

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
「感染症の病原体を保有していないことの確認方法について」の改定に資する研究
(20HA1009)
分担研究報告書

分担研究課題：長期排菌に関連した微生物学的特性を明らかにするための菌株解析

研究分担者 伊豫田 淳 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究協力者 李 謙一 (同上)

全国の地方衛生研究所および保健所の細菌検査担当者

研究要旨

腸管病原性大腸菌 (EHEC) の保菌に関わる因子を明らかにする目的で、EHEC O103 の集団感染事例から得られた検体について、メタゲノム解析を行った。その結果、EHEC 陰性サンプルにおいて Bifidobacterium 属菌が比較的少ないこと、Escherichia 属菌の割合には違いがないことが明らかになった。また、陽性サンプルでは Haemophilus 属菌、陰性サンプルでは Megamonas 属菌等が比較的多いといった差が認められた。昨年度実施した EHEC の陰性確認に関する地衛研担当者へのアンケート調査を基に、EHEC の陰性確認手法について、検査時間短縮のために PCR 法または LAMP 法による陰性確認法を実施可能とし、1) PCR の結果は陰性確認に限定する (PCR 陽性の場合には分離確認が必要)、2) O157, O26, O111 等選択分離培地が有効な O 群については培養法のみによる確認も可能とする、3) リアルタイム PCR/コンベンショナル PCR/LAMP 各法の選択、DNA 調製法は各施設での選択とするとした基本的な方針を策定し、EHEC 感染症検査・診断マニュアル (感染研 HP からダウンロード可能) に記述することで、検査対象者からパブリックコメントを受け付けている。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は、国内では 2011 年から 2019 年まで平均すると 3,800 名余りの感染者が報告されており、Covid-19 パンデミック以降、2020 年は 2011-2019 年の 80.3%、2021 年は同 84.1%、2022 年は同 87.1% の感染者が報告されており、Covid-19 によって大きな影響を受けなかった感染症の一つである。これまでの研

究から、同一の EHEC 感染患者から、長期間かつ複数回にわたって同一血清型の EHEC が分離される事例が存在することが判明している。そこで本研究では、EHEC 保菌に関する因子を明らかにする目的で、同菌集団感染事例におけるメタゲノム解析を行った。加えて、EHEC の陰性確認を実施している全国の地方衛生研究所または保健所の細菌検査担当者へのアンケート調査を実施し、陰性確認手法

の詳細、特に PCR 等の遺伝子検査の実施段階について把握すると共に、陰性確認手法の標準化（プロトコール化）を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

1. EHEC O103 集団感染事例サンプルのメタゲノム解析

2019 年に保育園で発生した集団感染事例について、17 名分（O103 分離サンプル 7 検体および非分離サンプル 10 検体）の便サンプルから DNA を抽出し、QIAseq FX DNA Library Kit を用いてライブラリー調整後、HiSeqX (illumina) によってペアエンドシーケンシング（150-mer×2）を行った。得られたショートリードデータを、kraken2 を用いて解析し、菌属レベルの存在比を推定した。

2. アンケート調査に基づく陰性確認手法に関する基本方針の策定

昨年度実施したアンケート調査を基に、陰性確認手法に関する基本的な方針策定を行った。策定にあたってはアンケート調査以外に、全国の地衛研・保健所の検査担当者を対象にした第 42 回衛生微生物協議会・レファレンス会議・大腸菌（2022 年 6 月オンライン開催）および第 34 回地衛研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会（2023 年 2 月）でのプレゼンテーションを通じて意見を聴取した。

C. 研究結果

1. EHEC O103 集団感染事例サンプルのメタゲノム解析

同定された菌属では、O103 分離および非分離のサンプルいずれにおいても

Bifidobacterium および *Bacteroides* の頻度が高かった。*Escherichia* 属については、O103 分離サンプルの平均は 1.5%、非分離サンプルの平均は 1.3%であり、有意な差は認められなかった。一方、有意な差は認められないものの、O103 陰性サンプルでは *Megamonas*、*Lachnospira*、*Citrobacter* 属菌、O103 陽性サンプルでは *Haemophilus*、*Enterobacter*、*Veillonella* 属菌等が多く存在していた。

