

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
令和 5 年度総括研究報告書

「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」

研究代表者	明田幸宏	国立感染症研究所細菌第一部 部長
研究分担者	中村佳司（九州大学大学院医学研究院） 砂川富正（国立感染症研究所実地疫学研究センター） 廣瀬昌平（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部） 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） 大西 真（沖縄県衛生環境研究所 感染症研究センター）	
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） 島袋 梢（国立感染症研究所 細菌第一部） 加納 一彦（国立感染症研究所 品質保証管理部） 土橋 西紀（国立感染症研究所 実地疫学研究センター） 高橋 琢理（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 有馬 雄三（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 高原 理 （国立感染症研究所 感染症疫学センター） 久手堅 剛（沖縄県衛生環境研究所） 平良 遥乃（沖縄県衛生環境研究所） 柿田 徹也（沖縄県衛生環境研究所）	

研究要旨：

食中毒は国民に対して甚大で直接的な影響を及ぼす。そのため食中毒の発生予防や発生した際には迅速な原因究明を実施し、その健康被害の拡大抑止が必要不可欠である。特に腸管出血性大腸菌（EHEC）による食中毒は、その届出数や重症度も相まって日本の食中毒対策として最も警戒が必要となっている。これまで EHEC 感染症の事例調査のため各種の分子型別法が開発・利用されてきた。MLVA 法が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている。本研究では地衛研における MLVA 法運用のさら

なる効率化迅速化を目指した技術導入および精度向上、MLVA 型別データと発生動向を利用した EHEC 食中毒アラート発出システムの構築、その評価を進めてた。また食品や動物由来株を含めたゲノムデータベースの拡充化を進め、さらにゲノムデータを利用した原因究明に利用可能なゲノム解析パイプラインを構築した。今後、その試用を通じて評価および改良を進める。さらに EHEC 感染症の起因菌と食材等感染源の関連性解析および本研究で構築された食中毒アラートシステム及び検査解析スキーム評価のため、他の地域からの食品流通などの影響を受けにくい離島（沖縄県）でのコホートを確立し、それらの解析・評価を進めた。

A. 研究目的

食中毒は国民に対して甚大で直接的な影響を及ぼす。そのため食中毒の発生予防や発生した際には迅速な原因究明を実施し、その健康被害の拡大抑止が必要不可欠である。特に腸管出血性大腸菌（EHEC）による食中毒は、その届出数や重症度も相まって日本の食中毒対策として最も警戒が必要となっている。これまで EHEC 感染症の事例調査のため各種の分子型別法が開発・利用されてきた。MLVA 法が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている。前身の研究班では、本法の活用に重点を置き、地衛研における実施の精度向上のため、その精度管理を進めてきた。また MLVA 法を利用して全国で分離された EHEC 菌株の分子疫学的解析を実施することで個々の事例の関連性について検討を重ね、さらにその情報を利用した注意すべき事例の探知及びアラート発出を試みてきた。また EHEC 血清型によって MLVA 法の解像度が異なることから、海外株や食品・動物由来株を含む様々な EHEC 菌株の全ゲノム配列の取得を行い、MLVA 型別との関連性を評価するとともに、大規模なゲノム情報のデータベース化を進めている。その

結果、EHEC 食中毒の早期探知のための技術基盤が構築されつつあり、それらを利用した実的な運用に着手する段階に来ている。以上より、本研究計画では地衛研における MLVA 法運用のさらなる効率化迅速化を目指した技術導入および精度向上、MLVA 型別データと発生動向を利用した EHEC 食中毒アラート発出システムの構築、その評価を実施する。また世界的には食中毒を含む感染症の分子疫学解析が全ゲノム情報を用いたものとなっており、食品や動物由来株を含めたゲノムデータベースの拡充化を進めることで MLVA 法との優劣性を明らかにし、将来的な運用に資する基盤を構築する。またゲノムデータを利用した原因究明に利用可能なゲノム解析パイプラインを構築し（R5 年度）、その試用を通じて評価および改良を進める。さらに EHEC 感染症の起因菌と食材等感染源の関連性解析および本研究で構築された食中毒アラートシステム及び検査解析スキーム評価のため、他の地域からの食品流通などの影響を受けにくい離島でのコホートを確立し、それらの解析・評価を進める。

