

網羅的ゲノム解析法等を用いた健康危害微生物の検出・解析に関する研究

千葉 隆司^{e, g}, 長島 真美^d, 久保田 寛頭^b, 小林 真紀子^c, 小西 典子^c,
上原 さとみ^c, 草深 明子^b, 根岸 あかね^a, 熊谷 遼太^a, 北村 有里恵^a,
林 志直^a, 長谷川 道弥^a, 森 功次^a, 吉田 勲^b, 内田 悠太^e, 鈴木 愛^a,
宗村 佳子^e, 永野 美由紀^a, 小田 真悠子^f, 浅倉 弘幸^a, 藤原 卓士^a,
奥野 ルミ^b, 三宅 啓文^a, 内谷 友美^b, 安中 めぐみ^b, 柴崎 澄枝^g, 高野 弘紀^g,
有吉 司^b, 水戸部 森歌^b, 長谷川 乃映瑠^b, 村田 理恵^b, 神門 幸大^b,
小林 甲斐^b, 横山 敬子^c, 鈴木 康規^g, 加藤 玲^c, 井田 美樹^c, 村上 昂^c,
樋口 容子^c, 原田 幸子^a, 河村 真保^c, 山梨 敬子^c, 小野 明日香^c, 尾畑 浩魁^c,
畠山 薫^c, 門間 千枝^c, 赤瀬 悟^c, 前田 雅子^c, 齊木 大^c, 高橋 由美^c,
吉原 祥子^g, 平井 昭彦^g, 下島 優香子^g, 福井 理恵^c, 森田 加奈^g,
西野 由香里^c, 鈴木 淳^a, 南須原 亮^e, 小池 浩二^e, 灘岡 陽子^e, 石川 貴敏^h,
吉田 敦^c, 貞升 健志^d

2018～2020年度に実施した重点研究「網羅的ゲノム解析法等を用いた健康危害微生物の検出・解析に関する研究」の概要について報告する。本研究では、東京都内での国際的マスギャザリング（MG）の開催を踏まえ、都で発生する微生物危害の発生や拡大を防ぐ目的で、様々な病原体を網羅的に検知するゲノム解析等を駆使した新たな微生物検出方法の検討・開発について、6つの個別課題の中で行った。主な成果として、次世代シーケンサーを用いた検討では、ウイルス分野での検査・解析方法の最適化、侵襲性インフルエンザ菌や多剤耐性菌に関連した解析、結核菌の分子疫学解析手法の検討、毒素産生ウルセランス菌や*Staphylococcus* 属菌の新規毒素の解析を行った。また、腸管出血性大腸菌の検査・解析法検討では、新規の遺伝子解析手法であるMLVA法を行政検査へ導入するとともに、市販診断用血清で型別ができない菌株を対象にPCR法を用いた型別法の利用を検討した。さらに、質量分析計の利用では、食品製造のリスク管理手法やヒスタミン生成菌・カビ毒産生株の確認試験法の開発・改良等、質量分析計のライブラリー拡充による同定精度の向上を行った。これらに加え、疫学部門との協調による新型コロナウイルス検査へのゲノム情報の応用や大規模MGの開催に向けたサーベイランス強化方法を検討し、都内で発生した新型コロナウイルス感染症の拡大防止へ実応用した。

キーワード：網羅的ゲノム解析，質量分析計，マスギャザリング，次世代シーケンス，微生物毒素，腸管出血性大腸菌，感染症サーベイランス

はじめに

現在、世界各地のヒト・モノ・情報は、様々な形のネットワークの中で迅速に共有化・伝達されている。一方、このような状況を微生物による健康危害の面からみると、各地域レベルではイベント等によりヒトが集団を形成するマスギャザリング（MG）が危害の発生を増大させ、また、地域で発生した危害は発達した交通機関等により短期間で広範囲に広がる可能性がある。

このような状況を踏まえれば、日常的に人流・物流が

大きく動く東京都は、微生物による健康危害について大きなリスクを内在している。加えて、2019年から2020年にかけ、国際的大規模MGであるラグビーWCと東京オリパラ（実際は、2021年に延期）の開催も控えており、都をハブとした国内未探知の病原体による感染拡大の可能性が否定できない状況にあった。実際、2019年末に発生した新型コロナウイルス感染症は、2020年初頭から各地で集団感染（クラスター）を形成しながら瞬く間に世界へ拡大し、現在に至っている。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^d 東京都健康安全研究センター微生物部

^e 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

^f 東京都健康安全研究センター精度管理室

^g 当時：東京都健康安全研究センター微生物部

^h 当時：東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

このような状況を踏まえ、本研究では東京都での微生物危害の発生や拡大を防ぐ目的で、以下に示した6つの個別研究課題の中で様々な病原体を網羅的に検知するゲノム解析等を駆使し、新たな微生物検出方法の検討・開発を行った。また、研究で得られた成果の一部は、迅速に行政検査へ応用・活用した。

1. 病原体検索とウイルス解析における次世代シーケンサーの利用に関する研究（長島真美）
2. ゲノム情報に基づいた細菌感染症の分子疫学解析（久保田寛顕）
3. 食中毒及び感染症を引き起こす細菌の病原性因子の探索に関する研究（小林真紀子）
4. 腸管出血性大腸菌の分子疫学解析・データベース化及び病原性に関する研究（小西典子）
5. 質量分析計を用いた細菌及び真菌の同定・解析法に関する研究（上原さとみ）
6. マスギャザリングにおける感染症サーベイランス強化に向けた研究（草深明子）

個別研究課題の内容と成果

1. 病原体検索とウイルス解析における次世代シーケンサーの利用に関する研究

感染症や食中毒の病原体検査では、従来からの分離培養法に加えて病原体に特異的な遺伝子を検出する「遺伝子検査法」があわせて用いられる。特に、高感度で迅速性が高いリアルタイムPCR法などの遺伝子検査は、中東呼吸器症候群や鳥インフルエンザ等のウイルス性感染症の緊急検査対応（東京感染症アラート等）で汎用されている。その一方で、特異性が高い遺伝子検査法は検出対象となる病原体の適用範囲が狭くなる。結果として、症状や疾患名から類推される検査法で病原体遺伝子が検出できないような「不明疾患の診断」を目的とした場合、原因となった病原体の特定が困難になる場合も散見される。

このような課題の解決方法として、近年、ゲノム解析技術の向上により、次世代シーケンサー（NGS）を用いた病原体の網羅的な検索が利用されるようになってきている。本研究では、NGSによる網羅的ゲノム解析法を用いた新たな病原体検索方法の構築や、当センターでのウイルスゲノム解析法における利用法の検討を目的とした。

1) 既知量の病原体を含んだ試料を用いた検討

NGS解析方法の構築を行うにあたり、検体種の適用範囲を確認するために、各種の比較検討を行った。試料は、既存の遺伝子検査（リアルタイムPCR/PCR）で病原ウイルスが検出された臨床検体と培養上清とし、これらの試料から抽出した核酸を用いた。

リアルタイムPCR法（キャプシド領域）でノロウイルスが検出され、Ct値が16.3～27.2であった糞便21件についてNGS解析を実施したところ、20件については3,000～7,000bpの塩基情報が得られたが、Ct値27.2（RNA抽出液

：概ね 10^5 copy/ μ L程度）の検体では解析ができなかった。また、20件のうちの3件は国内の食中毒事例では検出されていなかったリコンビナントのノロウイルスであることが判明した（GII.P12-GII.4_Sydney2014）。

ヘマグルチニン領域のリアルタイムPCR法でインフルエンザウイルスが検出され、Ct値が17.3～22.8であった咽頭ぬぐい3件についてNGSを実施したところ、2件は解析ができず、Ct値17.3の検体のみ8分節中5分節（PA, HA, NP, NA, NS1領域）の塩基配列を得ることができた。

HIV-1遺伝子量が 2.59×10^5 copy/mL及び 3.62×10^5 copy/mLの血清並びに 5.06×10^3 copy/mL及び 1.03×10^4 copy/mLの髄液についてNGSを実施したところ、いずれの検体も解析ができなかった。

