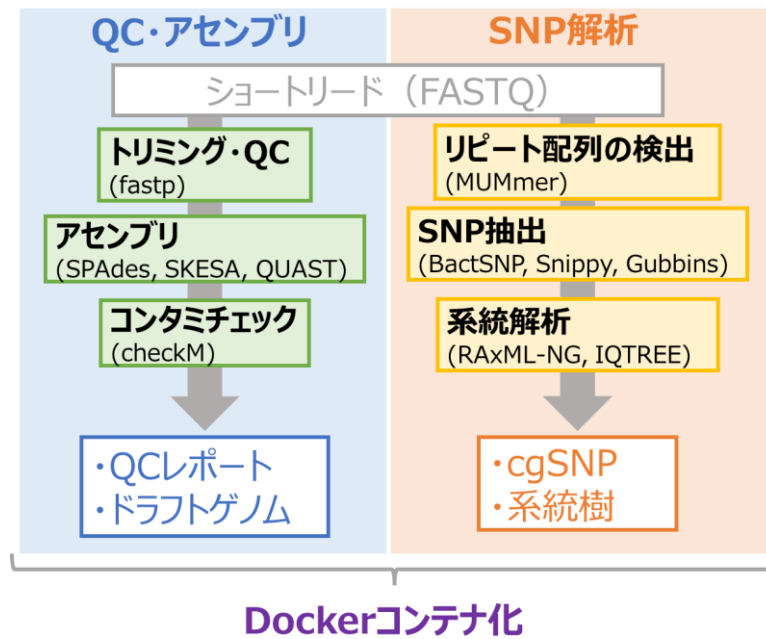
## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

### **1. 特許取得**

なし

### **2. 実用新案登録**

なし



**図 1. 解析パイプラインの概要**

括弧内は主要なプログラム名を示す。

## A

### 目次

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

## B

### 1.1.1.3. Linux

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

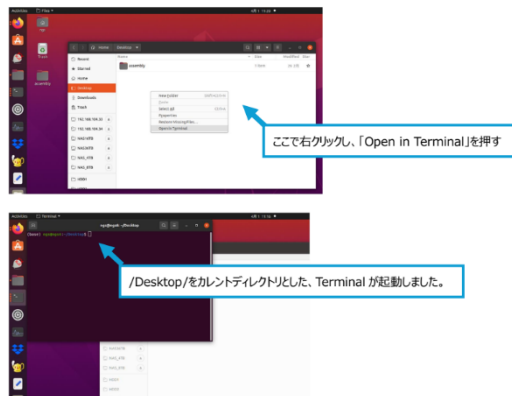


図 2. 解析パイプラインマニュアルの目次 (A) および内容の一部 (B)



### 1. 選択形式の設問

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

### 2. 自由記載の設問

| 設問        | 回答                                                                                                                                                                                         |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 追加して欲しい機能 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・菌株リストの作製</li> <li>・アノテーション</li> <li>・アセンブリ結果を1つのフォルダにまとめて欲しい</li> <li>・MLST</li> <li>・血清型別</li> <li>・病原因子の検索</li> <li>・トリミングファイルを残して欲しい</li> </ul> |
| 改善して欲しい部分 | <ul style="list-style-type: none"> <li>・系統解析結果をまとめて欲しい</li> <li>・実行中ログに関する注意事項の追加</li> <li>・repeatsファイルが移動してしまう</li> <li>・データ解釈について学べる機会が必要</li> </ul>                                     |

図 3. 解析パイプラインアンケート結果