

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700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。2014-2020年の集団事例株のMLVAデータを解析し、各遺伝子座の変動を明らかにした。

最適なSNP解析条件を検討するために、参照配列と解析するデータセットの2条件が型別能に与える影響について、EHEC O76:H7およびO111:H8の全ゲノム配列データをもとに検討した。この結果、近縁株を参照配列に用いて、近縁株のみで解析した場合に型別能が最大になることが明らかとなった。さらに参照配列の選択よりも、近縁株のみで解析することの方が、型別能に与える影響が大きいことが示された。

分担研究者の成果の概略も併せて示す。

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 (国立感染症研究所実地疫学研究センター・センター長)

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危機管理研究センター・主任研究官)

## 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 EHEC 菌株の解析に全ゲノム配列（whole-genome sequence : WGS）が広く用いられるようになってきているが、解析手法によって結果が異なることが知られている。例えば、参照配列として近縁株を用いた方がコアゲノムサイズが大きくなるため、より多数の単一塩基多型（single nucleotide polymorphism : SNP）が検出される可能性があるが、定量的に示した報告は少ない。そこで、参照配列と解析するデータセットの2条件が型別能に与える影響について、EHEC O76:H7 および O111:H8 の WGS データをもとに検討した。

## 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

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。

### EHEC 調査における最適な SNP 解析法の検討

EHEC O76:H7 および O111:H8 の菌株を対象に、より高精度な SNP 解析法の検討を行った。SNP 解析時には、参照配列および解析を行うデータセットが重要と考えられたため、それぞれに複数の条件を設けて解析を行った。O76:H7 では、参照配列として、近縁（O76:H7 JNE132847 株の完全長ゲノム配列）または遠縁（O157:H7 Sakai 株）の2株を用いた。データセットとしては、多様な大腸菌を含む 34 株（O76:H7 8 株を含む）または O76:H7 8 株のみでの解析、の2条件で行った。O111:H8 の解析では、計 878 株分のゲノムデータを用いた。この中には 79 事例のクラスター（疫学関連のある事例）が含まれており、このうち 10 株以上のクラスター15 事例を対象とした。参照配列としては、O111:H8 の代表株（11128 株）、クラスター内の株、または O157:H7 Sakai 株の3種を用いた。データセットとしては、O111:H8 878 株をまとめて解析、またはクラスター内の株のみで解析、の2条件を設けた。

SNP 解析は、BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインを用いて行った。

## 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、2430 株について分子型別解析を実施した。このうち 2058 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 85 施設であった。各血清群において同定された型数は、O157 が 526、O26 が 160、O111 が 71、O103 が 44、O121 が 16、O145 が 10、O165 が 6、O91 が 29 であった。得られたデータは 2022 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 684 株であった。このうち 416 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 (図 1)。

2014-2020 年に発生した集団事例のうち、菌株数 10 以上の事例 97 件、約 2500 株について、各事例内で各遺伝子座の標準偏差を算出した、その分布を図 2 に示す。各遺伝子座の分布について 95 パーセントイル値は  $x$  で示した。

### EHEC 調査における最適な SNP 解析法の

## 検討

O76:H7 を用いた解析における条件ごとの最尤法系統樹を図 3 に示す。最も型別能が高い (系統樹の枝の長さが長い、株間の SNP 数が多い) 条件は、参照配列として O76:H7 を参照配列として用い、同血清型のみで解析を行った場合であった (図 3D)。しかし、O76:H7 を参照配列として用いた場合でも、遠縁な株を含めて解析した場合には最も型別能が低くなった (図 3C)。一方で、参照配列が別血清型 (O157:H7 Sakai) であっても、O76:H7 のみで解析を行った際には、2 番目に高い型別能となった (図 3B)。

O111:H8 の解析では、同血清型代表株を参照配列として全株を解析した条件を基準に、他の条件との比較を行った。その結果、クラスター内の株のみで解析した場合には参照配列が代表株の場合でも、クラスター内の場合でも SNP 数の増加分に大きな違いは見られなかった (図 4)。一方で、参照配列を別血清型 (O157:H7 Sakai) とした場合には、参照配列が O111:H8 代表株である場合と比べて型別能が劣る例も認められた。