東京都内で初めて重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）が検出された血清から細胞培養法によりウイルス分離したSFTSVについてNGSを実施した。ほぼ全領域の塩基配列を取得でき、系統樹解析の結果、S鎖、M鎖、L鎖の3分節すべての領域でJ1タイプであることが確認された。

以上の結果より、培養上清などウイルス量が多いものほどNGS解析に適していると考えられるが、ウイルス量が多くても臨床検体から抽出した遺伝子を直接供するとNGS解析が難しい場合があり、検体の種類やウイルスの性質等による影響が示唆された。

2) 病原体が検出されなかった事例での有用性

現在、感染症病原体検査で使用する遺伝子検査は、病原体ごとに特異性の高い検査法を用いている。この際、検査項目は症状や臨床診断名から類推して設定するが、特徴的な症状や明確な流行がない場合などにおいては、必ずしも目的の病原体が検出できるとは限らない。一方、NGSを用いた解析は、細菌・ウイルス等の種別を問わず複数の病原体を網羅的に解析ができるとされる。そこで、既存の検査方法で陰性となった事例についてNGS解析を試みた。

インフルエンザ様疾患で搬入され、インフルエンザウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスのいずれも検出されなかった咽頭ぬぐい3件についてNGS解析を実施した。その結果、いずれの検体からもウイルスは検出されず、*Streptococcus pneumoniae* が1検体から検出された。また、食中毒事例で搬入され、細菌もウイルスも検出されなかった糞便24件についてNGS解析を実施したところ、いずれの検体からも食中毒への関与をうかがわせる病原体は検出されなかった。

以上の結果から、現段階では原因不明の感染症における病原体検索について、NGS解析のみで対応することは困難であると考えられた。

3) 環境水検査での有用性

ヒト由来サンプル以外の試料におけるNGS解析の適用範囲を確認するため、下水処理場で採取した「環境水」を

対象に、既存の遺伝子検査法（nested PCR法）との比較検討を試みた。

環境水の直接処理による遺伝子検査では、6検体を対象にnested PCR法で検査を行い、コクサッキーウイルスA9型、アデノウイルス41型が検出された。一方、NGS解析ではこれらのウイルスは検出されず、特定の病原体検出のみを考えた場合、NGS解析の感度はnested PCR法よりも低いことが示唆された。

また、環境水をウイルス分離試験に供し、そこで得られた試料（培養上清）についても同様の比較検討を行った。細胞変性効果がみられ、培養上清中にウイルスが存在すると予測された培養上清を用いた検討の結果、nested PCR法では検出が難しいウイルスが存在している場合や同じ種類のウイルスが複数存在している場合など、同定が困難な場合があった。一方、NGS解析では、レオウイルスやアデノウイルス79型、複数のエンテロウイルス（エコーウイルス3型とエコーウイルス11型）など、既存の遺伝子検査では検出が難しいウイルスの同定が可能であった。

4) 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を対象としたNGS解析

2020年1月以降、流行が続く新型コロナウイルス感染症の原因ウイルス（SARS-CoV-2）について、都内で検出された同ウイルスのRNA及びウイルス分離株を対象にしたNGS解析を行った。

(1) SARS-CoV-2 RNAを用いた解析 咽頭ぬぐい液から抽出したSARS-CoV-2 RNA 3検体についてNGS解析を行ったが、いずれも全長解析はできなかった。培養細胞を用いてウイルス分離試験を行ったところ3検体中1検体でウイルスが分離でき（TKYE6182_2020）、NGS解析により、全ゲノムである29,903塩基の配列が取得できた。この配列について、標準株（Wuhan-Hu-1）や同時期に国内で検出されたデータベース登録5株と比較したところ、Wuhan-Hu-1とは3塩基、国内株とは1～8塩基異なっていた。その後、継続的に同様の解析を実施し、約180株（2021年6月末時点）のウイルス分離及びNGS解析を行い、得られたゲノムデータを公共データベースへ登録した。

(2) PCR産物を用いた解析 SARS-CoV-2遺伝子の全長を98個のパーツに分けて増幅し、それぞれの断片の塩基配列をNGSで読み取り、得られたデータを再構築して全長配列を取得する方法を試みた。その結果、解析においては供する試料のRNA量が重要であり、その基準として、元のRNA量がCt値で30未満であれば全長の解析がほぼ可能であることが判明した。この検討で得た結果を基に、当センターで実施分と国立感染症研究所に送付分を合わせて821株（2021年3月末時点）を解析し、ゲノムデータの登録を行った。

(3) 下水試料を用いた解析 2020年7月以降、3回にわたり、都内の水再生センターで採水された環境水（流入水

42、放流水36）について、リアルタイムPCR法によりSARS-CoV-2の検出を試みたところ、流入水15ポイントからSARS-CoV-2遺伝子が検出された。しかし、検出された遺伝子から概算したウイルス量は極めて微量（500-1000 copies/L）であったため、当該ウイルスを分離することができず、NGSでの解析も不能であった。

発表実績

- 1) 浅倉 弘幸, 宗村 佳子, 永野 美由紀, 他：東京都内で発生したノロウイルスGII.P12-GII.4 Sydney_2012による食中毒事例について、日本食品微生物学会学術総会, 2018.
- 2) 永野 美由紀, 浅倉 弘幸, 宗村 佳子, 他：東京都内で発生したノロウイルスGII.P12-GII.4 Sydney_2012による食中毒事例について、第33回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2018.
- 3) 永野 美由紀, 宗村 佳子, 浅倉 弘幸, 他：都内で発生したノロウイルスGII.P12-GII.4 Sydney_2012による食中毒事例について、病原微生物検出情報, 39(8), 146-147, 2018.
- 4) 熊谷遼太, 長島真美, 根岸あかね, 他：アレル特異的RT-PCR法によるパロキサビル マルボキシル耐性インフルエンザウイルス検出法の検討、第60回日本臨床ウイルス学会, 2019.
- 5) 熊谷 遼太, 長島 真美, 根岸 あかね, 他：東京都におけるパロキサビル耐性変異インフルエンザウイルスの検出、第34回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2019.
- 6) 河上麻美代, 熊谷 遼太, 吉田 勲, 他：東京都内で検出された重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）の遺伝学的解析、第34回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2020.
- 7) Nagashima M, Kumagai R, Yoshida I, *et al.*: Characteristics of SARS-CoV-2 Isolated from Asymptomatic Carriers in Tokyo, Jpn. J. Infect. Dis., 73, 320-322, 2020.
- 8) 長島真美、熊谷遼太、林志直, 他：不明呼吸器感染症におけるFilmArray呼吸器パネルの有用性の検討、第61回日本臨床ウイルス学会, 2020.
- 9) 長島真美、熊谷遼太、貞升健志、他：東京都内で分離された新型コロナウイルス（SARS-CoV2）の解析、第61回日本臨床ウイルス学会, 2020.
- 10) 浅倉弘幸、長島真美、熊谷遼太、他：東京都内で検出された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（2020年2月～5月）、東京健安研七 年 報、71, 65-72, 2020.
- 11) 熊谷遼太、長島真美、浅倉弘幸、他：新型コロナウイルス検査における簡易抽出型リアルタイムPCR法の有用性の検討、東京健安研七 年 報、71, 73-78, 2020.

