

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）
平成 29 年度 総括研究報告書

食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究

研究代表者 大西 真 （国立感染症研究所細菌第一部・部長）
研究分担者 林 哲也 （九州大学・大学院医学研究院・教授）
研究分担者 大岡 唯祐（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学・講師）
研究分担者 鈴木 匡弘 （藤田保健衛生大学医学部微生物学講座・准教授）
研究分担者 砂川 富正 （国立感染症研究所感染症疫学センター・室長）

研究要旨

腸管出血性大腸菌の調査を高度化するためのツール開発を行なった。IS-printing (IS-P) 法はスクリーニング法として各地の地方衛生研究所等で広く使用されているが、現時点では O157 と O26 のみに適用可能である。O121 に関しては、参照ゲノムの解析から IS600 と IS629 を主要な IS として同定し、この 2 つを標的候補として決定した。さらに、ISMMapper を用いた本研究で取得した 83 株のゲノム情報を利用し、IS600 と IS629 を標的とする IS-P 法の有用性が示唆された。O103 に関しては、国内分離株 73 株のゲノム情報を取得し、30 株のゲノム情報を追加取得中である。参照ゲノムの解析では、IS629 が主要な IS であることが判明し、O103 ではこれを標的 IS とすることに決定した。O111 用の IS-P として、計 600 株の O111 株のドラフトゲノム情報を基に、O111 株間における IS629 挿入部位の多様性を検証し、利用可能であることを見出した。O111 IS-printing 法のプロトタイプを作成し、PCR 条件の至適化を検討した。

また、迅速・簡易な分子疫学解析法として利用されている PCR based ORF typing (POT) 法改良の検討も行った。データベースからダウンロードしたゲノムデータを比較、検討し、菌株識別に有効と期待された 35 個の ORF について O157 以外の 6 血清型の分離株を用いた調査を行った。6 個の ORF が既存の EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与することが判明した。

IS-P および POT 法よりも高精度な手法である、MLVA 法の改善も試みた。既存の MLVA 法の対象は EHEC O157, O26, O111 に限定されているが、新規に解析遺伝子座を 26 箇所選定し既存法 (MLVA17 法) に追加することで (MLVA43 法)、O103, O121, O145 も解析可能となった。MLVA43 法では加えて O165, O91 についても解析可能であることが示唆された。NESID データと MLVA データを突合せさせるプログラムの作成と評価、改善案の検討を行った。また、より迅速な集団発生・広域散发事例の探知を目的として、過去データから算出したベースラインとの比較により、特異な患者報告数の増加を機械的に探知するシステムの開発も試みた。2017 年のデータについて遡りて調べたところ、年間のアラート発出件数は 30 件であった。アラート検知のアルゴリズムを感度、特異度、即時性の観点から検証し、改良を検討することが今後の課題である。

A. 研究目的

食中毒調査においては、迅速な探知が原因食品を市場から取り除くことにつながるため、全国地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所は EHEC 分離株の分子型別が実施されてきた。各型別法には時間、労力、解像度、多施設間比較の面で長所、短所があるため、複数の方法を組み合わせる目的に応じて使い分けている。スクリーニング法として IS-printing (IS-P) 法が開発され (Ooka et al. J Clin Microbiol 2009, Mainil et al. J Appl Microbiol 2011)、解像度は低いが簡便・迅

速・多施設間比較が容易な IS-P 法で一致した菌株は高解像度である PFGE 法で確認する手順が広がった。さらに、高解像度に多検体解析可能な MLVA 法 (Izumiya et al. Microbiol Immunol. 2010) が感染研と一部の地衛研で実施可能となり、IS-P 法と MLVA 法との組み合わせが最も迅速に結果が得られると考えられてきた。しかし、IS-P 法は O157 と O26 のみに、MLVA 法は O157, O26, O111 のみに可能であり、対象の拡大が望まれる。また、近年、新規簡易迅速型別法 (PCR-based ORF typing,

POT 法)が開発され、様々な病原細菌に応用されてきた。

本研究では IS-P 法 (0111, 0103, 0121)、EHEC-POT 法については不足するゲノム情報の取得とシステムの開発を H30 年度までに実施し、H31 年度には地方衛生研究所で試行する。MLVA 法に関しては、0103, 0121, 0145 解析用システムを H29 年度に開発し、H30 年度は試行、H31 年度には実用化する。また、わが国では分子型別法データと疫学情報との統合が困難となっているため、分子型別法の結果と疫学情報を効率良く簡便に統合するシステムも合わせて開発することを目的とした。

本総括研究報告書では、分担研究の概要と代表者が主として進める MLVA 法の対象拡大について記載する。分担研究の詳細は各分担報告書に詳述されている。

B. 研究方法

分担研究の研究手法の詳細は各分担報告書に詳述されている。

MLVA 法の対象を広げるための新規プライマーセットの作成について示した。

(1) 新規解析遺伝子座の選定

Illumina シークエンサーを用いて 0103 28 株, 0121 22 株, 0145 7 株, 0165 4 株, 026 97 株, 0111 293 株, 0157 1 株のゲノム DNA 配列を取得し、そのアッセンブルデータを基に、リピート配列部位を検索した。

候補遺伝子座に対して PCR 法で増幅反応を確認し、またリピート数の多様性を基に 26 種類の解析遺伝子座を決定した。既存の 17 遺伝子座を解析対象とした MLVA 法 (MLVA17) に新規の遺伝子座を加えた MLVA43 とした。