B. 研究方法

（ゲノム解析パイプライン構築、評価）

本研究班では、これまでに SNP 解析等の基本的なゲノム解析を半自動的に行う解析パイプラインを構築し、集団感染の検知を行ってきた。一部の自治体へは同プログラムが配布され、実際の集団感染解析に用いられている。しかし、解析環境導入の難易度が高いことが課題であった。そこで本研究では、解析環境を容易に配布・実行可能なプラットフォーム(docker) を利用したゲノム解析環境の実用化を試みる。まず 1、感染研・細菌第一部で行っている解析プログラムの修正および docker 化を行う。また、妥当性評価用のベンチマークデータの整備を行う。次に、開発した環境を 2-4 程度の地方衛生研究所に試験的に導入し、課題の抽出や解析環境の改善を行う。さらに、配布対象自治体をさらに広げるとともに、データベース(Docker Hub)に登録し、国内外の研究者および公衆衛生関係者が利用可能な状態にすることを目指す。本年度は解析フローの設定とそれに使用する各種解析コンポーネントの docker 化を行う。また分担研究者による参照配列設定、SNPs 閾値の設定、検証を実施する。

(ゲノム情報収集、データベース拡充化)
臨床由来 EHEC 株のみならず食品や動物、環境等由来株(他の分担研究分からの菌株、データについても可能な限り含む) について収集を進め、それらの全ゲノムシーケンス情報を取得することで、EHEC 菌株ゲノムデータベースの拡充を継続的に進める。また得られた菌株ゲノム情報については、全ゲノムシーケンスデータと MLVA 型別との比較評価に用いるため、菌株毎で実際に実施された MLVA 型別データあるいは in

silico による MLVA 型別データの紐付けを行う。

本年度は特に研究代表者のグループが収集した、2021 年・2022 年に国内で発生した EHEC 集団感染事例(5 検体以上の事例；分離源のヒトが全て無症状であった事例も含む) の分離株(計 426 株)のうち、226 菌株の WGS 情報を取得した。また、離島コホート研究の過程で収集された、2 つの離島で飼育されている牛から分離された病原大腸菌(EHEC および腸管病原性大腸菌(EPEC))および大腸菌群スクリーニング用の培地(XM-G 培地)あるいは主要 EHEC の推定鑑別培地(CHROMagar STEC)から釣菌した細菌の WGS 情報を取得した。

(MLVA 法の精度管理)

前身の研究班で実施された MLVA 法の精度管理において、明らかとなった精度管理プロトコールの問題点を整理し、MLVA 法におけるトラブルシューティング事例集、内部精度管理手法を作成する。これらを用いて地方自治体を対象とした研修会等を通じて普及させ改善し、改良型 MLVA 精度管理手法の確立を進める。また MLVA 法と全ゲノムシーケンスデータを用いた疫学解析手法の比較検討を他の分担課題で拡充化されるデータベースを利用して実施し、それぞれの手法の適応範囲や迅速性等の詳細な性能について明らかにする。

本年度は特に MLVA 法の精度管理試験の参加施設の選定を拡充して行い、菌株検体を送付、その試験の結果について評価を加えた。また、不正解例に対する原因究明を行い、トラブルシューティング集の作成をおこなった。

(食品関連サンプル由来 EHEC 株の収集、解析)

食品をターゲットとした EHEC 菌株の分離は、その分離率が低いため、対象を食品食材そのものに限らず、それらが生産される場の周辺環境等にも広げ EHEC 菌株の分離を進める。また食品食材以外のサンプルからの EHEC 分離の効率化を図るため、そのプロトコールについても検討し最適化を図る。得られた菌株については、MLVA 型別及び全ゲノムシーケンスを実施し、臨床分離株との関連性を評価する。

本年度は国内食肉処理施設より提供されたウシ糞便から EHEC 菌株を分離し、その性状、遺伝子型別を実施した。

(離島コホート研究)

EHEC 感染症、食中毒事例の原因となる EHEC 菌株の原因食材等の究明は、EHEC 感染症発症に必要な菌数が非常に少ないことから探索が困難であり、EHEC 菌株の分離を伴う感染源の同定や、発症と原因食材等感染源との関係性など、明確な理解に至っていない。そこで本分担研究では、沖縄県内の離島をフィールドとして離島コホート研究を実施する。検体や分離株は、ヒト、動物、環境サンプル等を対象としていわゆる EHEC におけるワンヘルスサーベイランスを実施する。得られた菌株については MLVA 型別、全ゲノムシーケンスを実施することで分離元情報とともにその分子疫学的関連性について評価する。また離島コホートにおける検出数などにもよるが、本研究班の他の分担研究課題で提案されるゲノム解析パイプライン、プロトコール等についてもパイ