2. ゲノム情報に基づいた細菌感染症の分子疫学解析

1) インフルエンザ菌の侵襲性、非侵襲性株の比較

感染症法に指定される「侵襲性疾患」の原因菌であるインフルエンザ菌は、血液や髄液に侵入した場合は重篤な症状を引き起こす。その一方、鼻腔や咽頭といった上気道にも存在し、中耳炎や副鼻腔炎など軽微な「非侵襲性」疾患の原因菌ともなる。これら侵襲性と非侵襲性の違いがどのような菌の性質に起因するのはいまだ不明である。本研究では、侵襲性疾患の患者血液から分離された株（侵襲性由来株）と、軽微な疾患の患者の喀痰または吸引痰から分離された株（非侵襲性由来株）のゲノム比較解析を行い、どのような遺伝学的特徴が侵襲性を引き起こす要因になりうるかを探索した。

①患者の年齢が65歳以上、②肺炎症状、という条件を満たし、かつ同時期（平成30年から令和元年）に収集した侵襲性由来、非侵襲性由来株を用いて比較した。侵襲性由来25株と非侵襲性由来12株を供試した。その結果、MLSTあるいはCore gene SNPsに基づいた系統解析においては、両群の差異は認められなかったが、外膜リポ多糖の生合成に関与する領域の配列に有意な差が見られることがわかった。具体的には、侵襲性由来株からは、*rsmA-orf3-lex1-infA*という構造が多く見られた（ $p=0.07$ ）。

2) 新型メタロβラクタマーゼIMP-68の分析

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の全世界的な広がりが懸念されており、特に耐性遺伝子の伝播がその増大の大きな要因となっている。

平成27年に国立国際医療研究センター病院で分離された肺炎桿菌TA6363はメロペネム耐性でありながら、イミペネム感性となる特異な株であったため、MiSeqで全ゲノム情報を調べたところ、新型メタロβラクタマーゼIMP-68産生菌であることが明らかとなった。さらにナノポアシーケンサーMinION（Oxford Nanopore Tech.）によるLong-readデータを用い、IMP-68遺伝子を保有するプラスミドpTMTA63632の配列全長（88,953bp）を得ることができた。pTMTA63632接合伝達株の薬剤感受性と、生化学実験におけるIMP-68の酵素活性はよく相関しており、本菌における薬剤感受性パターンはIMP-68の性質により生じていることが認められた。

メロペネム耐性かつイミペネム感性は過去に西日本を中心に広がりを見せたIMP-6産生菌と同様の特徴であり、新たなステルス型多剤耐性菌を生みうるプラスミド伝達性薬剤耐性遺伝子として注意が必要であると考えられた。

3) 結核菌M株のゲノム分子疫学解析

国内全域で分離される結核菌M株は、ある特定のVNTR型を示すストレプトマイシン耐性株であり、過去に集団感染を引き起こしたこともある注視が必要な系統である。一方で、患者間に疫学的な関連が確認できないもののVNTR型が一致することから、M株の感染経路の追跡にはVNTRより解像度の高い方法が必要であると考えられた。

本研究では、M株の感染経路の追跡におけるNGSを用い

たゲノム分子疫学解析の有効性を検討した。平成23年から令和元年までの間に収集したM株29株とその近縁18株

（VNTRにおいてM株と1 locus違い）をCore genome SNPs解析に供試したところ、疫学的関連性が示唆される5SNPs以内のクラスターが9個検出された。そのうち、疫学的情報との一致がみられたのは4クラスターであり、3クラスターでは明確な疫学的関連性は見出されないものの、居住地や施設利用の一致などが見られた。残り2クラスターに関しては関連性が不明であったが、疫学的情報の不足や都内発生の全株を収集していないことなどが理由であると考えられた。その一方、居住地の近さなどから保健所が関連性を疑ったものの、25SNPs以上の遠縁となったケースも見られた。また、VNTRにおいて1 locus違いの株はCore genome SNPs系統樹上においてもクラスターを形成したことから、これら二つの方法によって見出された系統は、解像度の違いはあれど類似していると考えられた。

発表実績

- 1) 長谷川乃映瑠，安中めぐみ，柴崎澄枝，他：次世代シーケンサーを用いた結核菌M株の系統解析，第31回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会（千葉市），2019.
- 2) Kubota, H., Suzuki, Y., Okuno, R., et al.: mSphere. 4(5). pii: e00736-19. 2019.
- 3) 長谷川乃映瑠，安中めぐみ，柴崎澄枝，他：次世代シーケンサーを用いた結核菌M株の分子疫学的解析，第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会（WEB開催），2021.
- 4) 内容友美，久保田寛顕，根岸久実子，他：侵襲性および非侵襲性感染症由来無荚膜型インフルエンザ菌の比較ゲノム解析，第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会（WEB開催），2021.

3. 食中毒及び感染症を引き起こす細菌の病原性因子の探索に関する研究

細菌性毒素を原因とする疾患は、大規模かつ社会的な影響が大きい事例となり得るため、公衆衛生上重要視される。また、遺伝子解析技術の向上により、新規毒素様遺伝子の報告が菌種を問わず続いているが、その新規毒素遺伝子の病原性や作用機序は不明な場合も多い。そこで、本研究では網羅的ゲノム解析を用いた細菌性毒素の同定や機能解析及び危害性の評価を検討すること、また新規毒素因子の検出系を確立することを本研究の目的とした。

1) ウルセランス菌が産生するジフテリア様毒素に関する研究

ウルセランス菌（*Corynebacterium ulcerans*）は、2類感染症の起因菌であるジフテリア菌（*C. diphtheria*）と類似した毒素（ジフテリア様毒素：Tox）を産生し、人獣共通感染症であるウルセランス症の原因菌である。2016年には

本菌を原因としたヒトの感染死亡例も発生している。しかし、ウルセランス症は感染症法の適用外となっており、疫学調査や基礎研究を基盤とした早急な法整備が必要とされている。そこで本研究では、2010年以降にイヌやネコから分離された tox 遺伝子保有*C. ulcerans* 5株 (B10-27, B10-30, B10-33, B10-72, B12-68) について次世代シーケンサーを用いた詳細な遺伝子解析を行った。

(1) 全長ゲノム間の相同性解析とMLST分類 分離された5株の tox 遺伝子保有*C. ulcerans*を、Multilocus sequence typing (MLST) 法により分類したところ、国内で最も分離例の多いST337が4株、残りの1株はST344であった(表1)。ST344はフランス、カナダにおいて報告があるが、国内での報告は少ない型である。

全長ゲノム配列を比較すると、B12-68は他の株と比較して、遺伝子配列の半分程度が反転していた。また、B12-68はプロファージ構造の大部分が欠損していることから、 tox 遺伝子の伝播性が失われている可能性が高く、プロファージ構造が残っている他の分離株は伝播性を保持していると考えられた。

表1. tox 遺伝子保有 *Corynebacterium ulcerans* 分離株のMLST分類

株名	分離年	由来	ST分類
B10-27	2010	イヌ	ST337
B10-30	2010	ネコ	ST337
B10-33	2010	ネコ	ST337
B10-72	2010	ネコ	ST337
B12-68	2012	ネコ	ST344

(2) tox 遺伝子配列の多様性とmRNA発現量 tox 遺伝子配列の多様性は、毒素活性の強度に影響する可能性が考えられる。そのため、得られた5株について tox 遺伝子の構造を比較したところ、ST337に分類された株は類似の構造であったが、ST344に分類されたB12-68では構造の違いが認められた。しかしながら、 tox 遺伝子のmRNAの発現量をtween加BHI培地上で比較したところ、B12-68と他の株間

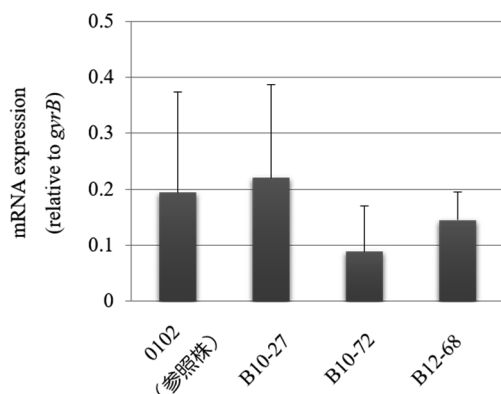


図1. 10%Tween加BHI培地中の tox 遺伝子発現量の比較

で発現量に差異は認められなかった(図1)。

B12-68のようなゲノム構造を持つウルセランス菌はこれまでに詳細な報告がなく、本毒素に関する未報告の発現制御機構の関与や培養条件等の変化による発現量の増減が起こる可能性が考えられる。

2) *Staphylococcus* 属菌が産生するエンテロトキシン様毒素に関する研究

一部の*Staphylococcus* 属菌は、食中毒や皮膚疾患の原因となるエンテロトキシン (SE) を産生することが知られており、現在28種以上のSE及びSE様毒素が報告されている。また、SEは催吐活性やスーパー抗原活性などの様々な生理活性を持つことが知られている。本研究では、*Staphylococcus aureus* 及び*Staphylococcus argenteus* の全ゲノム配列の解析により、新規毒素様配列を発見し、その生理活性を検討した。

