

表3. ヒト由来腸管出血性大腸菌の血清型別遺伝子保有状況

血清群	供試菌株数	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	<i>subA</i>	<i>aggR</i>
O103	10	10	0	10	0	0
O145	7	7	0	7	0	0
O121	4	4	0	4	0	0
O76	1	1	0	1	0	0
O91	1	0	0	1	0	0
O115	1	0	0	0	0	0
OUT	4	1	0	2	1	0
合計	28	23	0	25	1	0

表4. 食品および環境から分離されたEHEC O121株

検体	由来	血清型	毒素型
食品	豚レバ刺し	O121:H10	VT2
食品	豚ハツ刺し	O121:H10	VT2
食品	豚タン刺し	O121:H10	VT2
食品	卵和え	O121:H10	VT2
拭き取り	焼き場冷蔵庫	O121:H10	VT2
拭き取り	仕込み用まな板	O121:H10	VT2
拭き取り	流し内壁	O121:H10	VT2

* 病原因子 (*eae*, *saa*, *hlyA*, *subA*) は全て陰性

大腸菌 O 血清群の核酸検出法に関する研究

研究分担者 井口 純 （宮崎大学・I R 推進機構）

研究要旨

大腸菌の血清学的分類は分離株のクローン性を知る上で重要な手掛かりとなる。本研究では大腸菌の O 血清群判定を補助する安価で迅速な核酸検出法の開発を目指した。大腸菌 O 抗原コード領域の網羅的な塩基配列情報を基に、各 O 血清群（またはグループ）に対して特異的な 162 種類の PCR プライマーセットをデザインし、それらを用いて効率的な検出を可能にする 20 種類のマルチプレックス PCR キットを開発した。全 184 種類の大腸菌 O 血清群標準株を用いて PCR 判定との特異的な対応を確認するとともに、115 種類の O 血清群に属する野生株 335 株を用いて O 血清群と PCR 判定の結果が一致することを確認した。また血清学的には判定できない（何れの抗血清にも凝集反応が見られないものに加え、凝集はするが判定が不明瞭なものを含む）84 株についても PCR 法ではいずれかのタイプに判定できることを確認した。一方で、結果が不一致となる株や PCR 法では判定できない株も確認されたことから、さらに広域かつ詳細な検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所（Statens Serum Institut: SSI）により現在のところ O1 から O187 までが定められており、3 種類の垂型（O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac）と 6 種類の欠番（O31、O47、O67、O72、O94、O122）があるために 184 種類の O 血清群が認められている。大腸菌の血清学的分類は分離株のクローン性を示す指標になることから、食品や臨床から分離される病原大腸菌の汚染状況や動向を調査・研究する手法として広く用いられている。SSI からは全種類の O 血清群に対する抗血清が販売されているが、検査現場でその全てを揃えることは経済的に難しく、国内メーカーから販売されている抗血清は主要な 50 種類に限られている。

ヒト患者から分離される腸管出血性大腸菌（EHEC）の O 血清群は O157、O26、O111、O103 などが大半を占めるが、稀な O 血清群に属する EHEC の分離も報告されている。感染研の調べによると 2007 年から 2011 年の間に少なくとも 90 種類の O 血清群が確認されており、血便や溶血性尿毒症症候群を呈した重症患者から稀な O

血清群が分離される事例も報告されている。また 2011 年にはドイツを中心に、これまでに事例報告例がほとんど無い EHEC O104 による大規模な集団事例が発生した。このような状況において、稀な O 血清群の EHEC による事例発生時の早期探知や感染拡大防止のためには、地方衛生研究所などの検査機関において広域（できれば網羅的）な O 血清群を識別できる手法やシステムを備えておく必要があると考えられた。

大腸菌の O 抗原糖鎖は大きく 3 つのステップ（1. 構成単糖の合成、2. 糖転移による糖鎖ユニットの形成、3. 糖鎖ユニットの輸送と連結）を経て合成される。O 抗原合成に関わる遺伝子の多くは染色体上の特定領域にクラスターを形成して存在し、O 血清群の違いにより遺伝子の相同性や構成が大きく異なっていることが知られている。

そこで本研究では大腸菌の O 抗原コード領域に注目し、O 血清群判定を補助する安価で迅速な核酸検出法の開発を目的とした。

B. 研究方法

1. 大腸菌 O 血清群標準株

SSI から分与された全 184 種類の大腸菌 O 血清群標準株を収集し、以下の実験に使用した。

2. O抗原コード領域の配列情報の収集

既報の塩基配列については DNA データベースより収集した。未決定配列については標準株を用いて O 抗原コード領域をカバーした PCR 産物 (10~30 kb) からショットガンライブラリーを作製し、サンガー法により決定した。PCR 産物が得られない菌株については、MiSeq システムによりドラフトゲノムを取得し、O 抗原コード領域の抽出または上記サンガー法と併用して配列決定を行った。

3. 比較解析

O 抗原コード領域に隣接する *galF* および *hisI* で挟み込まれた領域について、遺伝子予測およびアノテーションを行った。領域および遺伝子の比較解析には各種 BLAST プログラムを用いた。機能的に相同 (または類似) だと予想される遺伝子についてはグループ化して比較解析を行った。

4. PCRプライマー

産物長が 130 bp から 1300 bp、Tm 値が 56 から 58°C の範囲内で PCR プライマーセットをデザインした。

5. PCR

Taq ポリメラーゼは KAPATaq Extra (日本ジェネティクス) を使用し、サーマルサイクラーは GeneAmp PCR システム 9700 (アプライドバイオシステムズ) または TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) を使用した。PCR 産物は 2%ゲル上で泳動して確認した。

6. 特異性評価

シンプレックスおよびマルチプレックスの両法において、全標準株の精製 DNA (10ng/μl) を用いた特異性の確認を行った。

7. O血清群との対応評価

SSI 抗血清により O 血清群を判定した大腸菌野生株 491 株 [判定不能株 (OUT) 115 株を含む] の精製 DNA (10ng/μl) を用いてマルチプレックス PCR キットによる判定を行い、結果の対応評価を行った。

倫理面への配慮 該当しない

C. 研究結果

1. 領域レベルでの比較解析

184 種類の O 血清群のうち、76 種類は既報の O 抗原コード領域塩基配列を使用し、残る 108 種類は本研究などで新しく決定した配列を使用した (配列情報は未発表の為にここでは省略するが、本課題終了時の総合研究報告書においては詳細を公開予定である)。O14 および O57 については O 抗原コード領域の大半が脱落しており、LPS-SDS PAGE とその銀染色によっても O 抗原が発現していないことを確認した (データ未掲載)。O14 と O57 を除く 182 種類のコード領域を比較した結果、35 種類は相同な遺伝子セットから成る 15 グループにまとめられた (図 1)。グループ化された 15 種類のコード領域とユニークな 147 種類のコード領域を合わせると、計 162 種類の領域タイプ (O-genotype) が認められた。