ロット的に利用することでその運用性についても評価を進める。

本年度は沖縄県で 2006 年から 2022 年に報告された EHEC 感染症の疫学情報を利用した市町村毎の事例数推定やウシ飼養数との関連性、ウシ糞便検体からの菌株分離を実施した。

(食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析)

これまで感染症発生動向調査 (NESID) や食中毒報告を元に全国規模の EHEC 感染症・食中毒の広域集発事例の探知に利用可能な手技手法の評価をおこなってきた。その結果、迅速探知システム (アラートシステム) の有用性は確認できたものの局地的な集団発生事例等ではアラート探知感度が低い等、改善すべき点について明らかとなった。そこで本分担研究では、アラート基準となる EHEC 感染症発生ベースラインの改訂、MLVA 型別や全ゲノムシーケンスデータ等の分子疫学的情報とのリンク、アラート発出のさらなる迅速化を進め、最終的に改良型食中毒迅速探知システムを実際に運用し、その評価をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析パイプライン構築、評価

ゲノム解析各解析コンポーネントの ducker 化前の解析パイプラインについて機能の評価や改善を行った。その結果、事前に設定した値 (カバレッジやコンタミネーションの割合等) に対して自動的に QC を行い結果を表示する機能を追加した。また、SNP 解析に関しては、結果の評価に必要なコアゲノムサイズ等を自動的に計算してレポートを

出力する機能を追加した。構築したパイプラインについて、docker コンテナ化を行った。Windows および Linux 環境下でインストールおよび動作確認を行った。通常インストールにはエラー対応を含め数時間を要するが、docker を利用した場合には一時間程度でインストール可能であった。プログラムの実行には、JupyterLab を利用した。JupyterLab は、ウェブブラウザ上で動作するため、OS に関わらず利用可能である。また、ノートブックと呼ばれるファイル内ではコードの編集、実行および結果の表示が可能である。JupyterLab のノートブック上でマニュアルと解析コードを一体化したファイルを作製することで、情報解析初心者でも容易に実行可能な環境が構築された。また並行して、SNPcaster パイプラインの活用法についての以下の通り、検討が行われた。

i) 解析対象の配列に対する参照配列の設定：SNPcaster で行われる SNP 解析には、BactSNP プログラムが採用されている。このプログラムでは、解析したい菌株の WGS をそれぞれ参照配列にアラインメントし、参照配列を含む全ての解析対象株に共通するゲノム領域（コアゲノム配列）に存在する SNPs を抽出する。EHEC 血清型間にはゲノム多様性があることから、解析対象と遺伝的に近縁でない（例えば、異なる血清型の）菌株のゲノム配列を参照配列として設定すると、コアゲノム配列が縮小され、菌株間の SNPs 数が過小評価される可能性がある。本研究で収集した海外 5 事例の EHEC 血清型は 0157（2 事例）あるいは 026（3 事例）であった。0157 の菌株の解析に 026 菌株のゲノムを、026 の菌株の解析に 0157 菌株のゲノムをそれぞれ参照配列とした場合、血清型が一致している場

合と比較して、コアゲノム配列が 0.3~0.4 Mb 縮小され、抽出 SNPs も最大で 3 SNPs 少なくなった。本研究では解析の解像度を最大にするため、解析対象の菌株の血清型と同一の血清型のゲノム（0157 の場合は Sakai 株、026 の場合は 11368 株）を参照配列として、SNP 解析を行なった。

ii) 同一クローンの判定基準となる SNPs 数の閾値の検証：NCBI に登録されている菌株セットの管理 ID (BioProject ID) のうち、イタリアおよびフランスの事例（計 3 事例、全て 026 EHEC）の管理 ID 内には、それぞれ単一事例に由来する EHEC 菌株の WGS データが登録されており、菌株間の最大 SNPs 数はいずれの事例においても 5 SNPs 以下であった。アメリカの 0157 による 2 事例のうち、1 事例 (BioProject ID: PRJNA517910) には、2018 年の大規模集団事例時にウィスコンシン州で分離された菌株の WGS データが登録されており、菌株同士の疫学的関連性が不明であったため、本解析から除外した。残りの 1 事例 (BioProject ID: PRJNA215830) についても、複数の事例に由来する菌株の WGS データが登録されていたが、菌株の疫学情報が論文報告されていた (Turabelidze G, et al. J Clin Microbiol, 2020) ため、菌株同士の疫学的関連性と遺伝的距離（菌株間の SNPs 数）の対応を精査した。その結果、同一感染事例の原因と考えられる菌株同士の遺伝的距離は、1 つの菌株を除いて 5 SNPs 以内であり、例外の 1 株とその他の菌株の遺伝的距離は 11~12 SNPs であった。また、互いに疫学的関連性のない菌株同士の遺伝的距離は 13 SNPs よりも大きくなることが分かった。これらの結果は、海外の EHEC 集団感染事例において、5 SNPs が同一クローン判定のひ