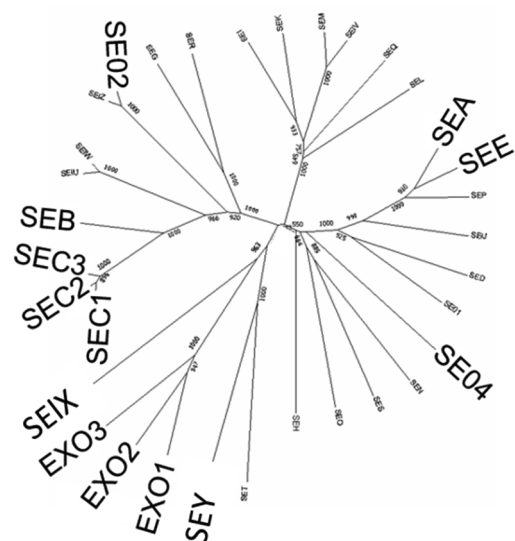
(1) *S. aureus* により産生される新規エンテロトキシン

当センターで過去に分離された sea 遺伝子を保有している食中毒事例由来株について毒素産生量を調査したところ、他の sea 保有食中毒由来株と比較してA型エンテロトキシン (SEA) の産生量が少ない株が認められた。そこで、他の毒素関連因子を検索する目的で全ゲノム配列の解析を行ったところ、新規SE様配列 (SE-tk1) が確認された。

SE-tk1を既知のエンテロトキシンと共にアミノ酸配列に基づく系統樹を作成したところ、SEAやSEEなど、古典的なSEと相同性が高いことが分かった(図2)。今後は、さらに催吐活性やスーパー抗原活性などの生理活性の有無について詳細な解析が必要である。

(2) *S. argenteus* により産生される新規エキソトキシン

2010年に都内で発生した*S. argenteus* による食中毒事例分離株¹⁾ (tokyo13064, tokyo13069) について、全ゲノム配列を決定し詳細な解析を行った。その結果、既知のエンテロトキシン以外に、タンデムに配置されたエンテロトキシン様の配列を発見し、これらの配列をエキソトキシン1~3



(EXO1,EXO2,EXO3)とした。これらのエキソトキシンについて既知のエンテロトキシンと共にアミノ酸配列に基づく系統樹を作成したところ、SEYやSEIXと相関性が高いことが明らかとなった(図2)。そこで、これらの3つの配列のうち、EXO1とEXO2について、組換えたんぱく質を作製し(rEXO1,rEXO2)、生物活性の検討をおこなった。

新規エキソトキシンのスーパー抗原活性を測定するため、マウス脾細胞にrEXO1及びrEXO2を添加し、炎症性サイトカインの一つであるIFN- γ の産生量をsandwich ELISA法により定量した。典型的SEであるSEAと比べると僅かではあるが、どちらもIFN- γ の上昇が認められ、スーパー抗原活性を持つことが示唆された。

文献

- 1) Suzuki, Y., Kubota, H., Ono, H.K., *et al.*: *Int J Food Microbiol.* **262**:31-37. 2017.

発表実績

- 1) Ono, H.K., Hachiya, N., Suzuki, Y., *et al.*: *Toxins (Basel)*. **10**(11). pii: E458. 2018.
2) Suzuki, Y., Ono, H.K., Shimojima, Y., *et al.*: *Int J Food Microbiol.* **92**, 103588. 2020.

4. 腸管出血性大腸菌の分子疫学解析・データベース化及び病原性に関する研究

腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒・感染症は、都内では年間400名を超える感染者が報告されている。この多くは散発患者として届けられているが、共通の感染源(食品)によって引き起こされた散発的集団発生(diffuse outbreak)であることも少なくない。このようなdiffuse outbreakを早期に発見し、感染拡大防止と感染源の特定のためには、臨床材料及び食品から分離された菌株の分子疫学解析が有効な手段と考えられている。現在、一般にPulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) 法による分子疫学解析が行われているが、操作が煩雑で菌株間の分子疫学解析が困難となる場合もある。一方、近年、新たな解析手法としてデータベースの構築が容易なMultiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA) や詳細な菌株間の比較が可能なWhole Genome Sequencing (WGS) 等が報告されている。

本研究では、MLVA法の検討と菌株間の識別能等の基礎データを得ることを目的として既存の方法との比較検討を行う。そして収集した菌株について詳細に調べた病原因子等の解析とMLVA法による解析結果と合わせることで、diffuse outbreakの早期発見のためのデータベースを構築することを目的とする。

1) MLVA導入のための基礎的検討

平板上に発育した集落を滅菌D.W.に懸濁させた菌液を用いてDNA抽出を行うと、DNA量が一定にならないとい

う問題がある。そこで常に一定のDNA量を得るために液体培地であるTSBに菌を接種し、18~24時間培養した菌を10倍希釈した菌液(10⁸ 個/mL)を用いることでDNA濃度を安定させることができた。この培養液から、加熱抽出、アルカリ熱抽出及び3種類の市販キットを用いてDNA抽出を行い、MLVAを実施した。解析した17領域のうち最も安定した高いピークが得られたのはアルカリ熱抽出であった(表2)。アルカリ熱抽出は市販キットを用いる場合と比較して短時間でDNA抽出を行うことができ、かつ低コストであることから、最も優れた方法であることが明らかとなった。

表2. DNA抽出法による4領域のピーク値

菌株No	抽出方法	O157-34	O157-9	O157-17	EH111-8
1	熱	61	102	561	-
	アルカリ	327	393	1597	174
	キットA	88	-	514	117
	キットB	87	165	723	-
	キットC	125	139	586	160
2	熱	82	144	638	-
	アルカリ	460	539	1792	325
	キットA	229	68	555	270
	キットB	261	363	615	185
	キットC	33	-	750	-
3	熱	-	-	404	-
	アルカリ	400	134	1234	403
	キットA	65	-	555	148
	キットB	244	560	615	305
	キットC	50	-	510	-

2) 食中毒及び集団下痢症事例由来株を対象としたPFGE法、IS法及びMLVA法の比較検討

(1) 全ゲノムデータを用いた解析

2017年に分離された同一PFGE型を示す株58株を対象に、MLVA及び全ゲノム配列を用いた一塩基多型

(SNPs) 解析を実施し比較を行った。MLVA型は17m0121型が最も多く48株、1領域違いの型が5種類10株認められた(表3)。SNPs 解析の結果、これらの株は遺伝的に非常に近縁である。推定された(図1)。MLVA型で1領域違いは同じクローン由来であり、PFGE型ともある程度関連することが明らかとなった。

表3. 2017年に分離された腸管出血性大腸菌O157のMLVA型

MLVA型	各領域のリピート数									検出数
	EH157-12	EHC-1	EHC-2	O157-3	O157-34	O157-9	O157-17	O157-36	O157-37	
1	6	11	5	11	9	13	4	9	6	48
2	6	11	5	11	9	13	4	9	7	5
3	6	11	5	10	9	13	4	9	6	1
4	6	11	5	11	9	13	4	9	5	2
5	6	11	5	12	9	13	4	9	6	1
6	6	11	6	11	9	13	4	9	6	1