2. 遺伝子レベルでの比較解析

個々の遺伝子について同一機能が予想される遺伝子をグループ化して比較したところ、単糖合成系遺伝子は多様性の程度が低かったのに対し、糖転移や糖鎖輸送・連結に関わる遺伝子は高度に多様化していた。糖鎖輸送・連結遺伝子 (*wzx/wzy* または *wzm/wzt*) に注目すると、領域レベルの解析でグループ化したものを除くほぼ全ての遺伝子間で 70%以下の相同性 (アミノ酸配列) であることが確認された (図 2)。

3. シンプレックスPCR

全 162 種類の O-genotype を識別できる *wzx/wzy* または *wzm/wzt* を標的とした PCR プライマーセットを、産物サイズが階段状になるようにデザインした (図 3) (そのうち 33 種類は既報のプライマー配列を使用した。O8 のみ糖転移酵素遺伝子を標的とした。プライマー配列は未発表の為にここでは省略するが、本課題終了時の総合研究報告書においては詳細を公開予定である)。全プライマーセットの特異性を確認した。

4. マルチプレックスPCR

図 4 で示すように、全 162 種類のプライマーセットを用いて、1 反応チューブで 6 から 9 種類の O-genotype が同時検出できる 20 種類のマルチプレックス PCR (MP-1~MP-20) をデザイン

した。全マルチプレックス PCR の特異性を確認した。加えて、粗抽出 DNA 検体（一晚培養した培養液を遠心して上清を除去し、TE バッファーで菌塊を再浮遊させた後に、100℃-10 分間の熱処理）をテンプレート DNA とした場合でも十分に判定できることを確認した。

5. O血清群とO-genotypeとの対応評価

全標準株を用いて対応の一致を再確認した。野生株 491 株を用いた対応評価の結果概要を表 1 に示す。115 種類の O 血清群からなる 335 株については対応が一致し、15 株については対応が一致しなかった。また 84 株では O 血清群の判定はできなかったが、O-genotype が判定できた。さらに 52 株では O-genotype が判定できなかった。5 株では 2 種類の O-genotype に判定された。

6. 試験的タイピングネットワーク

学会や研究室ホームページなどで PCR による O-genotype 判定法を紹介すると共に試験的なタイピング受託を呼びかけたところ、2012 年 11 月から 2013 年 12 月までの期間で 14 機関から 381 株の依頼があった（図 5）。分離源別ではヒト糞便由来が 43%を占め、動物糞便、食品と続いた。病原因子別では EHEC が 50%を占めた。EHEC では 26 種類の O-genotype が確認され、O-genotype が判定できない菌株は 21 株（5.5%）であった。

研究室 HP アドレス：

http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/iguchi/iguchi_lab/Main.html

D. 考察

網羅的な解析により、O 抗原コード領域の共通性と多様性が明らかとなった。相同な O 抗原コード領域を共有する異なる O 血清群株間で糖鎖構造（抗原性）が異なる原因については、これまでに 2 種類の報告がある。044 と 077 の間では、領域外に挿入している acetyltransferase 遺伝子の働きにより側鎖にグルコースが付加して糖鎖構造を変化させることが報告されている（Microbiology. 2007 153:2159-67）。また 0107 と 0117 の間では、領域内の糖転移酵素遺伝子上にアミノ酸配列を変化させる変異が入り、構成糖の一つを変化させ

ることが報告されている（Glycobiology. 2012 22:281-287）。上記以外のケースについてはこれまでにその原因は不明であるが、グループ内の O 抗原の多くはグループ内の異なる O 抗原抗血清に対して交差反応を示す場合が多く（データ未記載）、類似する糖鎖構造をとると予想される。

対応評価において、一部の菌株で O 血清群と O-genotype の判定が不一致となった。原因については現在のところ不明であるが、抗血清の交差性や糖鎖構造の類似性などにも考慮しながら、詳細な解析を進めて行く予定である。また O 血清群および O-genotype が判定できなかった菌株については未定型（新規）O 血清群であることが予想される。これらの O 抗原コード領域や抗原性についても詳細に解析を進め、公衆衛生的に注意が必要であると考えられた場合は、それらを判定できる PCR 法を新しく開発する予定である。

E. 結論

本研究で開発したマルチプレックス PCR 法は、ほぼ全ての大腸菌 O 血清群の遺伝学的判定（グループ判定を含む）を可能にした。本法は検体 DNA の準備から判定結果が出るまでに最短で 2 時間半を要し（同時に 4 検体の処理が可能）、消耗品も 1 検体あたり 600 円程度と、迅速で安価な手法であることから、O 血清群判定を補助する手法になると十分に期待された。より実用性を高める為には、野生株を用いた O 血清群判定との対応について更なる情報を収集する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表

1) Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M, Development of a DNA-based system for the identification of almost all recognized *E. coli* O serogroups. Applied Bioinformatics and Public Health Microbiology 2013, 2013. 5. 15-17 (Cambridge,

UK)

- 2) 中村寛海、井口純、藤原敦史、伊豫田淳、長谷篤、小笠原準、ウシ由来STECの遺伝学的特徴と系統的關係について、第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)
- 3) 井口純、伊豫田淳、勢戸和子、大西真、“*E. coli* O-genotyping PCR” の実用化に向けて、第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)
- 4) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、勢戸和子、大西真、*E. coli* O-genotyping PCRにより判定できなかったSTEC株のO抗原コード領域の解析、第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)
- 5) 中村寛海、井口純、藤原敦史、伊豫田淳、長谷篤、小笠原準、ウシ由来STECの遺伝学的特徴と系統的關係について、第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)
- 6) 秋吉充子、井口純、伊豫田淳、勢戸和子、大西真、“*E. coli* O-genotyping PCR” の実用性評価、第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)
- 7) 井口純、*in vitro*および*in silico*による大腸菌O血清群の遺伝学的判定法開発の試み、第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014. 2. 1-2 (名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 該当無し