とつの基準となることを示唆している。

2. ゲノム情報収集、データベース拡充化
研究班内で取得された菌株などを利用してゲノム情報を取得した。計 226 の臨床由来 EHEC 菌株に関して、平均 740 Mb (387~1,368 Mb) のショートリード配列を取得した。代表的な EHEC 菌株である 0157 Sakai 株ゲノムの全長 (5.6 Mb) に対し、平均 132x カバレッジ (69x~244x) のデータ量であったことから、WGS 解析に十分なデータ量がいずれの菌株においても取得されていると考えられた。離島コホート研究から分離された計 155 の牛由来の菌株に関して、平均 806 Mb (560~1,225 Mb) のショートリード配列を取得した。ショートリード配列をアセンブルして得たドラフトゲノム配列のうち、8 つについては複数の菌株のゲノム配列が含まれていると判断した。残りの 147 株のうち、XM-G 培地で分離された菌株は 122 株含まれており、そのうち 119 株が大腸菌であることが WGS を用いた解析から推定された。CHROMagar で分離された 9 菌株は全て大腸菌であり、そのうち 2 株は eae 遺伝子陽性であった。離島コホート研究を担当する研究者が事前に行なった PCR 解析 (stx, eae, および EHEC 主要 O 血清群) により、EHEC あるいは EPEC であると推定された 16 菌株のうち、15 株は stx と eae 遺伝子のどちらか、あるいは両方が陽性であった。残りの 1 株の血清型は 0121:H11 であり、O 血清型は EHEC 主要血清型のひとつである 0121:H19 と共通するが、H 血清型は異なっていた。

また MLVA 型別とそのデータ蓄積において 3308 株について分子型別解析を実施した。このうち 2923 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 94 施設であった。各血清群において同定された型数は、0157 が 862、026 が 148、0111 が 72、0103 が 62、0121 が 16、0145 が 12、0165 が 3、091 が 38 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、48 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 1500 株であった。2023 年度は 55 施設から約 1500 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 89% であった。

3. MLVA 法の精度管理

全国の地衛研を対象に MLVA 法の精度管理試験の参加依頼をしたところ、国立感染症研究所から 1 日に発送できる菌株検体数を超える申し込みがあった。そこで、過去試験に未参加の施設や本法の導入歴が少ない施設を中心に 21 施設を参加施設として選んだ。試験の結果、全体的に高い検査精度にあったが、2 施設が回答を誤った。2 施設に検査工程を照会したところ、解析ファイルの Bin 設定が適切でなかったこと、及びタンデムリピート (TR) 領域の増幅ピークに釣られて立ち上がったノイズを TR と判定したこと等、基本的な工程を正しくできていなかった。次に、過去の精度管理試験で得られた電気泳動データを収集し、機器や試薬の情報を基に分析したところ、非典型的ピークの発生を抑えるには、特異性が高い Master mix の使用が有効と分かった。最後に、これまでの精度管理試

験で把握した情報を基にトラブルシューティング集を作成した。

4. 食品関連サンプル由来 EHEC 株の収集、解析

牛糞便由来株36株は、すべて *stx* および *eae* 陽性であり、血清型は O157:H7 が 33 株、O26:H11 が 2 株、O111:HUT が 1 株であった。MLVA 型は、EHEC O157 が 18 種類 (13m0154、13m0177、13m0662、13m0694、15m0180、16m0206、16m0516、17m0097、17m0134、17m0320、17m0512、18m0297、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629、20m0450 および 21m0465)、EHEC O26 が 2 種類 (17m2226 および 21m2145)、EHEC O111 が 1 種類 (16m3038) に分類された。EHEC O157 の MLVA 型 18 種類のうち、7 種類 (16m0516、17m0512、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629 および 21m0465) は本課題で新規に報告された型であり、残りの 11 種類は過去に報告された型と同一であった。EHEC O26 の MLVA 型 2 種類 および EHEC O111 の MLVA 型 1 種類は、本課題で新規に報告された型であった。13m0177、15m0180 および 18m0616 は、異なる月にまたがって 2 回以上分離された。また、EHEC O157 および EHEC O26 全株は運動性を示したが、EHEC O111 は運動性を示さなかった。また分離された菌株の保有する *Stx* サブタイプのパターンは、EHEC O157 では *stx2a* 単独、*stx2c* 単独、*stx1a* および *stx2c* ならびに *stx1a* および *stx2a* の 4 種類、EHEC O26 では *stx1a* 単独の 1 種類、EHEC O111 で *stx1a* および *stx2a* の 1 種類であった。

