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
「ロングリードシークエンサーによる集団感染調査手法の確立」
（23KA3005）
研究総括報告書

研究代表者　李　謙一（国立感染症研究所　細菌第一部）

研究要旨

オックスフォード・ナノポア社のロングリードシークエンサーを用いた集団感染調査手法を確立するため、腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic Escherichia coli : EHEC）を対象として、SNP 解析パイプラインを構築した。既存パイプラインの評価では偽陽性 SNP が多数認められたため、新規の SNP 抽出プログラムを開発し、その性能を評価した。その結果、ショートリードおよびロングリードデータ間での差異がごく小さいパイプラインを構築することができた。

研究分担者
李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

A. 研究目的

病原体のサーベイランスにおける分子型別において、近年全ゲノム配列（whole-genome sequence : WGS）解析法が主流になりつつある。アメリカ合衆国 CDC においても腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic Escherichia coli: EHEC）等の食中毒菌のサーベイランスに用いる分子型別手法は、2019 年からパルスフィールドゲル電気泳動法から WGS 解析に移行している。日本においては、COVID-19 によるパンデミックによる影響で全国の地方自治体に次世代シークエンサー（next generation sequencer: NGS）が配備されたものの、病原細菌における活用例は未だ少ない。その理由としては、WGS 解読後の情報解析が複雑で、難易度が高いことが挙げられる。

WGS の情報解析については、イルミナをはじめとするショートリード型 NGS に対応したプログラムは多数利用可能である。しかし、Oxford Nanopore 社のロングリード型 NGS から得られるデータを用いたプログラムは少ない。また、集団感染調査の際には、供試菌株が同一株であるかの判断を、コアゲノム単一塩基多型（core genome single nucleotide polymorphism, cgSNP）の数をもとに行うのが一般的である。ショートリード型データを用いた際の、同一由来と判断するための基準は多数の菌種で報告されているが、ロングリード型データを用いても同様の判断ができるか、体系的に検討した報告は少ない。

そこで本研究では、EHEC を材料に、疫学関連が既知の株について体系的な WGS 解読後、cgSNP 解析を行うこと

で、ロングリード型 NGS を用いた集団感染調査の判断基準の検討を行う。また、解析プログラムを構築し、地方自治体等への配布を目指す。今年度は、解析パイプラインのアップデートおよび評価を行った。

B. 研究方法

分担研究報告書に記載。

C. 研究結果

Clair3 等の既存の SNP 解析パイプラインでの検討を行った結果、多数の偽陽性 SNP が認められた。そのため、ショートリード用解析プログラムである BactSNP を参考にしたアラインメントによる SNP 抽出プログラムを作製した。本パイプラインでショートリードおよびロングリードによる SNP 解析結果を比較したところ、93 株中 82 株（88.2%）で両者の差異がゼロとなった

D. 考察

本研究により、ショートリードと同等の精度で SNP 解析を実施可能なプログラムを構築した。従来法では、低品質なマッピングによる偽陽性 SNP の出現が避けられないことが明らかとなった。一方、開発したプログラムでは、偽陽性 SNP を低減可能であり、ショートリードデータとの相互比較が可能であった。

E. 結論

オックスフォード・ナノポア社のロングリードシークエンサーは、小規模解析におけるコスト面や迅速性においてショートリードシークエンサーに優位性を有する。地方衛生研究所をはじめとする小規模ラボにおいては今後その活用が拡大すると予想されることから、本プログラムは有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Kubomura A, **Lee K**, Iyoda S, Akeda Y. 2025. Complete genome sequence of three atypical diarrheagenic Escherichia coli O166:H15 strains from foodborne outbreaks. Microbiol Resour Announc 14:e0074625.

2. Ooka T, Arai S, **Lee K**, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J. 2025. Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene, astA, in Escherichia coli. Front Microbiol 16:1635769.

3. Imai Y, Okuno M, Hoshiko Y, Kaneko H, Sato T, Noguchi A, **Lee K**, Yamamoto T, Nakayama-Imaohji H, Kuwahara T, Iyoda S, Ogura Y. 2025. Genomics of Shiga toxin-producing Escherichia coli from asymptomatic carriers in Japan highlights risk-adaptive control. Commun Biol 9.

4. Morita M, **Lee K**, Sugiyama A, Kojima N, Kawai Y, Izumiya H, Akeda Y. 2026. A case of laboratory-acquired Salmonella Typhi infection due to phage typing in Japan: whole-genome sequencing

confirms the source of infection. Access Microbiol 8.

2) 学会発表

1. **李 謙一**, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 明田幸宏. 腸管出血性大腸菌の 大規模集団事例解析にもとづく SNP 解析条件の最適化. 第99回日本細菌学会総会. 広島, 2026.

2. **李 謙一**, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 明田幸宏. SNPcaster: 細菌ゲノム解析パイプライン. 第 46 回日本食品微生物学会学術総会. 川崎、神奈川, 2025.

3. **李 謙一**, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 明田幸宏. SNPcaster: 細菌ゲノムアセンブリ・系統解析パイプライン. 第168回日本獣医学会学術集会. 宮崎, 2025.

4. 原田哲也, 若林友騎, **李 謙一**, 河合高生, 伊豫田 淳**.** 腸管出血性大腸菌 O157 clade 分類のためのリアルタイム PCR 法の確立. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.

5. 小髙優人, 上村直輝, 岩瀬忠行, **李 謙一**, 石嶋 希, 中根大介, 菅井基行, 菅原 庸, 明田幸宏, 伊豫田 淳, EHEC Working Group. 腸管出血性大腸菌における多細胞鎖形成機構の分子遺伝学的解析. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.

6. **李 謙一**, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 久保田寛顕, 木全恵子, 若林友騎, 野本竜平, 柿田徹也,明田幸宏. 細菌ゲノム解析パイプライン(SNPcaster)の開発. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.

7. **李 謙一.** ゲノム解析が切り拓く腸管出血性大腸菌の新たなサーベイランスと高病原性株の特定. 微生物ウィーク2025. 東京, 2025.

8. 岡田由美子, 西田智子, 山本詩織, **李 謙一**, 泉谷秀昌, 西野由香里, 井田美樹, 下島優香子, 都丸亜希子**.** 国内で分離された患者及び食品由来リステリア・モノサイトゲネスの分子疫学的解析. 第98回日本細菌学会総会. 石川, 2025.

9. 石嶋 希, 岩瀬忠行, 児玉年央, **李 謙一**, 大岡唯祐, 後藤義幸, 八尋錦之助, 明田幸宏, 伊豫田 淳**.** HUS患者から分離されたstx2f遺伝子保有E. albertiiの病原性解析. 第98回日本細菌学会総会. 石川, 2025.

10. **李 謙一**, 森田昌知, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 中村佳司, 山岸敏明, 明田幸宏. 細菌ゲノム解析パイプライン(SNPcaster)の開発およびと共有化方法の構築. 第98回日本細菌学会総会. 石川, 2025.

11. 大岡唯祐, 玉村雪乃, 桃木杏奈, **李 謙一**, 平井晋一郎, 伊豫田 淳, 楠本正博, *E. albertii* Working Group**.** 国内で分離された*Escherichia albertii*の進化系統およびゲノム特性. 第27回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2025.

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