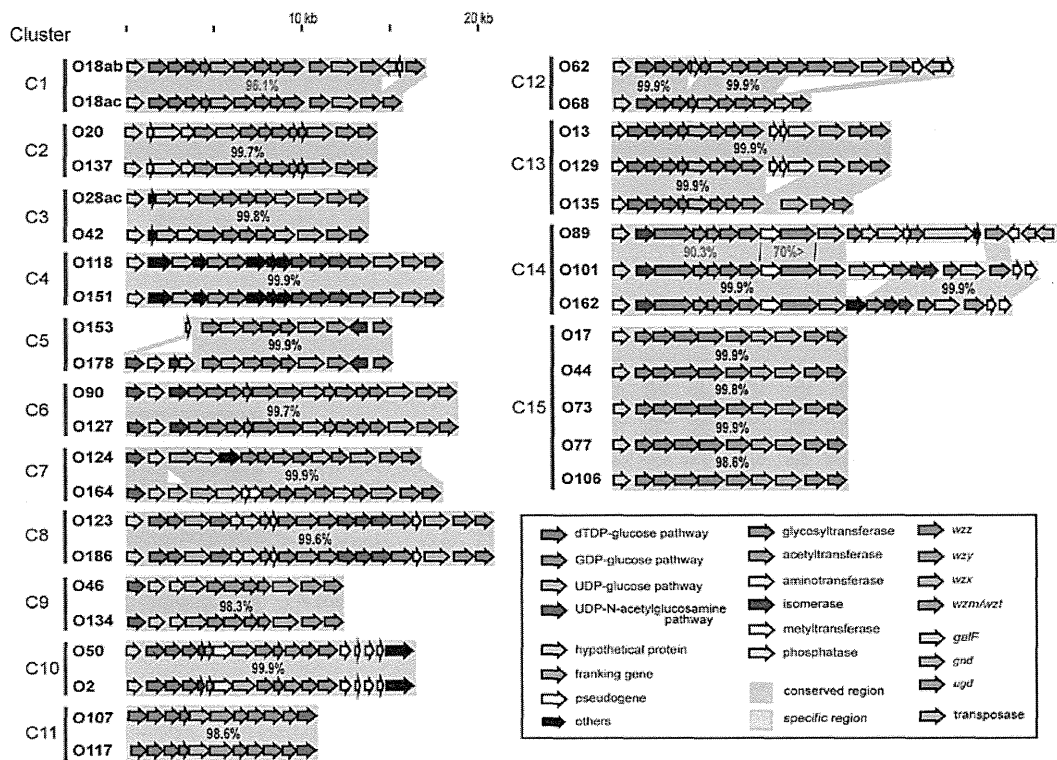


図 1. 15 種類 (C1 から C15) にグループ化された 35 種類の O 抗原コード領域

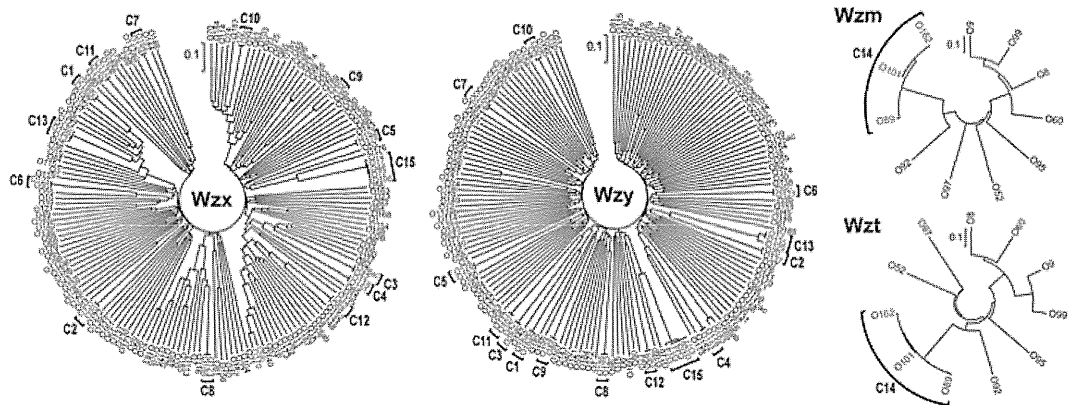


図 2. 糖鎖輸送・連結遺伝子の同源性比較 (アミノ酸配列での比較)
遺伝子間の同源性が赤色は 97% 以上、青色は 70% 以上 (97% 未満) を示す。

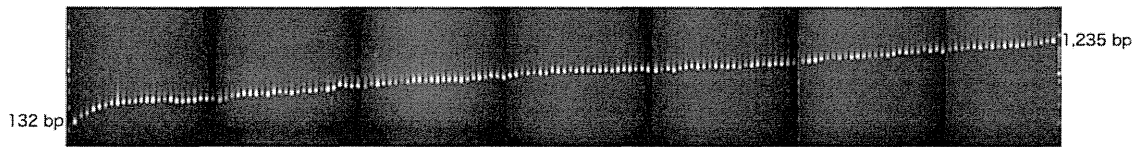


図3. 162種類のプライマーセットから得られたPCR産物

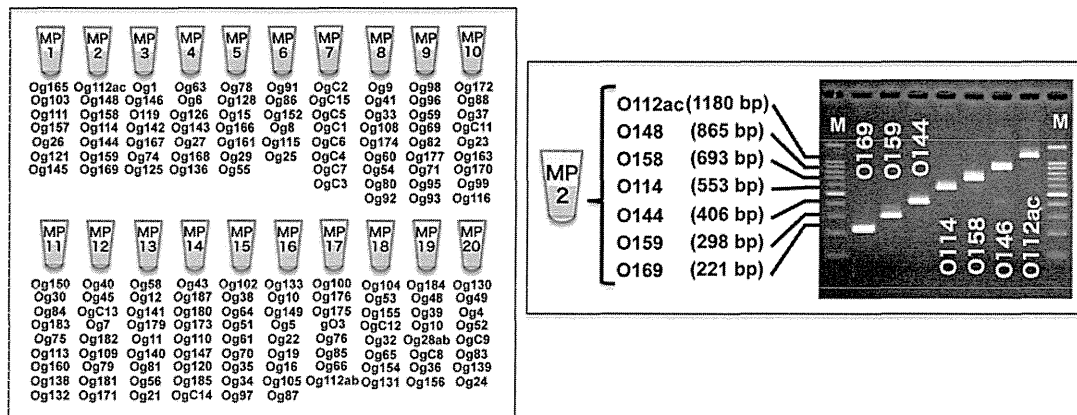


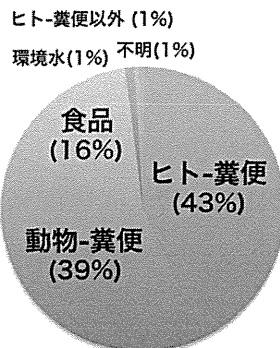
図4. マルチプレックス PCR のプライマーの組み合わせと MP-2 反応系の一例

寄せられた菌株数：381株（14機関）

[2012年11月-2013年12月]

研究所など	国立感染症研究所 国立医薬品食品衛生研究所 大阪府立公衆衛生研究所 福岡県保健環境研究所 大阪市立環境科学研究所 宮崎県衛生環境研究所 岡崎市保健所 実験動物中央研究所	大学	宮崎大学・農学部 鹿児島大学・医学部 大阪市立大学・生活科学部 日本大学・生物資源科学部
		企業	栄研化学株式会社
		病院	国立病院機構 大阪南医療センター