5. 離島コホート研究

(EHEC 感染症の発生頻度の市町村比較)

2006 年から 2022 年の期間において、439 例

の報告があった。散发例を含む事例数としては 270 事例であり、沖縄県の人口 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は 1.76 であった。沖縄県 41 市町村ごとの 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は、0–9.1 の範囲でばらつきが多かった。人口 4000 人未満の 12 町村では解析期間において報告はみられなかった。人口 4000 人以上の 29 市町村の 10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数は、中央値 0.58 (平均 1.29) であり、10 万あたり年あたり EHEC 感染症事例数が 1 未満の市町村が 29 のうち 22 存在した。平均値以上の値を示す市町村は 5 市町村と限定的であった。これら 5 市町村はいずれも、沖縄島とは異なる離島に存在する市町村であった。

(ウシ飼養数・飼養戸数の市町村比較)

人口 2000 人以上の各市町村の人口 1000 人あたりウシ飼養数およびウシ飼養戸数と EHEC 感染症事例数 (人・年あたり) の関連を図 2 に示した。EHEC 感染症事例数が平均値以上の値を示す 5 市町村は、A 市を除いて EHEC 事例数の多い順に、人口あたりウシ飼養頭数が多かった。一方で、A 市も含めた 5 市町村は、ウシ飼養農家の人口あたりの戸数は多かった。

(A 市および B 市で飼養されるウシの EHEC 保有率)

ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いた増菌培養液から DNA を抽出し、ベロ毒素検出リアルタイム PCR を実施した結果、100 検体中 32 検体で VT 遺伝子が検出された。VT 遺伝子陽性検体から VT 保有菌株の分離を試みた。その結果、13 株の EHEC が分離された。A 市は 50 検体中 6 検体 (12%) が VT 遺伝子陽性、うち 2 検体から

2 株 (4%) の EHEC 株が分離された。B 市は 50 検体中 26 検体 (52%) が VT 遺伝子陽性、うち 11 検体から 11 株 (22%) の EHEC 株が分離された。

O-genotyping についての結果としては、Og157 および Og111 が 3 株分離されたが、10 株は MP1 Plus を用いた PCR ではいずれの O 群陽性シグナルを得ることができず、Og- という判定となった。つまりヒトから分離される EHEC の頻度の高い 7 つの血清群ではないことが示された。

VT1 陽性株が 5 株 (46.2%)、VT2 陽性株が 9 株 (69.2%)、うち両毒素遺伝子陽性株は 1 株であった。eae 遺伝子陽性株は 6 株 (46.2%) 存在した。

ウシ糞便検体は国立感染症研究所 (伊豫田ら) ならびに宮崎大学 (井口ら) に供与し、それぞれ EHEC 分離を試みることで沖縄県衛生環境研究所における分離方法の妥当性を確認した。その結果、沖縄県衛生環境研究所で分離された EHEC13 株のうち、7 株は国立感染症研究所あるいは宮崎大学において分離された。6 株については、沖縄県衛生環境研究所のみで分離された。一方で、国立感染症研究所あるいは宮崎大学で分離された 4 株は沖縄県衛生環境研究所では分離できていなかった。

6. 食中毒アラートシステムの改良と感染源の関連性解析

2019 年から 2023 年までの情報について列挙する。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)、2023 年 (3 回/3 回) であった。2023 年の厚生労働

省への情報提供回数は 3 回で、2022 年と並び 2019 年に次ぐ多さであった。2023 年の EHEC 症例報告数は 2011~2019 年の報告数と同等の水準まで増加していたが、アラート検知回数は 2019 年より少なかった。

2023 年のアラート情報の 1 回については、リアルタイムな監視の状況 (2023 年 33-34 週) として、O157VT2 が東日本で多い等の疫学的な偏りを認めた。2023 年 8 月 22 日の情報提供の内容は以下のとおりである。