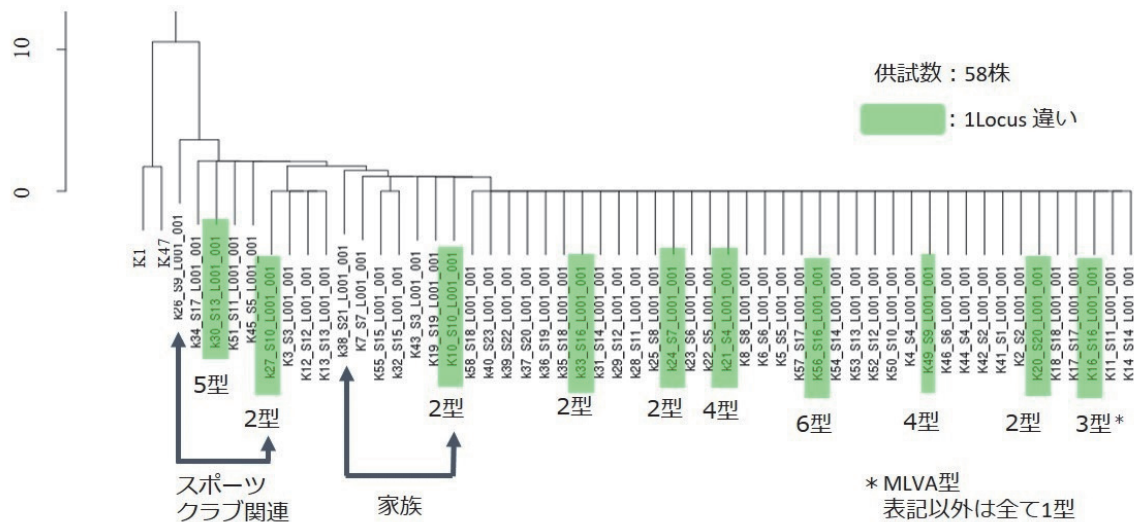


図1. 2017年に分離されたO157株のSNP解析結果とMLVA型の比較

(1) O157による食中毒疑い事例由来株を用いた解析

2019年11月、全国の焼肉チェーン店を原因施設としてO157の散在的集団発生が疑われる事例が発生した。この事例で分離されたO157株（患者由来3株、食品由来16株の計19株）を用いて、従来からのPFGE法、IS法（ゲノム中の特定挿入配列を用いた型別方法）、MLVA法の比較検討を実施した。患者由来3株のPFGE型、IS型はいずれも一致していた。一方、MLVA型は19m0487が2株、19m0488は1株と2種類の型に型別された。また、飲食店に残っていた食品（同一ロット品）由来の16株については、PFGE型及びIS型は全て一致していたが、MLVA型は19m0487が15株、19m0549型が1株と異なる型であった。

解析対象にした事例は全国に60名を超える患者（疑い例も含む）が報告され、そのMLVA型は少なくとも9タイプ（1～2領域違い）が認められていた。MLVA法は迅速に結果を得られ、他自治体との比較も容易であるが、本事例のように同一由来と考えられる菌株でも複数の型が検出される場合があることから、判断は慎重に行わなくてはならないと考えられた。

3) 都内で分離される腸管出血性大腸菌の血清型別不能株の動向

2020年に都内で分離された腸管出血性大腸菌は296株であった。これらは12種類の血清群に分類され、最も多く分離されたのはO157で全体の67.9%を占めていた。次いでO103が5.4%、O121が3.7%であった。

腸管出血性大腸菌の特徴を把握する目的で2017年以降に分離された株の血清群を調べた結果、市販の診断用血清に該当しない株（OUT株）が増加していることが明らかとなり、分離率は2017年は2.9%、2018年は3.0%、2019年は6.8%、2020年は8.8%であった。このような株が年々増加している理由は明らかではないが、海外から持ち込まれている可能性が高いこと、また遺伝子検査等、感度の良い検査

方法が導入されていることなどが考えられた。

発表実績

- 1) 小西典子, 原田幸子, 尾畑浩魅, 河村真保, 鈴木淳, 貞升健志: 2017年に東京都で分離された腸管出血性大腸菌の分子疫学解析, 第39回日本食品微生物学会学術総会, 2018, 大阪市
- 2) 原田幸子, 小西典子, 尾畑浩魅, 河村真保, 鈴木康規, 鈴木淳, 貞升健志: 2017年に発生した腸管出血性大腸菌による散発事例由来株のSNP解析, 第31回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会, 2019, 千葉市
- 3) 小西典子, 原田幸子, 尾畑浩魅, 河村真保, 山梨敬子, 小野明日香, 齊木大, 前田雅子, 赤瀬悟, 門間千枝, 畠山薫, 鈴木淳, 貞升健志: 2018年に東京都で分離された腸管出血性大腸菌の特徴と食中毒事例, 第23回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2019, 愛媛県
- 4) 原田幸子, 小西典子, 尾畑浩魅, 河村真保, 鈴木淳, 貞升健志: 腸管出血性大腸菌による散発事例由来株の分子疫学成績 (2017年), 第15回東京都福祉保健医療学会 (令和元年度), 2019, 東京都

5. 質量分析計を用いた細菌及び真菌の同定・解析法に関する研究

平成30年6月13日に公布された「食品衛生法等の一部を改正する法律」により、令和3年6月1日から原則として全ての食品等事業者にはHazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) に沿った食品衛生管理が義務付けられた。HACCPは、危害要因分析 (HA) と重要管理点 (CCP) からなる食品衛生管理手法の国際標準であり、危害要因分析により重要管理点とその管理基準を設定し、検査等のモニタリングにより危害の発生を防止する。従来は

最終製品の抜き取り検査により食品の安全性を担保していたが、今後は原材料から製品、その流通に至る全工程の中で微生物による汚染や異物の混入などの問題が特に起きやすい工程を把握し、それらを集中的に管理することが求められる。そこで本研究では、食品及び製造工程管理における微生物モニタリング手法としての質量分析計の有用性を検討し、汚染状況の詳細な把握を試みた。また、質量分析計を用いて微生物の生産する有害物質を簡易・迅速に検出する方法の開発、及び同定精度の向上を目的とした質量分析計ライブラリーの拡充を実施した。

1) 食品衛生管理における質量分析計の導入

(1) 食肉加工施設における通箱の汚染状況調査 食肉加工施設4施設において、施設外への運搬に使用する通箱及び加工場内で使用するサンテナのふき取り合計82検体から分離した真菌を分析し、汚染状況を調査した。いずれの施設も通箱の酵母数は洗浄により2~3オーダー減少したが、施設によっては保管場所や保管方法に改善が必要と考えられた。サンテナは通箱に比べてすべての施設で汚染度が高く、適切な洗浄等の管理が必要と考えられた。また、食肉由来とみられる特定の酵母が通箱及びサンテナから重複して検出されており、食肉加工施設の微生物汚染は洗浄不足のサンテナから製品を介して通箱へ広がっていることが推測された。

(2) 総菜製造施設の汚染原因調査 サラダの細菌数が例年よりも増加した総菜製造施設の汚染源の特定を目的として、質量分析計を用いてサラダの原材料及び中間製品17検体、最終製品5検体と、製造工程、従業員手指及び環境の拭取材料の26検体について菌数及び菌叢を調べた。サラダは原材料を洗浄、加熱、消毒（次亜塩素酸水又はオゾン水）した後にサラダ用練り機で和えた後に、包装し出荷される。サラダ用練り機は種類ごとにサラダを作って水で洗浄した後、別のサラダを作り、最後は洗剤をつけたスポン

ジで洗浄していた。

原材料の菌数は $10^3 \sim 10^4$ cfu/mLであり消毒処理後に1オーダー程度減少したが、最終製品は消毒後の原材料と同程度であった。オゾン水消毒後の中間製品は細菌数が2倍に増加していたことから、オゾン水濃度の管理も必要であると考えられた。製造工程等の拭取材料のうち菌数が多かったのはスポンジ洗浄後のサラダ用練り機で、練り機洗浄用スポンジの細菌数も多かったことから、練り機の洗浄不足及びスポンジの衛生管理に問題があると考えられた。練り機を次亜塩素酸ナトリウムで消毒する改善指導を行ったところ、最終製品の菌数は大幅に減少した。

最終製品から検出された14菌種の細菌のうち、2株以上分離された菌種は練り機からも多数検出された。これらのうち*Lactobacillus* 属菌や*Leuconostoc* 属菌は乳酸菌であり、原材料として使用されたマヨネーズによるpHの低下が影響していると考えられた。薬品臭の苦情を引き起こすシンナー臭産生酵母が練り機や従業員手指から検出されたことから、苦情品防止のため、日常の5S活動も重要であると考えられた。

加熱・消毒後の中間製品からは様々な細菌が検出されており、加熱・消毒後の中間製品の取り扱いや器具の洗浄、跳ね水などに注意が必要と考えられた。また*Pseudomonas* 属菌や*Serratia* 属菌は最終製品を含め、製造工程や環境等から幅広く検出され、本施設の汚染の指標となることがわかった（表1）。