2. 陰性確認手法の基本方針の策定

昨年度実施したアンケート調査から、ほとんどの地方衛研・保健所で PCR 法または LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法を実施していることから、基本的には、検査時間短縮のために PCR 法または LAMP 法による陰性確認法を実施可能とし、1) PCR の結果は陰性確認に限定する（ただし、PCR 陽性の場合には死菌をカウントしている可能性があるため、コロニースweep PCR [選択分離培地上に生育したコロニーをひとまとめにして鋳型 DNA を作製して実施する PCR] 分離確認が必要であるとした）、2) EHEC の主要 O 群のうち、全体の 70-80%を占める O157、O26、O111 等選択分離培地（例えば O157 であればソルビトール含マッコンキー寒天平板）が有効な O 群については培養法のみによる確認も可能とする、3) リアルタイム PCR/コンベンショナル PCR/LAMP 各法の選択や DNA 調製法は各施設での選択とするとした基本的な方針を策定した。

なお、陰性確認を実施する場合、先行して分離されている EHEC 株が存在するはずであり、先行分離株の性状を見極めて

陰性検査を行う必要性があると考えられるが、この点については考察の項で詳しく述べる。

以上のポイントについて、感染研ホームページからダウンロード可能なEHEC検査・診断マニュアル（2022年10月版）として改訂し、検査担当者から広くパブリックコメントを求めた。URLについては以下の通りである。

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20221006.pdf>

D. 考察

EHEC O103 集団感染事例のメタゲノム解析では EHEC 陽性および陰性事例間の菌叢比較を行った。その結果、陰性サンプルにおいてビフィドバクテリア属菌が多いことなどが明らかになった。この結果は、EHEC O26 患者便においてビフィドバクテリウム目菌が比較的少なかったという先行研究と一致する。しかし、有意な差ではなかったため、より多数の事例における知見の集積が必要である。また、EHEC 陽性または陽性サンプルで頻度の高い菌属も複数見出された。今後、種レベルでの解析等も行い、両サンプル間での差をより詳細に明らかにする必要がある。EHEC の陰性確認方法について基本方針の策定を行った。陰性確認にあたっては、先行して分離されている EHEC 株の血清型や遺伝子型、生化学的性状を見極めて適切な陰性確認方法が求められる。一方で、全国の地衛研・保健所での検査担当者からの意見として、陰性確認を実施する現場では必ずしも先方分離株の情報が十分でない場合が多く、血清型や遺伝子型、

生化学的性状に関わらず検査を開始しなければならない現状のあることが明らかとなった。現時点では PCR 法および LAMP 法共に、検出遺伝子は志賀毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*) を対象にしている。*stx1* は 3 種類、*stx2* は少なくとも 7 種類のサブタイプが存在する。PCR 法によるこれら *stx* サブタイプの検出感度については既に検証済みであるが、LAMP 法による検出感度については精査が必要である。今後、*stx* 以外の遺伝子を検出対象として陰性確認が可能かどうかを含め、さらなる検証が必要であると考えられる。

E. 結論

1) メタゲノム解析の結果、EHEC 陽性または陰性サンプル間で菌叢が異なっていたものの、有意な差は認められなかった。継続して知見を集積することで、両サンプル間の違いをより詳細に明らかにすることができると考えられる。

2) EHEC 陰性確認法の基本方針の策定検査時間短縮のために PCR 法または LAMP 法による陰性確認法を実施可能とし、①PCR の結果は陰性確認に限定する（PCR 陽性の場合は分離確認が必要）、② O157, O26, O111 等選択分離培地が有効な O 群については培養法のみによる確認も可能とする、③リアルタイム PCR/コンベンショナル PCR/LAMP 各法の選択、DNA 調製法は各施設での選択とするとした基本方針を策定し、EHEC 感染症検査・診断マニュアル（感染研 HP からダウンロード可能）に記述した。

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

なし

3. その他

腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断
マニュアル改訂（2022年10月版）

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20221006.pdf>

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