分離源別



病原因子別

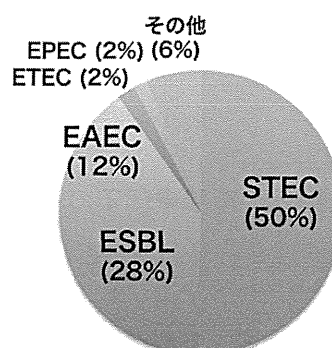


図5. 試験的タイピングネットワークの経過

表 1. 野生株を用いた O 血清群と O-genotype との対応評価

O 血清群	O-genotype	対応	菌株数
判定可	判定可	一致	335
判定可	判定可	不一致	15
判定不可	判定可	-	84
判定可	判定不可	-	20
判定不可	判定不可	-	32
判定可	複数判定	-	5
		計	491

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

抗大腸菌抗体検出系の開発に関する研究

研究分担者 勢戸和子（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 田口真澄（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）
原田哲也（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）の感染が疑われる患者の保存血清について、重症者から分離されることの多い7種類の血清群（O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165）に対する抗体価を測定した。依頼時に O157、O26 および O111 に対する抗体が陰性と判定されていた HUS 患者で、新たに O121 抗体陽性が1症例、O165 抗体陽性が4症例明らかになった。少ない血清量で多種類の抗原について抗体価を測定するには、マイクロプレート法が適している。試験管法との比較から、凝集を示した血清の希釈倍数が160倍以上の場合には陽性と考えられた。また、主な感染源であるウシ糞便40検体について、EHEC 保菌状況を調べたところ、市販血清で型別できない血清型も含めて21タイプ43株のEHECが分離された。O157:H7 や O26:H11 だけでなく、STEC autoagglutinating adhesin 遺伝子陽性の O113:H21 も分離され、ヒトへの感染と重症化への関与が危惧される結果であった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）の感染が疑われる溶血性尿毒症症候群（HUS）患者では、血清中の大腸菌抗 O 抗原凝集抗体の検出によって診断されることが多い。当研究所では、1989 年より試験管凝集反応法（試験管法）による抗体価測定を実施しており、HUS の起因菌として最も多い血清群 O157 に加えて、保育園での集団事例が多い O26 や

O111 を対象抗原としてきた。国立感染症研究所の集計では、上記の3血清群に加えて、O103、O121、O145、O165 についても重症者から分離されることが多いとされている。これらの7血清群 EHEC は、志賀毒素遺伝子（*stx*）に加えて、腸管上皮細胞への付着因子であるインチミンの構造遺伝子 *eae* を保有しており、HUS 発症のリスクは同等であると推察される。そこで、保存血清を用

いて 7 血清群に対する抗体価測定のみをのぞき、より調査を行うとともに、少ない血清量で検査可能なマイクロプレート法を同時に実施して試験管法と比較した。

また、EHEC 感染症の主な感染源であるウシ糞便については、O157 および O26 の保菌状況に関する報告は多いものの、それ以外の O 血清群について精査されているとはいえない。そこで、大阪府内で採取されたウシ糞便から EHEC を分離し、分離株の O 血清群や保有遺伝子から、ヒトに重篤な症状をもたらす可能性を検討した。

B. 研究方法

1. 血清

2000 年以降に、診断のため O 抗原凝集抗体価測定を依頼され、その後匿名化して凍結保存していた血清を使用した。

2. O 抗原凝集抗体価測定法

抗原液は、当所保存の EHEC O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165 を用い、「EHEC 検査・診断マニュアル」(国立感染症研究所ホームページ)の方法で作製した。血清は、56°C で 30 分間加熱して非働化し、PBS で 2 倍階段希釈系列を作製した。試験管法では、希釈した血清および抗原液各 0.2ml を混合し、50°C で一夜反応させた後、凝集の有無を確認した。マイクロプレート法では、コーティングされていない U 底マイクロプレート(グライナー)を使用し、希釈血清と抗原液を 25µl ずつ加えて、50°C で 2 時間反応させ、室温で 2 時間から一夜静置した後に判定した。陽性対照として病

原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を、陰性対照として PBS を抗原液と等量混合した。抗体価は、凝集を示した血清の最高希釈倍数で示し、160 倍以上を陽性と判定した。

3. ウシ糞便からの EHEC 分離

シードスワブで採取したウシ直腸便を XM-G 寒天培地(日水製薬)に塗抹し、37°C で一夜培養した。濃厚発育部位をかき取って、Scheutz らの検出用プライマー(表 1)を用いた PCR 法で志賀毒素遺伝子(*stx1* および *stx2*)を検出し(sweep PCR)、陽性平板から大腸菌と考えられるコロニーを 1 検体あたり 32 コロニー画線培養した。また、sweep PCR 陽性検体は選択剤を加えたラムノース・マッコンキー寒天培地(CT-RMAC)にも塗抹し、コロニーの色調にかかわらず発育コロニーを画線培養した。画線培養菌は複数の菌株をまとめて調製した混合テンプレートあるいは 1 株で PCR を実施し、*stx1* または *stx2* 陽性株は TSI 寒天培地(栄研化学)、LIM 培地(栄研化学)および CLIG 培地(極東製薬)で性状を確認して EHEC と同定した。

4. ウシ由来 EHEC の精査

分離した EHEC の血清型は、市販血清(デンカ生研および SSI)または自家血清を用いて型別した。H 抗原については、Machado らの方法(Res. Microbiol., 2000, 151:535-546)により *flhC* 遺伝子の PCR-RFLP 型別(*flhC* 型)も実施した。

stx1、*stx2* のサブタイプは、Scheutz らのサブタイプ用プライマーを使用した PCR 法(J.

Clin. Microbiol., 2012, 50:2951-2963) で型別し、*subA* は泉谷らのプライマー (未発表)、その他の病原性関連遺伝子は表 1 のプライマーを用いて検出した。

倫理面への配慮

保存血清は、採血時に診断以外の目的で使用することについて同意を得ていないが、新しい診断法が開発された場合の評価や新規の病原体が報告された際の「さかのぼり調査」に使用するため保存することを、当所倫理審査委員会に申請し承認されている。

C. 研究結果

1. O 抗原凝集抗体価の測定

HUS 患者 15 症例 33 検体、HUS 非発症患者 8 症例 13 検体について、7 種類の抗原液に対する凝集抗体価を試験管法で測定した。血清量が少ない検体については、マイクロプレート法を実施し、80 倍以上を示した抗原について試験管法を実施した。