2) 微生物の生産する有害物質を簡易・迅速に検出する方法の開発

(1) アフラトキシン産生能試験法の検討 菌株のアフラトキシン（以下、AF）産生能を簡便に調べることを目的として、培地及び培養日数とAF抽出の基礎的条件を検討した。培地は液体培地として酵母エキス・ショ糖（以下、YES）培地、16%グルコース加サブローブロス（以下、

表1. 最終製品、中間製品及び拭き取りから分離した細菌の菌種

菌 種	最終 製品	加熱・消毒			練り機	従業員の 手指	環境	合計
		前	後	なし				
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1				1			2
<i>Burkholderia gladioli</i>	1	1	1					3
<i>Citrobacter freundii</i>	1				2	1		4
<i>Curtobacterium albidum</i>	1							1
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1	1	1		2			5
<i>Kocuria salsicia</i>	1							1
<i>Kocuria varians</i>	1							1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3				17			20
<i>Leuconostoc citreum</i>	2		1		6			9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1		1					2
<i>Microbacterium testaceum</i>	1		1			1		3
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	3				7			10
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	3	14		4	5	2	29
<i>Serratia marcescens</i>	2				4	2	2	10
その他		6	6	2	16	3	10	43

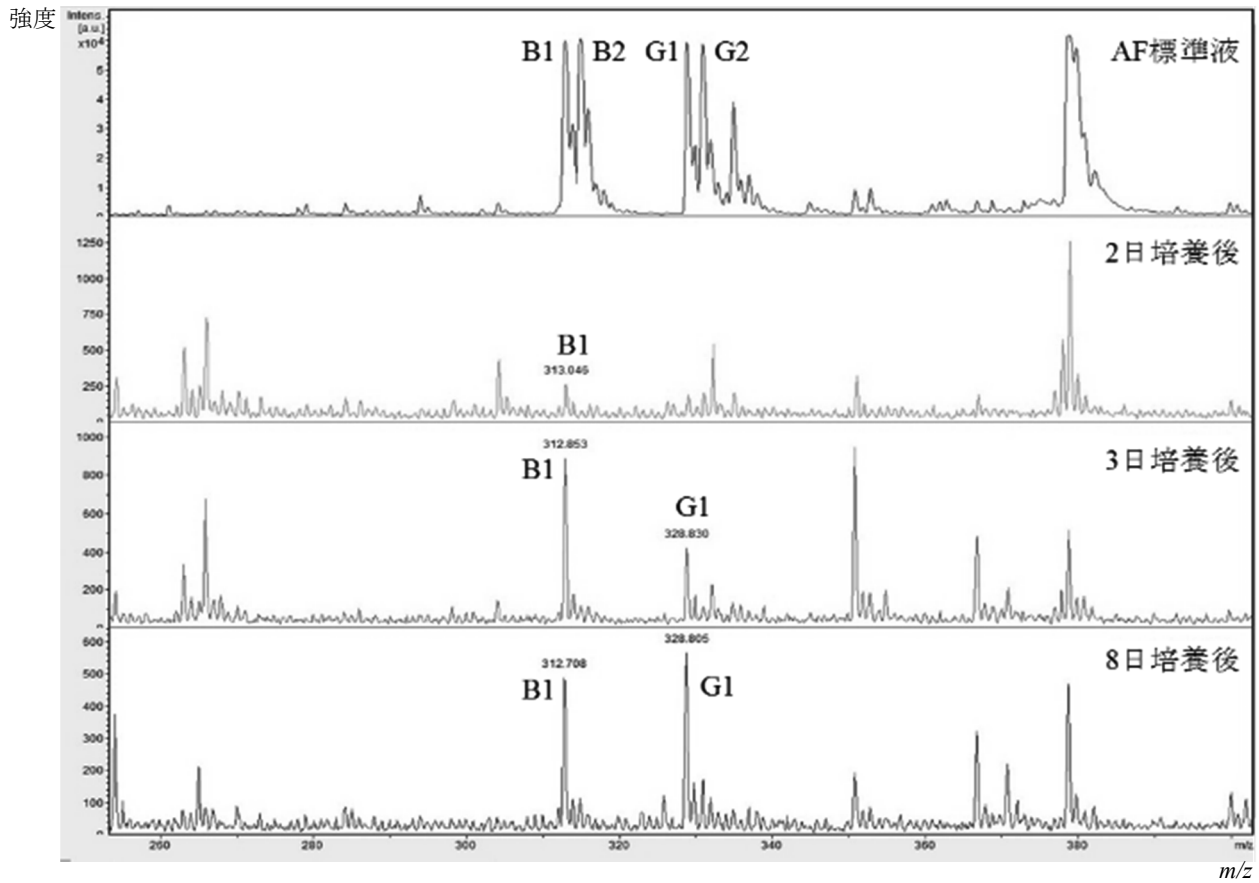


図1. 培養日数とAF検出 (MALDI-TOF MSによるマスペクトル)

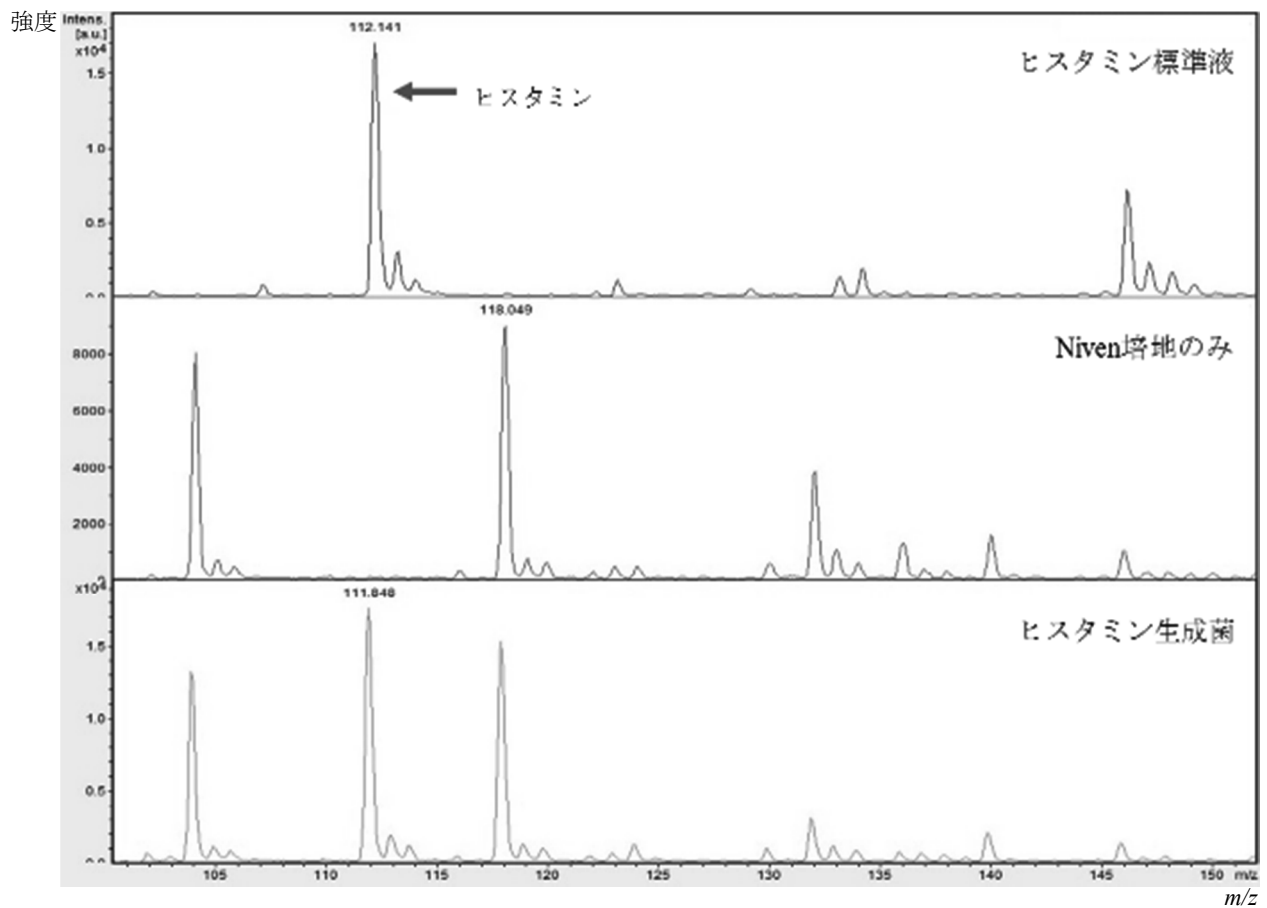


図2. Niven培地におけるヒスタミンの検出 (MALDI-TOF MSによるマスペクトル)