- ・全国で診断週 2023 年 33 週から 34 週にかけて、NESID 上では例年を上回る O157VT2 症例数の増加を認め、特に診断・週 34 週にかけては、明らかに O157VT2 に起因するイベント数の増加がみられた (過去平均+2SD 以上となり、またイベント数 20 以上で推移したことからレベル 4 相当)。

- ・O157VT2 症例群は、女性に多いが、年齢層は幅広い。

- ・HUS 症例が発生しており、重症例発生への注意が必要。

- ・O157VT2 症例群は、地理的分布としては東北地方、関東地方などの東日本が多い。

O157VT2 症例群は、喫食歴や地理分布等の情報も併せ、多くの症例が単独の汚染原因によるものであると考えられた。

- ・事例発生時には、迅速かつ丁寧な疫学調査・ゲノム解析がこれまで以上に重要であり、常に広域発生の可能性を念頭に置くと共に、再発予防のためには食材の汚染発生時点まで遡る連携した調査が必要である。

- ・予防的には、これから腸管出血性大腸菌を始めとする食中毒がより増加する時期に入っていくこと、新型コロナウイルスによるパンデミックの状況が落ち着き、人々の手洗い等の衛生に対する関心の低下が起こる可能

性があることから、改めての国民に対する情報提供と注意喚起が必要である。

さらに、2017年に編成した「広域食中毒発生時の疫学調査に関するガイドライン」の更新作業の準備に取り組んだ。

D. 考察

MLVA法により解析した菌株数は昨年より約28%と大幅に増加した。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。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1500株に上った。感染研で行った精度確認では菌株ベースで89%、遺伝子座ベースで98%一致しており、多くの地衛研において技術的な問題が解消されつつあると考えられた。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。

食中毒事例等の集団感染等の調査で WGS 解析を用いる情報解析手法は、正確かつ他機関でも利用・検証可能であることが望ましい。SNP 解析に用いるプログラムは数多く利用可能であるが、標準的な解析手法は現在までに確立されていない。その理由としては、SNP 解析には、参照配列におけるリピート配列の検出、コアゲノムサイズの同定や、組換え領域の検出・除去等の複数の解析過程が存在することが挙げられる。これらについて、一度に行えるプログラムは利用可能でなかった。また、プログラム間の依存関係のために、インストールが困難な場合も存在した。本研究では、生データ (WGS リードデータ) の QC から SNP 解析、系統解析までを行えるプログラムを、単一の docker コンテナに含めること

で、インストール時の課題を解決することができた。今後、地方衛生研究所等に試験的に配布し、評価を行うことで、プログラムおよびマニュアルの改善を行う予定である。

国内分離株の WGS データの収集では、計226の臨床由来 EHEC 菌株について、WGS データを収集することができたため、上述の SNPcaster パイプラインの検証にこのデータを活用するとともに、EHEC データベースのアップデートを行う。離島コホート研究によって牛から分離された EHEC 菌株、特に EHEC 主要血清型ではないが、stx 遺伝子陽性の菌株に関しては、参照配列あるいは landmark となりうると考えられるため、完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備するとともに、分担者が独自に開発した定量系を用いて、Stx の産生量を測定する予定である。牛から分離された non-EHEC 菌株は、EHEC データベースの拡充には直接関連しないが、牛の腸管内で EHEC と共存している可能性があるという点で重要であるため、典型的な EHEC 菌株との系統関係を解析するとともに、離島コホート研究を分担する研究者とともに今後の研究方針を議論していく予定である。

EHEC の菌株検体を用いた MLVA 法の精度管理試験を行ったところ、参加施設は全体として高い検査精度を持っていた。我々が精度管理試験を実施する目的は、検査精度の把握に加えて、不正解があった施設に検査工程の問題点を特定し、改善法を提言することである。前身の研究班で実施した精度管理試験で不正解の検体があった6施設が本試験にも参加したが、これら施設は全検体に正解した。これは我々が実施してきた精度管理試験により、地衛研の検査能力

を向上させられたことを示唆している。一方で、今回の精度管理試験では2施設が1検体以上で不正解だったが、1施設はMLVA法の施設導入年数が2年、参加者の経験年数が1年であり、もう1施設は導入年数も経験年数も0年だった。これは、今後も、MLVA法の地衛研への普及と検査精度向上の必要性を示している。