HUS 患者のうち依頼時の検査で抗体陰性と判定された 9 症例については、1 症例で O121、4 症例で O165 に対する抗体が陽性と判定された (表 2)。その他の抗原に対する抗体はマイクロプレート法で陰性と判定された (表 3)。症例 3 は第 4 病日に採取された便から EHEC O165 が分離されていたが、当時分離株を抗原にして実施した測定では O165 抗体陰性と判定されていた。残りの 4 症例 8 検体については、いずれの抗原に対しても試験管法で 40 倍以下であった。依頼時に O157 または O26 に対する抗体が確認されていた HUS 患者 6 症例 14 検体は、今

回の測定でも同じ結果を示し、複数の抗原に対して抗体陽性を示した症例はなかった。

HUS 非発症患者については、全症例で依頼時と同じ結果となり、O157 抗体陽性、O111 抗体陽性、O157 および O26 抗体陽性の各 1 症例で当該抗原に対してのみ 160 倍以上の抗体価を示した。

2. 試験管法とマイクロプレート法の比較

一部未実施の抗原もあるが、20 症例 41 検体について、試験管法とマイクロプレート法を比較した (表 3)。試験管法で陽性と判定された抗原に対する抗体価は、マイクロプレート法でも 160 倍以上を示し、マイクロプレート法で 80 倍の反応は、試験管法で陰性と判定された。抗体価の高い検体では、マイクロプレート法で複数の抗原に対して 80 倍を示すことがあり、O157 抗体が 5,120 倍と高値を示した症例 11 では、O26、O111、O103、O121 の 4 抗原に対して 80 倍を示していた。

3. ウシ糞便由来 EHEC

ウシ糞便 40 検体のうち、29 検体から 21 タイプ 43 株の EHEC が分離された (表 4)。複数の EHEC が分離された検体は 10 検体あり、最多は 4 株であった。

血清型は、4 株で O 抗原型別不能 (OUT) となった以外は 14 種の O 抗原と 9 種の H 抗原に型別され、運動性陰性株は *fliC* 型で 4 種に型別できた。O174、O177、H8、H14、H25 は SSI 血清で、O22、O71、O79、O113、O171 は自家血清で型別した。

eae を保有する株は、7 検体から 8 株分離

され、このうち O157:H7、O26:H11 など 6 株は CT-RMAC から分離された。STEC autoagglutinating adhesin 遺伝子 (*saa*) 陽性株は、XM-G からのみ 8 株分離され、O113:HNM[21]は O113:H21 陽性検体から同時に分離された。*eae*、*saa* とともに陰性の株が 27 株と最も多く、中でも O174:H21 は主に CT-RMAC から 12 株分離された。

毒素遺伝子については、*stx1* 陽性株は 6 株と少なく、そのサブタイプは全株 1a であった。*stx2* 陽性株は 38 株で、2a、2b、2c、2d の 4 つのサブタイプがみられた。

その他の遺伝子では、EHEC hemolysin 遺伝子 (*ehxA*) と EAST1 遺伝子 (*astA*) 陽性は、それぞれ 18 株と 5 株で、Subtilase toxin 遺伝子 (*subA*) は *saa* 陽性の 8 株、細胞膨化致死毒素遺伝子 (*cdt*) は O113 の 7 株が保有していた。

D. 考察

これまでに抗体価測定を実施した症例の中には、EHEC 感染が疑われるにもかかわらず抗体陰性と判定された症例があった。今回のさかのぼり調査で、7 種類の血清群を抗原液として使用し、依頼時の検査で判明していた O157、O26、O111 に加えて O121 や O165 の感染を示す症例が明らかになった。大阪府で分離される non-O157 EHEC は、O26 が最も多いが、次いで O111、O103、O121、O165 が多く、このうち HUS 症例由来株は O165 が最も多い。抗体価測定の結果もこれを裏付けるものであった。

症例 3 は、発症当時の測定で O165 抗体陰性と判定されており、一致しない結果であ

った。血清量が少なかったため、試験管法は O165 のみ実施したが、マイクロプレート法では O165 抗原に対して 320 倍以上、他の 6 種類には第 4 病日の O111 を除いて 40 倍以下で、非特異反応とは考えにくい。今回抗原に使用した株は 2007 年分離株であり、発症時に使用した患者由来株ではなかったが、使用菌株によって抗原性に差が出るのかどうかは不明である。

HUS 患者は小児に多く、抗体価測定に使用できる血清量は少ないことが多い。そのため、多種類の O 抗原について測定するにはマイクロプレート法が適している。

「EHEC 検査・診断マニュアル」では、陽性判定の基準を試験管法では 160 倍（抗原を加えた最終希釈では 320 倍）以上、マイクロプレート法では 80 倍（同 160 倍）以上としているが、今回の結果からマイクロプレート法の陽性判定基準も 160 倍以上に変更した方がよいと考えられた。

今回調査したウシ糞便中の EHEC については、72.5%と高い保菌率を示した。選択性の低い XM-G でのみ分離された EHEC については、一般的な培養検査では見逃されていると考えられる。また、O157 や O26 など CT-RMAC からのみ分離された株も多く、正常細菌叢の一部である多数の大腸菌から EHEC を分離するには、選択性の異なる分離平板を併用すべきであると考えられた。ヒト糞便の培養検査では、EHEC hemolysin の溶血性を指標にした培地の使用を勧める報告がある。*ehxA* 保有と溶血性は一致しないこともあるが、今回の分離株では *eae* または *saa* を保有していた株はすべて *ehxA* 陽性で

あり、画線培養での使用がスクリーニングの一助となる可能性が考えられた。

最も多く分離された O174:H21 は、*eae*、*saa* ともに陰性であったが、この株を保菌しているウシが同じ農場で飼育されていたとしても、ウシ腸管に定着する何らかの因子を保有しているのではないかと推察された。

HUS 発症のリスク因子は Stx2 とインチミンであるとの報告は多いが、オーストラリアの HUS 患者由来 O113:H21 で見出された *Saa* と Subtilase toxin についても、細胞への付着や細胞死の誘導が報告されている。今回の結果から、日本で飼育されているウシが *saa* および *subA* 陽性の O113:H21 を保菌していることが明らかになった。大阪府では、2012 年に *saa* および *subA* 陽性の O113:HNM が血栓性血小板減少性紫斑病を発症した患者から分離されている。感染源は不明であったが、発症前に焼肉店を利用しており、日本でも *saa* 陽性 EHEC による重症例に注意が必要であると考えられた。抗体価診断に際しても、対象抗原に O113 の追加を検討したい。

E. 結論

EHEC 感染が疑われた患者の保存血清について、7 種類の抗原に対する抗体価を測定し、抗体陰性と判定されていた HUS 患者 9 症例のうち、4 症例で O165、1 症例で O121