## D. 考察

MLVA 法により解析した菌株数は昨年とほぼ同等であった。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 700 株に上った。このうち約 6 割の株が、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。

集団事例株を用いて MLVA の遺伝子座の変動を解析した。最も変動が大きかったのは EHC-6 であり、次いで O157-37 であった。これらはプラスミド上にあり、そのために変動が大きいことが推測された。しかしながら、同じくプラスミド上にある O157-36 ではほとんど変動は見られなかった。各遺伝子座の変動を精査することで、MLVA に基づくクラスター探知の精度向上につながることを期待される。

サーベイランスに用いる SNP 解析法の検討では、近縁な株を参照配列とし、近縁な株のみで解析することでより型別能の高い解析が行えることが示された。O111:H8 の解析からは、参照配列として用いるのが同一血清型であれば、クラスター内の株を参照配列として用いた場合と比べて同等の型別能が認められることが明らかとなった。完全長ゲノム配列を参照配列に用いることの利点は、組換え領域等をエラーが起りやすい領域をより正確に除けることであるが、本解析では型別能に大きな影響は与えなかった。また、用いるデータセットの影響は、参照配列の影響よりも大きいことが O76:H7 の解析から明らかとなった。これは、遠縁な株を解析に含めることでコアゲノムサイズが小さくなる結果であると考えられる。集団感染等の調査の際には、まず全体的な系統解析を行い、次に近縁株のみで解

析をするといった段階を踏んだ解析が必要になると考えられた。

## E. 結論

MLVA 法は迅速性、精微性に優れた分子型別手法であり、MLVA リストを共有することで広域食中毒等の早期探知に有効である。地衛研から送付される MLVA データは迅速性の向上に重要であり、今後も当該データの信頼性確保のため、モニタリング等の方策が必要である。

SNP 解析の手法としては、解像度を高めた解析のためには、全体的な系統解析後、近縁株のみを抽出し再解析するといった解析パイプラインが必要と考えられた。

## 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(林 哲也)

国内・国外分離株の WGS データの収集・解析とデータベース構築が順調に進んだ。収集数は、026 (540 株：国内株は 314)、0145 (246 株：国内株は 88)、0121 (638 株：国内株は 211 株) については、収集数に大きな変化はないが、0121 に関して、このデータセットの解析結果を論文発表した。また、0145 に関しては、既に収集したデータの詳細な解析から、prophage-in-prophage という新たな現象を見出し論文発表がなされた。

O157:H7、O103:H2、O165:H25 に関しては、O157:H7 では 7,146 株 (国内は 3,176 株)、O103:H2 では 2,701 株 (国内は 200 株) O165:H25 では 202 株 (国内は 71 株) と、海外株を中心に大幅に情報を拡張された。

0157:H7 に関しては、海外株の情報だけでなく、2020 年の国内分離株の大部分を網羅する 623 株の WGS 情報を研究代表者との連携によりデータベースに組みこまれた。0157 の中で特に病原性が高いと推察されている Clade 8 株に関しては、別途収集・整備と解析を行なわれており、昨年度までに収集した株(511 株:国内株は 150)の詳細な解析とともに、亜系統を代表する 18 株を選び、ロングリードを用いたハイブリッドアッセムブリにより完全長配列を取得した。0103:H2 に関するも国外株の情報を大幅に充実させるとともに、完全長配列を追加取得された。諸外国における WGS の活用状況等の調査からは、食中毒調査のための WGS データの利用方法・手法について未だコンセンサスが得られていない。分担研究者 林からは、我が国の現状を踏まえた上でコア遺伝子セットの配列に基づく cgMLST を利用するのが妥当ではないかと提案された。最終年度においては、地方衛生研究所における具体的な実施工程を提案し、課題の抽出とそれらの課題の解決策の提案を実施する予定である。

#### 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 (平井 晋一郎)

順調に精度管理手法が進んだ。

EHEC 0157、026 及び 0111 の菌株及び DNA を一部の地衛研に配布して MLVA 法の精度管理プレ試験が行われた。その結果、9 施設は全検体について正解だったが、1 施設が 1 検体でフラグメント解析ソフトの使用法に問題があり不正解の回答が得られた。最終年度、全国規模で精度試験を行う