SBG) 培地, 寒天培地としてポテトデキストロース寒天 (以下, PDA) 培地を用いた。液体培地は培養1~5日後及び8日後, 寒天培地は培養4日後及び7日後にAFを抽出した。液体培地は抽出時間を1, 5, 10分の3段階として抽出効率を比較した。AFの検出はマニュアルで400ショットを積算し, AF (B1, B2, G1, G2) 標準品の各ピーク (m/z =313, 315, 329, 313) と比較した。その結果, YES培地, SBG培地及びPDA培地ともAFG2及びAFB2の検出は困難であった。培養日数は, 液体培地ではカビ毒産生の早い株で2日後からAFB1及びAFG1が検出され, 8日後もピークが確認できた (図1)。寒天培地では培養4日後及び7日後ともにピークが検出された。抽出時間は1分でも十分にAF検出が可能であった。AF非産生株ではすべての株でB群, G群いずれのピークも不検出であった。

寒天培地は液体培地よりも容易で培地の影響もほとんどないことから, 寒天培地を用いてB群, G群として4日間培養後に検出することにより, AF産生試験が最も簡便に検査可能であることがわかった。これは, 従来法である薄層クロマトグラフィー法に比べて8日間の短縮が可能であった。

(2) ヒスタミン生成菌の検出法の検討 ヒスタミン食中毒はヒスタミンが蓄積した食品の喫食により生じる。ヒスタミン生成菌の同定は, 菌種同定とヒスタミンの検出をそれぞれ別の手法で行う必要があり, 煩雑であることから, 菌種同定とヒスタミン検出を質量分析計で一度に行う方法を検討した。ヒスタミン生成菌34株とヒスタミン非生成菌15株をNiven培地又はNiven培地改良ヒスチジンブロスに接種し, アセトニトリルでヒスタミンを抽出して分析した結果, ヒスタミン生成菌はNiven培地ではすべての株で, ヒスチジンブロスでは生成量の低かった2株を除きヒスタミンが検出された (図2)。この時のヒスタミン生成量は5~6,550ppmであった。ヒスタミン非生成菌ではヒスタミンは検出されなかった。また, 160~190mg/100gのヒスタミンを含有する食中毒事例由来のイワシからも同様にヒスタミンを検出可能であった。

3) 質量分析計ライブラリーの拡充

質量分析計による菌種同定はライブラリー登録株のマススペクトルとのパターンマッチングにより行われるため, 1菌種当たりの登録数が多く, 多様な菌種が登録されているほど, 同定精度は向上すると考えられる。そこでライブラリー未登録菌種を含め, 3年間で細菌370株, 酵母108株及び糸状菌311株を新たに登録した (NBRC公開株497株を含む)。これにより, 食品から分離した*Escherichia albertii*の同定精度が向上し, 食中毒起因菌である*Staphylococcus argenteus*の迅速同定が可能となった。

発表実績

1) 上原さとみ, 高橋 由美, 吉原 祥子, 他: 食肉加工施設における通箱の真菌汚染状況調査, 第39回日本食品微

生物学会学術総会 (大阪), 2018.

2) 上原さとみ, 高橋由美, 吉原祥子, 他: MALDI-TOF MSを用いた菌株のアフラトキシン産生能検査法の検討, 日本防菌防黴学会第45回年次大会 (東京), 2018.

3) 上原さとみ, 小林真紀子, 加藤 玲, 他: MALDI-TOF MSによるヒスタミン生成菌の迅速同定, 日本防菌防黴学会第46回年次大会 (大阪), 2019.

4) 上原さとみ, 高橋由美, 吉原祥子, 他: MALDI-TOF MSを用いた微生物の製造工程管理, 第40回日本食品微生物学会学術総会 (東京), 2019.

5) 吉原祥子, 上原さとみ, 高橋由美, 他: MALDI-TOF MSを利用した苦情品から分離したシンナー臭産生酵母の解析, 東京健安研年報, 70, 115-119, 2019.

6) 上原さとみ: 東京都における食品衛生を目的としたMALDI-TOF MSの活用事例, 第32回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会 (さいたま市), 2020.

7) 上原さとみ, 高橋由美, 吉原祥子, 他: MALDI-TOF MSを使用した食肉加工施設における通箱の真菌汚染状況調査, 日食微誌, 37, 14-19, 2020.

8) 上原さとみ: 食肉加工施設における真菌調査 (MALDI-TOF MSを利用した通箱の汚染状況調査), クリーンテクノロジー, 30(5), 2020.

9) Satomi U., Makiko K., Keisuke K., et al.: Rapid identification of histamine-producing bacteria isolated from fish using MALDI-TOF MS, J. food sci. tech., 58(10), 4055-4061, 2021.

6. マスギャザリングにおける感染症サーベイランス強化に向けた研究

東京都では, 2019年にラグビーワールドカップ, 翌2020年には東京オリパラを開催する予定であった。これら国際的大規模MGの開催を念頭に, 本研究の計画として1) サーベイランスデータから平常時のベースラインとリスク評価の指標を作成, 2) サーベイランスデータの定期発信, 3) 平常時のベースライン検討や異常集積時の分析に必要とされる病原体検査体制の整備, の3点を挙げた。なお, 2019年末に発生した新型コロナウイルス感染症, 及び同感染症の世界規模での急拡大に伴う東京オリパラの2021年夏への延期を受けて, 一部内容を追加変更した。

1) MGにおいて注意すべき感染症のリスク評価 (新型コロナウイルス感染症を含む)

東京オリパラの開催における重要な課題の1つとして, 感染症対策が挙げられていた。これを受け, 国 (組織委員会) は輸入例の増加や大規模な集団発生の懸念, 発症時の重症度等の観点から, 特に注視する感染症として18疾患を想定していたが, 2019年末に新型コロナウイルス感染症が発生, その後世界的な流行へと進展した。我が国では, 2020年1月末以降, 輸入症例から国内の持続的な伝播が生じて感染者数が急増した結果, 東京オリパラの開催延期と

緊急事態宣言の発出が行われた。その後、東京都内では緊急事態の合間を縫う形で流行を繰り返す状態が続き、延期された東京オリパラ大会の開催においては、新型コロナウイルス感染症の発生状況が運営の重要な判断要素となると想定された。このため、本研究の分析対象であった全数報告5疾患（麻しん、風しん、侵襲性髄膜炎菌感染症、腸管出血性大腸菌感染症、細菌性赤痢）に新型コロナウイルス感染症を追加した。

分析対象6疾患のうち麻しん、風しん、侵襲性髄膜炎菌感染症、細菌性赤痢の4疾患は新型コロナウイルス感染症の流行以降、ほぼ発生がない状況であった。一方、腸管出血性大腸菌感染症は例年と同程度の報告があり、新型コロナウイルス感染症に伴う対策（人流抑制や会食・外食の控え等）を行ってもその効果は限定的であり、同感染症の発生動向には注意が必要であることが判明した。

新型コロナウイルス感染症については、患者居住地を地図上に表示させ、その濃密と時間的変化で地域別の流行を把握できるマップ（GISマップ）の作図システムを構築した。GISマップの変化を追うことによって、2020年31週から45週のように、都内で発生が減少している時期であっても、新宿、渋谷、池袋、港、大田の繁華街では継続的な発生があり、繁華街の発生が増加すると、都内に拡大する傾向があることが明らかになった。GISマップはさらに集団発生地域の早期の探知にも有用であることが示唆された。

2) 競技会場関連サーベイランス

東京オリパラで予定されている競技会場の8か所について、会場から半径3-5 kmの範囲に位置する定点把握医療機関から報告される疾患と病原体サーベイランスでの病原体検出状況に着目し、それらに変化がないか追跡する「競技会場関連サーベイランス」を実施した。