に対する抗体が陽性と判定された。HUS 患者の抗体診断にあたっては、O157 だけでなく重症者から高頻度に分離される血清群を対象にすべきである。

少ない血清量で多種類の抗原に対する抗体価を測定する場合は、マイクロプレート法が適しており、試験管法と同じく 160 倍以上で陽性と判定できる。

ウシ糞便には多種類の STEC が存在し、*eae* 陽性株だけでなく *saa* 陽性の O113 についてもヒトへの感染と重症化への関与が危惧される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

勢戸和子, 田口真澄. 腸管出血性大腸菌感染症における抗体価測定の意義とラテックス凝集法の評価. 第 56 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 (2013 年 11 月, 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 使用したプライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	増幅サイズ (bp)	文献
<i>stx1</i>	stx1-det-F1	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	209	1)
	stx1-det-R1	AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT		
<i>stx2</i>	F4	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT	627	
	R1	ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC		
	F4-f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT		
	R1-e/f	TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC		
<i>eae</i>	SK1v2	CGAATTCGGCACAAGCATAAG	876	2)
	SK2v3	GAAATAGTCTCGCCAGTATTCCSC		
<i>ehxA</i>	hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	3)
	hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
<i>saa</i>	SAADF	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	4)
	SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
<i>cdtB</i>	CDT-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	5)
	CDT-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
	CDT-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG		
	CDT-as2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA		
<i>astA</i>	EAST-1S	GCCATCAACACAGTATATCC	106	6)
	EAST-1AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		

1) Scheutz F, et al. (J. Clin. Microbiol., 2012, 50:2951-2963)

2) Schmidt H, et al. (Med. Microbiol., 1994, 183:23-31) を改変

3) Paton AW, et al. (J. Clin. Microbiol., 1998, 36:598-602)

4) Paton AW, et al. (J. Clin. Microbiol., 2002, 40:271-274)

5) Toth I, et al. (J. Clin. Microbiol., 2003, 41:4285-4291)

6) 八柳ら (感染症誌, 1996, 70:73-79)

表 2 HUS 発症患者の抗体価(さかのぼり調査)

症例番号	年	性別	年齢	病日	抗原	抗体価 ^a
1	2000	F	4	4	O165	160
				11	O165	160
2	2001	F	8	4	O121	40
				8	O121	320
3	2001	F	3	4	O165	320
				5	O165	320
				7	O165	320
				18	O165	80
4	2003	M	7	3	O165	640
5	2004	F	2	4	O165	320
				14	O165	320

a 試験管法の測定値

表 3 試験管法とマイクロプレート法での抗体価の比較

症例番号	判定	病日	試験管法							マイクロプレート法							
			O157	O26	O111	O103	O121	O145	O165	O157	O26	O111	O103	O121	O145	O165	
1	O165	4	<20	nt	nt	nt	nt	nt	160	40	<10	<10	<10	<10	<10	160	
		11	<20	nt	nt	nt	nt	nt	160	40	<10	<10	<10	<10	<10	160	
2	O121	4	<20	nt	nt	nt	40	nt	nt	20	10	20	40	160	10	40	
		8	<20	nt	nt	nt	320	nt	nt	20	10	10	40	≥320	10	40	
3	O165	4	nt	nt	nt	nt	nt	nt	320	40	40	80	10	10	20	160	
		5	nt	nt	nt	nt	nt	nt	320	40	40	40	10	<10	<10	≥320	
		7	nt	nt	nt	nt	nt	nt	320	40	20	40	<10	<10	10	≥320	
		18	nt	nt	nt	nt	nt	nt	80	40	40	40	10	10	10	80	
4	O165	3	<20	nt	nt	nt	nt	nt	640	80	40	20	<10	<10	10	640	
5	O165	4	<20	nt	nt	nt	nt	nt	320	40	20	20	<10	<10	10	320	
		14	<20	nt	nt	nt	nt	nt	320	40	20	20	<10	10	10	320	
6	陰性	不明	<20	<20	<20	<20	20	<20	<20	<10	<10	<10	20	<10	<10	40	
7	陰性	7	20	<20	<20	20	<20	40	20	40	40	10	20	<10	80	<10	
		8	20	<20	<20	<20	<20	20	20	40	40	<10	10	<10	80	<10	
		8	20	<20	<20	20	<20	<20	20	40	20	10	20	<10	80	<10	
8	陰性	29	<20	<20	<20	<20	<20	<20	40	20	20	10	20	10	<10	40	
9	陰性	4	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	20	<10	<10	20	<10	<10	<10	
		8	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	20	<10	<10	10	<10	<10	<10	
		20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
10	O157	10	2560	<20	20	<20	<20	20	20	2560	20	20	20	20	20	20	
		16	1280	<20	<20	<20	<20	<20	<20	2560	20	10	10	10	10	20	
		19	1280	<20	<20	<20	<20	<20	<20	2560	40	10	<10	10	<10	20	
11	O157	7	2560	20	40	<20	<20	<20	20	5120	80	80	80	80	20	20	
12	O157	4	640	<20	<20	<20	<20	<20	<20	1280	20	<10	<10	<10	<10	20	
13	O157	2	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80	<10	<10	<10	<10	<10	20	
		4	320	<20	<20	<20	<20	<20	<20	320	<10	20	<10	<10	<10	20	
		6	≧1280	<20	20	20	<20	<20	<20	1280	80	40	40	40	40	20	40
		7	≧1280	20	20	20	<20	<20	<20	640	80	80	40	40	40	20	40
		8	640	<20	<20	<20	<20	<20	<20	320	80	40	40	40	40	20	40
10	80	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160	<10	10	<10	<10	<10	10	20		
14	O157	9	≧2560	<20	<20	<20	<20	<20	<20	5120	40	20	nt	nt	nt	nt	
15	O111	23	40	<20	1280	80	<20	<20	<20	80	80	320	80	<10	<10	10	
16	陰性	8	20	20	<20	20	<20	<20	<20	40	20	20	20	20	20	40	
		9	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	40	<10	<10	20	<10	20	20	
		11	20	20	20	20	20	20	20	40	20	40	40	40	40	40	
		15	20	20	20	20	20	20	20	40	20	20	20	20	20	40	
17	陰性	7	<20	nt	nt	nt	nt	nt	80	10	40	<10	<10	40	40		
18	O157/O26	7	160	160	20	40	20	20	20	320	160	20	40	10	20	20	
19	陰性	11	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
		35	80	<20	<20	80	<20	<20	40	80	20	10	80	20	20	40	
20	O157	12	2560	<20	<20	<20	<20	<20	20	2560	20	20	<10	<10	<10	40	