準備が整ったが、解析ファイルを正しく利用できるかを検証できる検体を配布することで、意義深い精度管理が実施できると考えられる。

#### 食品由来株の収集 (工藤由起子)

食品由来 EHEC 株の解析を進めた。

令和 3 年度に MLVA 解析に供試した菌株は、由来ごとに 17 遺伝子座で各リポート数が同一であった。しかし、寒天培地上での生育には違いが認められたことから、MLVA 型が同一の菌株でも性質が単一でないことが示唆された。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品検体における STEC の MLVA 型多様性の解析を進める予定である。

#### 動物由来株の収集と分子型別 (寺嶋 淳)

牛、豚の直腸検体より、*stx* 遺伝子の検出および、STEC の分離が精力的に進められた。

牛の直腸便 591 検体及び豚 178 検体が対象となった。

牛では、*stx* 陽性率は 23.7%となり、35 検体から 39 株が分離された。病原因子、薬剤感受性の観点から公衆衛生学的に対応が求められるような菌株の検出は少数にとどまった。一方、農場や都道府県をまたいで拡散している遺伝学的に近縁と考えられる菌株が検出されたことが報告された。

豚では、*stx* 陽性率は 48.9%となり、15 検体から 16 株が分離された。得られた株は全て浮腫病原因 STEC と考えられる株であり、公衆衛生学的に迅速な対応が求められる菌株は検出されなかった。豚由

来 STEC について日本国内における報告は限られているため本調査を継続することの意義は高い。

### 食品媒介感染症・食中毒の疫学調査手法の整備に関する研究 (砂川 富正)

NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知は安定して稼働してきた。ただし、新型コロナ禍の中で、EHEC 発生数に変化が見られており、異常値探知のためのベースラインの再考が必要かもしれない。2022 年度において、新しいベースラインを検討する。

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。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として上げられた。また、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。また、地理的課題を解決出来るような機器の導入や利用も重要であると考察された。

### 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、大西真：2020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42巻、96-

97、2021年5月

2. 李謙一、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：国内で分離された腸管出血性大腸菌の全ゲノム配列データベース化と食中毒事例の解析。IASR、第42巻、97-98、2021年5月

#### 2) 学会発表

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 (2018-2020 年)。第 42 回日本食品微生物学会学術総会、2021 年 9 月、オンライン。

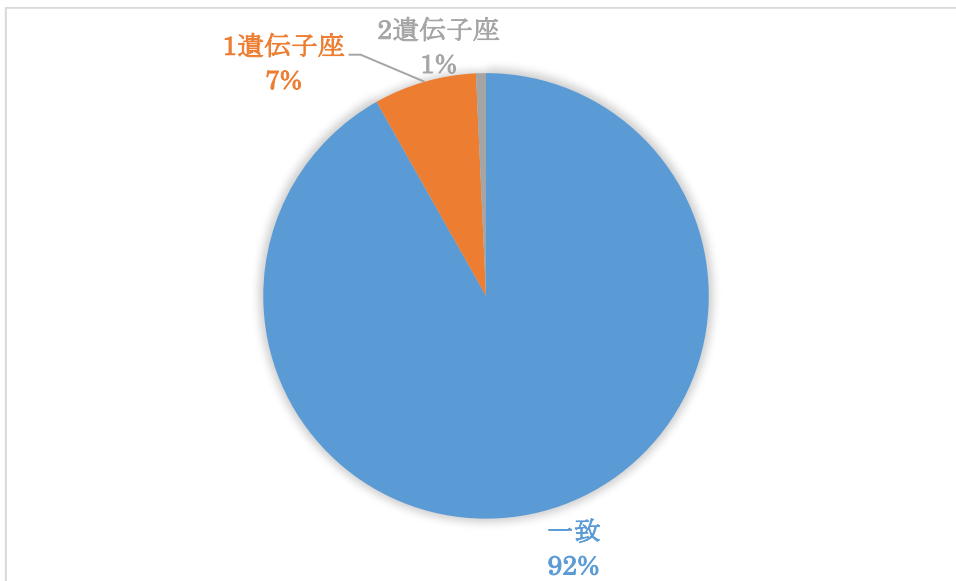
### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