結果として、RSウイルス感染症はどの会場の周辺でも1年間ほぼ発生がなく、インフルエンザも2020/2021年シーズンはほとんど認められなかった。新型コロナウイルス感染症に対する感染対策が功を奏していると考えた。

一方、水痘や咽頭結膜熱については、都内全域において例年並み以下で推移していたが、複数の競技会場周辺において小幅、かつ短期間の増加を認めた。本サーベイランスは局所的な増加を把握するのに適しており、既存のサーベイランスでは把握できない発生を探知できる可能性が示唆された。なお本サーベイランスは東京オリパラの開催予定時期まで継続する予定である。

3) サーベイランスデータの定期発信

今年度は、新型コロナウイルス感染症を中心に情報発信を行った。保健所を対象としたWeb会議を毎週開催し、さらに情報誌としてコロナ週報を発行した。

4) 疫学調査と病原体検査体制

新型コロナウイルス感染症の集団感染事例に対し、東京都実地疫学調査チームTEITは、保健所や医療機関、施設などの支援を行ってきた。この際ウイルス研究科と協力し、新型コロナウイルスのゲノム解析を行う体制を整備し

た。分析の結果、疫学的関連性や変異に関する情報を入手することで、エビデンスに基づいた対策を現場に還元することができた。

以上、今年度及び3年間の研究成果としては1) 今年度は新型コロナウイルス感染症の影響でほとんどの疾患が例年ほど発生しなかったため、新型コロナウイルス流行下に発生した感染症に関するデータが不十分であり、今後それらについて継続的に情報収集し、リスク評価を行っていく必要があること、2) 新型コロナウイルスに関して急速に集積される情報を整理し、都民向けの情報発信を充実させていくこと、3) 近隣自治体、地方感染症情報センターとの連携をさらに推進していくこと、をこれからの課題として挙げた。

発表実績

- 1) 草深明子, 岡田麻友, 渡邊愛可, 他: 保健所支援から考える新型コロナウイルス感染症の課題と対策, 第79回日本公衆衛生学会総会シンポジウム(京都), 2020.
- 2) 上田実佳子, 岡田麻友, 草深明子, 他: 健康危機発生時のWeb会議システムを用いた感染症対策における連携構築の検討, 第79回日本公衆衛生学会総会(京都), 2020.
- 3) 小川麻萌, 小池浩二, 灘岡陽子, 他: 東京都感染症情報センターホームページのアクセス数と感染症流行の関係性の検討, 東京健安研七 年 報, 71, 265-273, 2020.
- 4) 草深明子, 岡田麻友, 渡邊愛可, 他: 新型コロナウイルス感染症に対する東京都実地疫学調査チーム (TEIT) の活動状況について (2020年1月~6月), 東京健安研七 年 報, 71, 275-281, 2020.
- 5) 宗村佳子, 原田順子, 古谷実, 他: 東京都における破傷風の発生状況 (2006年~2019年), 東京健安研七 年 報, 71, 259-264, 2020.
- 6) 中坪直樹: 調整に難渋した結核広域集団感染事例ー課題と今後の展望ー, 第95回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会(横浜), 2020.

総 括

本重点研究は、大規模MGの開催を控えた東京都内での微生物危害の発生や拡大を防ぐために、様々な病原体を網羅的に検知する新たな微生物検出方法の検討・開発を行った。あわせて、結果を迅速に行政検査へ応用・活用を試みた。6題の個別課題を3年間実施する中で新型コロナウイルス感染症が発生・世界規模で急拡大したため、途中、研究計画を変更し、同感染症に関する項目を追加した。それぞれの研究課題で開発・検討した手法は、国内での発生が想定される微生物危害の早期検知や原因究明への活用が期待でき、従来の方法では探知が難しい危害事例を含め、感染症や食中毒における疫学調査等の効率化・迅速化に効果を発揮すると考えられる。特に、新型コロナウイルス感染症

への対応については、本研究の成果の一部が行政対応の中に既に取り入れられており、本年夏に開催予定の東京オリパラを始め、今後、東京都内で実施される大規模MG等での活用も期待される。

一方、本研究を通じて課題も見いだされた。中でも、研究の中で検討・開発した手法について、いち早く行政施策へ活用するための組織構築は早急な対応が必要であろう。現時点では、昨年秋から稼働している「東京iCDC」がその受け皿の一つとなり、東京iCDCの各専門家ボードとの連携強化を進めているところである。また、開発した検査

・解析手法を遅滞なく行政施策へ反映させ、成果を継続的に発展させて行くためには、予算措置や人材確保・育成等も急務になる。

当センターは、都内で発生する健康危害を的確に探知し、その解析結果を迅速に提供して行く役割を担っている。そのため、これからも平時から都内で発生する健康危害微生物の検査を行いつつ、本研究で得られた成果を起点に更なる病原因子等の検出・解析方法を検討して行く必要があろう。

Detection and Analysis of Health-Hazard Microorganisms Using Comprehensive Genome Analysis and Other Methods

Takashi CHIBA^a, Mami NAGASHIMA^a, Hiroaki KUBOTA^a, Makiko KOBAYASHI^a, Noriko KONISHI^a, Satomi UEHARA^a, Akiko KUSABUKA^b, Akane NEGISHI^a, Ryota KUMAGAI^a, Yurie KITAMURA^a, Yukinao HAYASHI^a, Michiya HASEGAWA^a, Kohji MORI^a, Isao YOSHIDA^a, Yuta UCHIDA^b, Ai SUZUKI^a, Yoshiko SOUMURA^a, Miyuki NAGANO^a, Mayuko ODA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Takushi FUJIWARA^a, Rumi OKUNO^a, Hirofumi MIYAKE^a, Yumi UCHITANI^a, Megumi ANNAKA^a, Sumie SHIBASAKI^a, Hiroki TAKANO^a, Tukasa ARIYOSHI^a, Morika MITOBE^a, Noeru HASEGAWA^a, Rie MURATA^a, Yukihiro KOUDO^a, Kai KOBAYASHI^a, Keiko YOKOYAMA^a, Yasunori SUZUKI^b, Rei KATOH^a, Miki IDA^a, Kou MURAKAMI^a, Youko HIGUCHI^a, Sachiko HARADA^a, Maho KAWAMURA^a, Keiko YAMANASHI^a, Asuka ONO^a, Hiromi OBATA^a, Kaoru HATAKEYAMA^a, Chie MONMA^a, Satoru AKASE^a, Masako MAEDA^a, Dai SAIKI^a, Yumi TAKAHASHI^a, Shoko YOSHIWARA^b, Akihiko HIRAI^b, Yukako SHIMOJIMA^b, Rie FUKUI^a, Kana MORITA^b, Yukari NISHINO^a, Jun SUZUKI^a, Ryou NASUHARA^a, Kohji KOIKE^a, Youko NADAOKA^a, Takatoshi ISHIKAWA^b, Atushi YOSHIDA^a and Kenji SADAMASU^a

We present a summary of the emphasis research project "Detection and analysis of health-hazard microorganisms using comprehensive genome analysis and other methods" conducted at the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health between 2018 and 2020.

This project comprised six individual studies for the international mass gathering (MG) held in Tokyo. The aim of using next-generation sequencing (NGS) was to optimize testing and analysis methods in the field of viruses, analysis related to invasive *Haemophilus influenzae* and multidrug-resistant bacteria, studies of the molecular epidemiological analysis method for *Mycobacterium tuberculosis*, and analysis of novel toxins from toxin-producing *Corynebacterium ulcerans* and *Staphylococcus* spp. In addition, for the examination and analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, the MLVA method, which is a new gene analysis method, was introduced. Moreover, we examined the PCR typing method for strains that could not be typed using commercially-available diagnostic serum. In terms of the use of mass spectrometers, we developed and improved risk management methods for food production and confirmation test methods for histamine-producing bacteria and mycotoxins. Then, identification accuracy was improved by expanding the library of mass spectrometers. In the field of epidemiology, we examined the application of genomic information to new coronavirus tests and surveillance enhancement methods for holding large-scale MGs, and applied these methods to prevent the spread of new coronavirus infections in Tokyo.

Keywords: comprehensive genomic analysis, mass spectrometry, mass gathering, next-generation sequencing, microbial toxins, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, infectious disease surveillance

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out