症例番号1～14はHUS患者(1～5は表2と同じ症例)

nt: 未実施

表 4 ウシ糞便から分離した EHEC の血清型と保有遺伝子

血清型 ^a	<i>stx</i> サブタイプ	付着性 関連遺伝子	その他の遺伝子	株数	分離培地		
					XM-G	CT-RMAC	両方
O157:H7	2c	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	3		3	
O26:H11	1a	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1		1	
O177:HNM[25]	2c	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1		1	
O119:HNM[10]	2a	<i>eae</i>	<i>ehxA, astA</i>	1		1	
OUT:H25	1a	<i>eae</i>	<i>ehxA, astA</i>	1	1		
OUT:HNM[25]	1a	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1	1		
O113:H21	2a+2d	<i>saa</i>	<i>ehxA, subA, cdt</i>	6	6		
O113:HNM[21]	2a	<i>saa</i>	<i>ehxA, subA, cdt</i>	1	1		
O91:H14	1a+2b	<i>saa</i>	<i>ehxA, subA</i>	1	1		
O174:H21	2c			12	2	6	4
O174:HNM[21]	2c			2		2	
O174:HNM[21]	2c+2d			2	2		
O171:HNM[2]	2c			3	3		
O1:H45	2a		<i>ehxA, astA</i>	1		1	
O22:H8	2b			1	1		
O71:H18	2a			1	1		
O79:H7	2a			1		1	
O136:H16	1a		<i>ehxA, astA</i>	1		1	
O168:H8	1a		<i>astA</i>	1		1	
OUT:HNM[10]	2a			1	1		
OUT:HNM[10]	2c+2d			1	1		
計				43	21	18	4

a 運動性陰性株はカッコ内に *fliC* 型を記載した

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

non-O157 EHEC のゲノム配列決定

研究分担者	林 哲也	宮崎大学 教授
研究協力者	小椋 義俊	宮崎大学 助教
研究協力者	大岡 唯祐	宮崎大学 助教

研究要旨：

代表的な腸管出血性大腸菌（EHEC）は O157 であるが、EHEC には O157 以外にも様々な血清型を有する菌株（non-O157 EHEC）が存在する。これらは、基本的には O157 EHEC と同様の病原性を有すると考えられ、行政的にも O157 と同様に扱われるが、基礎的研究や分子疫学解析などの幅広い研究を推進するために必要な全ゲノム情報の整備が遅れている。本研究では、まだ全ゲノム情報が整備されていない non-O157 EHEC の全ゲノム配列を決定し、そのゲノム情報基盤を整備することを目標とする。Shiga toxin (Stx) 産生株が存在することが最近明らかになった *Escherichia albertii* も解析対象に含める。本年度は、昨年から進めてきた 3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の完全長ゲノム配列の決定が終了し、ファージ領域等のアノテーションも終了した（他のゲノム領域については現在進行中）。また、各血清型の国内分離株・欧州分離株を収集し（血清型毎に 29～47 株）、現在、そのドラフトゲノム配列を決定中である。一方、昨年までの解析でヒトでの集団感染を起こしうる腸管病原体であることが明らかとなった *E. albertii* に関しても、昨年度に全ゲノム配列の取得に成功した 4 株（1 株は Stx2f 産生株）に次いで、24 株（Stx2f 産生株を 1 株含む）のドラフトゲノム配列を決定した。さらに、菌種内およびゲノム配列決定済みの大腸菌株とのゲノム比較により、本菌種のコアゲノム情報、遺伝的特性、大腸菌との相違点や本菌が保有する病原遺伝子群などが明らかになった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 以下 EHEC）としては O157 の血清型をもつ菌株が代表的であり、患者から分離される頻度が最も高い。しかし、EHEC には O157 EHEC 以外にも様々な血清型を有する菌株（non-O157 EHEC）が存在する。それらは、基本的には O157 EHEC と同様の病原性を有すると考えられ、我が

国の感染症法でも O157 EHEC と non-O157 EHEC は区別無く扱われている（3 類感染症）。2011 年に富山県を中心に発生した O111 EHEC による集団感染や、ほぼ同時期にドイツを中心に発生した O104 による大規模な集団感染の発生により、non-O157 EHEC の危険性、さらにはこれらの菌株に対する基礎研究の推進や種々の対策の必要性が再認識されることとなった。

non-O157 EHEC に関して、病原性の分子機構などに関する基礎的研究から分子疫学解析などに至まで、様々な角度から幅広い研究を進めていくためには、non-O157 EHEC の生物学的特性や遺伝学的特性を十分に理解することが必要である。そのためには、全ゲノム配列の決定と基本的な配列解析を行うことにより全ゲノム情報を整備し、種々に解析のための情報基盤を確立しなければならない。

O157 EHEC に関しては、2001 年に我々のグループにより O157:H7 Sakai 株の全ゲノム配列が決定された。また同年に米国のグループにより一部不完全ではあるが O157:H7 EDL933 株のゲノム配列も決定され、その後の O157 EHEC 研究の重要な情報基盤となり、ゲノム情報を基盤とした様々な研究の推進に貢献している。また、最近になって、米国の‘Spinach Outbreak’ 関連株 2 株などの全ゲノム配列も決定されている。

一方、non-O157 EHEC のゲノム解析に関しては、2009 年に我々のグループが non-O157 EHEC の中で最も分離頻度の高い O26:H11, O111:H-, O103:H2 の全ゲノム配列 (各 1 株) を決定している。しかし、海外では重要な non-O157 EHEC とされ、我が国でもその分離頻度が上記の 3 血清型に次いで上位にある O121 や O145 等については、未だにレファランスとなる全ゲノム情報が存在しないのが現状である (ただし、O145 については、本年 1 月に米国株のゲノム配列が報告された)。その 1 つの要因としては、次世代シーケンサ (NGS) の登場によってゲノム配列のスピードやコストは大幅に向上しているものの、フィニッシング技術の進歩は遅れており、完全長配列の決定には

多大な労力と経験・技術を要することが挙げられる。

本研究では、まだ全ゲノム情報が整備されていない non-O157 EHEC の全ゲノム配列を決定して、その基本的な配列解析 (遺伝子のアノテーション等) を行い、さらに数 10 株のドラフトゲノム配列を取得して比較ゲノム解析を行うことにより、各 non-O157 EHEC のゲノム情報基盤を整備することを目標とする。一方、最近の我々の研究によって、大腸菌の近縁種で新興腸管病原菌である *Escherichia albertii* の中でも、EHEC の最も主要な病原因子である Shiga toxin (Stx) を産生する株が存在することが明らかになっている。このことは、*E. albertii* も EHEC と同様な潜在的病原性をもつ可能性があることを示唆しており、*E. albertii* に対する行政的な対応を明確にしていく必要があることから、*E. albertii* のゲノム解析も合わせて実施する。