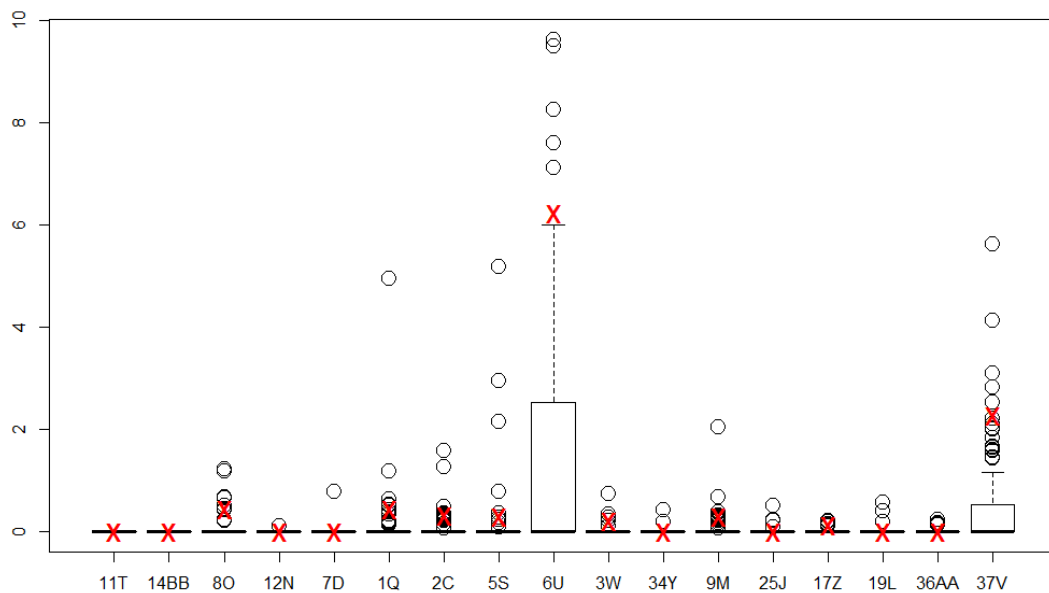
なし

#### 2. 実用新案登録

なし

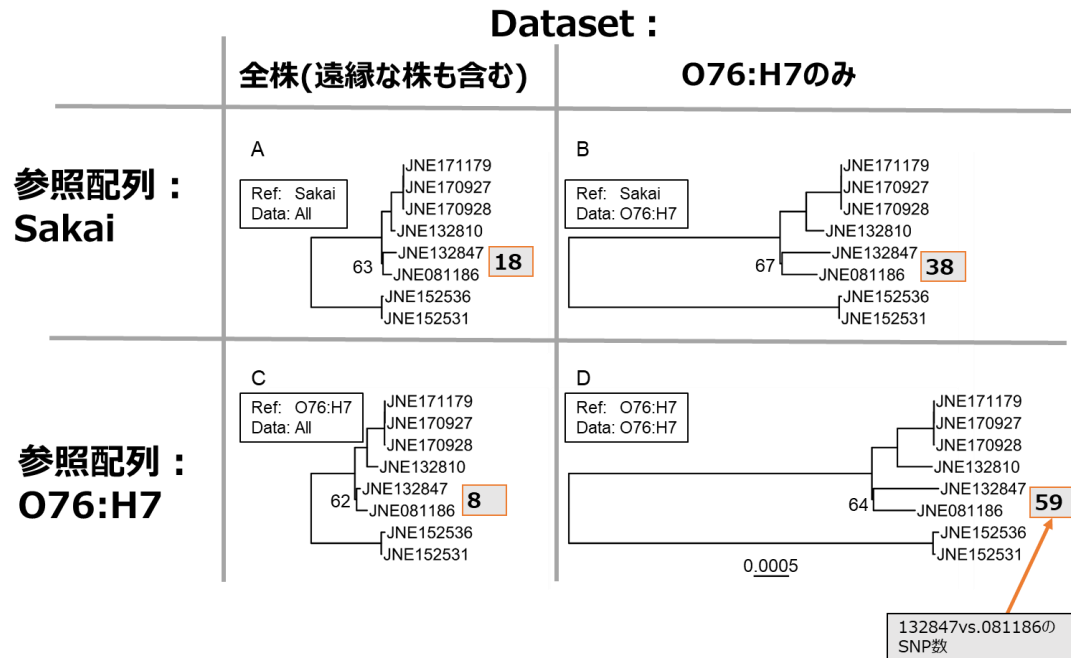


**図 1. 送付 MLVA データと菌株データの結果の比較**  
一致、1 遺伝子座違い、2 遺伝子座違いを表す



**図 2. 集団事例内のリピート数標準偏差の分布 (x は 95 パーセンタイル値)**

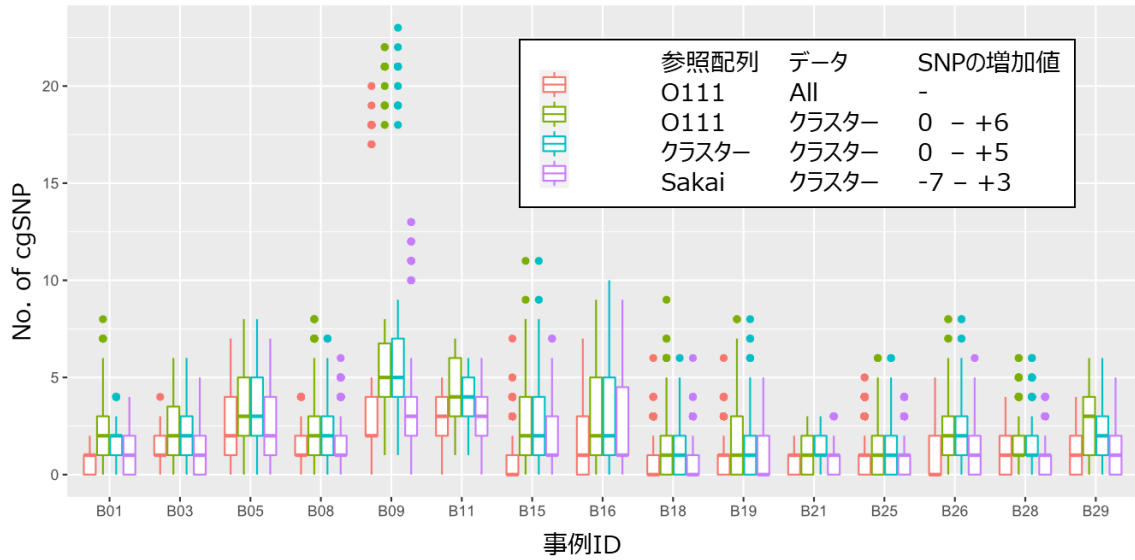
左から E111-11, E111-14, E111-8, EH157-12, EH26-7, EHC-1, EHC -2, EHC-5, EHC-6, O157-3, O157-34, O157-9, O157-25, O157-17, O157-19, O157-36, O157-37 を表す



**図 3. SNP 抽出条件ごとの O76:H7 の最尤法系統樹**

参照配列としては、O76:H7 代表株 (JNE132847 株) および O157:H7 Sakai 株の 2 種を用いた。解析データは、多様な大腸菌を含むデータセットおよび O76:H7 のみの 2 条件を用いた。四角内の数字は、型別能の例として JNE132847 および JNE081186 株間の SNP 数を示した。





**図 4. O111:H8 における集団感染クラスター別の SNP 数を示した箱ひげ図**

参照配列としては、O111:H8 代表株（11128 株）、クラスター内の株、O157:H7 Sakai 株の 3 種を用いた。解析データは、O111:H8 全株（878 株）およびクラスター内の株のみの 2 条件を用いた。注釈中の SNP の増加値とは、参照配列として O111:H8 代表株を用いて全株で解析を行った際のデータと比べた時の、SNP 数の差異を示したものである。