本研究では、精度管理試験で不正解の検体があった施設に対して改善法を提案できた。施設Aが検体2及び検体3で不正解だった原因はBinファイルの調整不足だったので、細菌第一部が作成したBinの使用を勧めた。施設Aには、TR算出の際の注意点として、TRのサイズは理論上の数値と電気泳動での測定値が異なること、測定値はシーケンサーの機種等の影響を受けることを伝えた。さらに、TR数によってオフセット部分が変化する領域もあるため、各施設でBinファイルを設定する際は、TRが分かっているサンプルを流してBinを調整する必要性も伝えた。今回、施設Aが回答を誤った領域0157-19では、TR数が2-3のBinの間隔(約3 bp)は、他のTR数のBinの間隔(6 bp)より狭いという特徴を持つ。この理由は、TRs = 1または2を持つ菌株は、それ以外のTR数を持つ菌株とオフセット部分が異なるためである。

施設Bが検体3で不正解となった原因は、非典型的ピークをTRと判定したためだったことから、判定のコツを伝えた。具体的には、4種の蛍光標識の波長はPET-NED-VIC-FAMの順に近く、ある蛍光のピークが立った時、波長が近い他の蛍光は釣られて検出され易いことを念頭に置く必要があると説明した。釣られて検出されるピーク解決法として、

シングルPCRによる1領域の電気泳動を行うと当該ピークを防げると伝えた。さらに、血清型によってはほぼ全ての菌株がTRを持たない(つまり、-2)領域もあるので3, 8)、血清型もノイズであるかの判定の役に立つと教えた。検体3の菌株の血清型は0111であり、施設Bはこの検体の領域0157-17のTR数を6と回答したが、一般的に0111はこの領域にTRを持たない。

本研究では、MLVA法の電気泳動データと検査工程の情報を結び付け、非典型的ピークの発生原因を探ったところ、明確な発生原因を見付けられなかったが、幾つかの知見が得られた。最初に、非典型的ピークが発生した施設は全体の約半数だったことから、発生原因は検体固有ではなく、検査工程にあると思われた。また、分析した電気泳動データは、DNA検体を用いた精度管理試験由来であることから、発生要因はPCR以降の過程にもあることが分かった。次に、T社試薬BのMaster Mixを使った施設では、非典型的ピークの発生率が他試薬より低かった。試薬Bは試薬Aの改良版であり、特異性が高いPCRを行える特徴を持つため、非典型的ピークの発生率が低くなったと思われた。さらに、電気泳動にT社機種Dを用いた地衛研は8施設あったが、非典型的ピークは起きていなかった。機種Dは、試薬及びキャピラリーがカートリッジ式であり、利便性が高いと言う利点があるが、その反面、試薬やキャピラリーの種類を変えられない。ポリマーとしてT社機種DではPOP-1が採用されており、それ以外の機種ではPOP-7が使われていた。機種Dのキャピラリーは28 cmであり、それ以外の機種のキャピラリーより短かった。しかし、メーカーのT社が公開している情報では、ポリマーや

キャピラリーの種類と非典型的ピーク発生の因果関係は示されていない。また、機種 D にノイズの検出を抑える機能があるとは示されておらず、機種 D で非典型的ピークが観察されなかった原因は不明である。また、サンガーシーケンサーで電気泳動した際、ピークの高さで PCR 産物の定量はできないが、産物量が多い程、ピークが高くなる傾向にある。PCR 産物の希釈率が 50 倍未満と 100 倍以上との非典型的ピークの発生率には差が無かったことから、当該ピークの検出と希釈率には関係が無いことが示された。なお、本研究班では、EHEC 菌株を用いた精度管理試験を実施したが、原因不明の非典型的ピークの発生は見られなかったため、菌株分離から DNA 抽出まで工程における当該ピークの発生原因は分析できなかった。

MLVA 法の精度管理試験で把握した情報を基に作成したトラブルシューティング集は、地衛研の検査精度の向上に有効だろう。本トラブルシューティング集の共有は、精度管理試験に正解した施設は勿論のこと、試験に未参加の施設にも有益だろう。本試験で不正解となった 2 施設の参加者の経験年数は 1 年以下であり、これは異動による検査技術・知識の承継問題の表れと言える。本トラブルシューティング集は実際の事例を示して、原因や解決法を解説しており、初心者にも分かり易く構成されている。地衛研全体の MLVA 法の検査精度向上のためにも、また、経験年数が少ない担当者への技術・知識伝達のためにも、今後、トラブルシューティング集を用いた研修を行う予定である。