B. 研究方法

① 解析対象：最初の解析対象として、3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) から 1 株ずつを選定した。O121:H19 は神奈川で分離された HUS 患者由来株 (*stx1*-/*stx2a*+), O145:HUT は宮崎で分離された血便患者由来株 (*stx1*+/*stx2a*+), O165:H- は山形で分離された HUS 患者由来株 (*stx1*-/*stx2a*+/*stx2c*+) である。また、比較解析のためのドラフト解析対象株として、O121:H19 は 29 株 (4 株はベルギー株)、O145:HUT は 47 株 (13 株はベルギー株)、O165:H- は 39 株 (3 株はベルギー株) を収集した。

E. albertii に関しては、先行研究で MLST

解析の結果から *E. albertii* であることが確認できている菌株（国外株や動物由来株も含む）の中から、4 株（2 株は下痢患者由来株、1 株はトリ由来株、1 株は下痢患者由来の Stx2f 産生株；最初の下痢患者由来 2 株のうちの 1 株はドイツ分離株で、他は国内分離菌株）を選定し、完全長ゲノム配列決定の対象とした。さらに、24 株（1 株は Stx2f 産生株）についてはドラフトゲノム配列解析の対象とした。

② ゲノム解析：菌の培養と DNA の抽出は定法に従って行った。QIAGEN 社のカラムを用いて DNA 精製を行った後、ネブライザーを用いて DNA の断片化を行い、NGS（Roche 454 GS-FLX+と Illumina MiSeq）用のライブラリーを作成した。ライブラリー作成（shotgun library と mate pair/paired end library）および NGS を用いたシーケンス作業は、基本的には Roche 社および Illumina 社のプロトコールに従って行った。また、必要に応じて、40 kb 前後の DNA を調整し、pCC1 ベクターを用いてフォスミドライブラリーを作成した。

完全長ゲノム配列決定の基本的パイプラインは、(i)ドラフト配列の取得、(ii) フィニッシング、(iii) 配列の高精度化の 3 つの行程からなる。(i)については、当初は Roche 454 を用いて shotgun library および 8 kb の mate pair library の配列決定（重複度は通常 x30 以上）を行い、得られた配列を Newbler でアッセンブルすることにより、ドラフト配列を取得したが、途中から Illumina MiSeq による配列取得と Platanus を用いたアッセンブリに変更した。(ii)の完全配列取得のためのフィニッシング作業は、短いギャップについては、まず GenoFinisher 等を用いた

情報学的な gap closing を行った後、contig 末端に設計したプライマーを用いた PCR と PCR 産物の配列決定を行った。長いギャップについては、酷似した配列をもつ複数のプロフェージの領域等、長い繰り返し配列に由来するため、long PCR 産物のキャピラリーシーケンサあるいは MiSeq による配列決定、さらにはフォスミドライブラリーの中から、ギャップあるいは contig 末端をカバーするクローンを PCR で検索し、選定したクローンの配列を MiSeq を用いて決定することにより gap closing を行った。(iii) については、MiSeq を用いて pair end sequence を取得し、Bwa と samtools を用いて MiSeq リード配列のマッピングと SNP の抽出（配列修正）を行い、ゲノム配列の高精度化（エラー修正）を行った。ただし、MiSeq を用いて取得したドラフトゲノム配列は配列精度が高いため、この作業は実施していない。

③ 配列解析：オートアノテーション等の基本的な配列解析には MiGAP および IMC-ge ソフトウェアを用いた。相同性解析には各種の blast プログラム、また genome synteny の解析や相同領域の可視化等には GenomeMatcher 等のプログラムを用いた。

（倫理面への配慮）

全ての実験について、「宮崎大学病原体等安全管理規定」および「宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に則り、宮崎大学病原体等安全管理委員会および宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を受けた後に実施した。

C. D. 研究結果と考察

① 3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19,

O145:HUT, O165:H-) の解析 :

研究方法に記載した 3 株の完全長ゲノム配列決定が終了した (高精度化作業も含む)。表 1 に、K-12 株と O157, O26, O111, O103 EHEC と比較した 3 株のゲノム特性を示す。現在、アノテーションを行っている段階であるが、プロファージ領域、LEE 領域、病原プラスミドについては、基本的なアノテーションが終了した。その結果、昨年度の予備的解析の結果から示唆されていたように、いずれの菌株の染色体上にも、O157, O26, O111, O103 と同様に多数のプロファージが存在し、これが大腸菌としては比較的サイズの大きな染色体をもつことに大きく寄与していることが確認された。

Stx ファージについては、O157, O26, O111, O103 EHEC の Stx ファージを含めた比較解析を行った。その結果、以下の点が明らかになった。

(i) O145 の Stx1 ファージは O157, O26, O111, O103 EHEC のものと同様にプロトタイプのラムダファージに近いラムダ様ファージである。

(ii) O145 の Stx2a ファージ、O165 の Stx2a ファージ、O165 の Stx2c ファージは上記の Stx1 ファージと同様に、プロトタイプのラムダファージに近いラムダ様ファージである (図 1 参照)。

(iii) O121 の Stx2a ファージは O157 の Stx2a ファージと同様に、short tail をもったファージである (図 1 参照)。

この中で、本研究班の伊豫田らによって比較的重症化率が高いことが明らかとなっている O121 の Stx2a ファージが、重症化率の高い O157 の Stx2a ファージと類似したファージであることが注目される。Stx2a 産生

が EHEC 感染症の重症化率を決定する重要な要素であると考えられること、さらに、我々の研究室の最近の解析で、O157 菌株における Stx2a 産生量が Stx2a ファージのサブタイプと相関することが明らかになってことから、今後、Stx2 産生量とファージタイプの関連に着目した解析を、O121 を中心とした non-O157 EHEC についても実施する必要があると考えられる。

LEE 領域の解析からは、(i) コア領域の保存性は非常に高いこと、(ii) いずれも比較的小さな accessory 領域をもつこと、(iii) O145 の LEE は *selC* tRNA 遺伝子に、O121 と O165 の LEE が *pheV* tRNA 遺伝子に挿入されていることが明らかとなった。また、LEE がコードする 3 型分泌機構 (T3SS) によって分泌されるエフェクターに関しても、preliminary な解析ではあるが、いずれの non-O157 EHEC 菌株においても (i) O157, O26, O111, O103 EHEC と同様に多数の non-LEE エフェクターをもつこと、(ii) 多くの non-LEE エフェクターはラムダ様ファージにコードされていること、(iii) エフェクターのレパートリーも O157, O26, O111, O103 EHEC と良く似ていること、などが見えてきている。

プラスミドの解析からは、いずれの菌株にも大型の病原プラスミドが存在しており、O157, O26, O111, O103 の病原プラスミドと類似した病原遺伝子セットをコードしていることが明らかになった。

一方、各血清型におけるドラフト配列の取得と比較ゲノム解析については、O121:H19 では 29 株、O145:HUT では 27 株、O165:H-では 18 株のドラフト配列取得が終了している。現在、残りの菌株のシーケン