牛糞便由来 EHEC 36 株のうち 0157:H7 が 33 株であったことから、牛糞便に含まれる EHEC は、血清型 0157:H7 が多くを占めるこ

とが示唆された。また、同一 MLVA 型の株が異なる月にまたがって 2 回以上分離されたことから、異なる牛が同一 MLVA 型の EHEC 株に汚染されている可能性が示唆された。さらに、牛糞便由来 EHEC 株が保有する Stx サブタイプは、強力な下痢原性を有する stx1a および stx2a が多かったことから、牛糞便由来 EHEC 株の食中毒リスクは高いと考えられる。加えて、牛糞便由来 EHEC にこれまでの食品由来株や食中毒患者分離株等から報告がなかった 10 種類の新規 MLVA 型の株が含まれていたことから、広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株のみならず牛糞便由来株等の食品生産現場での汚染可能性が示唆される株の MLVA 型およびゲノムデータもデータベースに蓄積していくことが有用であると考えられた。

食中毒アラートシステムの改良においては、2018 年までのデータをベースに広域食中毒アラートの設定を行い、食中毒とは別システムである感染症発生動向調査のレベルで散发事例を広域事例として探知する仕組みを整えた。探知頻度とのバランスを考慮しつつ、より迅速な探知を目指した基準値設定を検討する。疑い事例の早期探知と情報共有により、事例発生時の調査及び介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上大きな貢献が期待出来る。迅速探知により調査開始を早めることで、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調整についても検討する。2023 年度はアラートの頻度は増加し、COVID-19 パンデミックの影響が低下してきた状況を示唆する。公衆衛生対応に有用なアラートの発出について検討していく、それらをガイドラインに含めていく。

更なる狙いであった汚染源の調査には至らなかったが、引き続き対応を強化していく。

E. 結論

コロナ禍において報告数の減少がみられた EHEC 感染症を含む食中毒、食品由来感染症もコロナ収束とともに増加へ転じている。EHEC 菌株の解析精緻化、迅速化が原因究明の要となることから、本研究で開発、改良している解析パイプラインや現行型別法である MLVA 法の精度管理をすすめると共に、これまで以上に幅広い対象物より EHEC 菌株を分離し、その遺伝学的性状を明らかにすることは、迅速な食中毒アラートの発出に有用であることは自明であり、さらに研究開発を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. Lee K., Iguchi A., Terano C., Hataya H., Isobe J., Seto K., Ishijima N., Akeda Y., Ohnishi M., and Iyoda S. Combined usage of serodiagnosis and O antigen typing to isolate Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O76:H7 from a hemolytic uremic syndrome case and genomic insights from the isolate. 2024. Microbiology spectrum 12:e0235523.
2. 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏：2022 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 44 巻、72-73、2023 年 5 月
3. Kakita T, Lee K, Morita M, Okuno M, Kyan H, Okano S, Maeshiro N, Ishizu M,

Kudeken T, Taira H, Teruya M, Ogura Y, Akeda Y, Ohnishi M, Isolation and whole-genome sequencing analysis of *Escherichia fergusonii* harboring a heat-labile enterotoxin gene from retail chicken meat in Okinawa, Japan. Microbiol Immunol 2024, 68 115-121. Epub 2024 Jan 20.

2) 学会発表等

1. 李 謙一. 病原細菌における全ゲノム配列解析の基礎. 衛生微生物技術協議会第 43 回研究会. 岐阜, 2023.
2. 李 謙一. EHEC における WGS 解析. 令和 5 年度 北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者研修会. 岩手県、2024.
3. 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（2022 年）。第 44 回日本食品微生物学会学術総会、2023 年 9 月、大阪府堺市。
4. 泉谷秀昌：2023 年 EHEC の状況まとめ。令和 5 年度北海道東北新潟ブロック 腸管出血性大腸菌検査担当者研修会、2024 年 1 月、岩手県盛岡市。
5. 沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真 第 52 回沖縄県獣医学会（2023 年 7 月）
6. 沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮

城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真、令和5年度獣医学術九州地区学会（2023年9月）

7. 柿田徹也、李謙一、森田昌知、奥野未来、喜屋武向子、岡野祥、眞栄城徳之、石津桃子、久手堅剛、平良遥乃、照屋盛実、小椋義俊、大西真沖縄県産鶏肉における易熱性エンテロトキシン保有 *Escherichia fergusonii* 汚染実態及びゲノム解析、第44回日本食品微生物学会学術総会（2023年9月）

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

3. その他

なし