(2) 新規解析遺伝子座を用いた MLVA 法の検証

0103 159 株, 0121 58 株, 0145 52 株, 0165 37 株, 091 43 株を MLVA43 で解析し、同一株を MLVA17 で解析した結果と比較した。

C. 研究結果

(1) EHEC 0103, 0121, 0145 解析用システムの開発

EHEC 0157, 026, 0111 用に用いている 17 遺伝子座を用いた MLVA17 法と新規に設定した 26 遺伝子座を加えた MLVA43 法を比較した結果を図 1 に示した。MLVA17 の解析結果と比較して、異なる血清群間の MST 上での距離が離れており、血清群特異的な MLVA 型が得られることが示唆された。また、同一血清群は 1 あるいは 2 のクラスターに収束し、それぞれのクラスター内の多様性も認められ、良好な MLVA 法が作成されたことが示唆された。各血清群の解析株数と MLVA 型数、および多様性指

数を表 1 に示した。全ての血清群の解析において MLVA43 法で見出された型数は、MLVA17 法で見出された型数より多かった。さらに、多様性指数もより高い値を示した。121 および 0145 を対象にした MLVA17 法は多様性指数が 0.9 を下回っていたが、これらの血清群に対しても MLVA43 法は 0.9 以上の多様性指数を示した。

(2) 2017 年分離株を用いた EHEC 0103, 0121, 0145 MLVA 法の検証

2017 年に国立感染症研究所に分子型別解析依頼があった、腸管出血性大腸菌 2503 株 (2017 年 11 月 22 日現在) のうち、0103, 0121, 0145 が 239 株存在した (0103 株 = 132 株, 0121 株 = 67 株, 0145 株 = 40 株)。本研究で開発した MLVA 法により、それぞれ 43 種 (0103), 29 種 (0121), 16 種 (0145) の MLVA 型に分類された。多様性指数は 0.893 (0103), 0.940 (0121), 0.816 (0145) となった。

林による分担研究では 0121 および 0103 解析用の IS-P の開発が進められた。0121 解析用の IS-P の開発に関連して、83 株のゲノム配列の取得、参照ゲノムを用いた IS の分布解析がなされた。その結果、IS600 および IS629 を標的候補とされた。また、ISMMapper を用いたゲノム情報を用いた IS-P の型別能の検討が行われ、同時に ISMapper の有用性の検討もなされた。0103 解析用の IS-P の開発では、73 株のゲノム情報をえて、現在 30 株の追加解析がなされている。また参照ゲノムの解析が進められ、IS629 を標的とすることが有効であることが示唆された。

大岡による分担研究では 0111 解析用の IS-P の開発として、

- 1) EHEC O111 の IS629 挿入部位の網羅的抽出
- 2) EHEC O111 の IS629 挿入推定部位の詳細な配列解析
- 3) EHEC O111 IS-P 法プロトタイプ製の作製が行われた。

砂川による分担研究では、

- 1) NESID データと MLVA データの連携
- 2) NESID データを用いた集団発生・広域散発事例の早期探知
- 3) 海外における食中毒調査に関する疫学・病原体情報の連携に関する情報収集が行われた。

D. 考察

IS-P 法に関しては、EHEC 0103, 0121 および 0111

に関しては解析対象とするISの選定がなされた。また、型別能の評価(O121)、プロトタイプを試行(O111)が行われた。ISMapperを用いた *in silico* の解析も有効であることが示され、O103の解析にも応用可能である。

IS-P法対象血清群の拡大により、国内で相当数の患者発生があるにもかかわらず迅速型別手法が開発されていないEHEC O111, EHEC O103とEHEC O121による食中毒調査の迅速化、高度化、効率化が可能となる。本研究では同時にMLVA法の対象拡大でEHEC O103, O121を含めて、これまでより広範囲なO血清群の分子型別が可能となった。しかしながら、地方衛生研究所で実施することは、解析対象遺伝子座が増加したことで現実的には困難であると想像される。そのため、スクリーニング法(IS-P法およびPOT法)の迅速、簡便な手法の開発の意義は大きい。より多くのケースで原因を明らかにすることで、より適切な食品の取り扱い方法の提案、問題点の抽出が可能となり、より安全な食品の提供にもつながる。さらに、本分担研究の成果や開発戦略は、他のEHECや他の腸管病原菌の対策や効率的調査法の開発にも応用できる可能性が高く、食品安全性確保の推進という観点からも大きな波及効果が期待される

同時に、発生動向調査を病原体情報と組み合わせるツールを開発も重要である。可能な限り機械的に(自動的)に集団発生・広域散发事例の早期探知のためのアラート発出のツール・システムの開発を進めることが重要である。

E. 結論

分子型別法の開発が3つの手法においてほぼ計画通り進められた。また、発生動向調査に基づいたアラート発出および調査を支援するNESIDデータとMLVAデータの連携の2点についてシステ

ム・ツール開発のプロトタイプが開発が進んだ。

【参考文献】

IASR Vol. 37 p. 161-162 「牛生肉・牛生レバー規制強化後の牛生肉および牛生レバーを原因とする腸管出血性大腸菌 O157 発生状況」

<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/2016/08/438d03t01.gif>

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

松尾真奈、中村佳司、西田留梨子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也：腸管出血性大腸菌O121用IS printingの開発に向けたO121に分布するISの網羅的検索、第91回日本細菌学会総会、2018年 3月27-29日、福岡

鈴木匡弘、土井洋平、荒川宜親：ORF保有パターンによるゲノムの系統解析
第91回日本細菌学会総会 2018年3月 福岡市

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

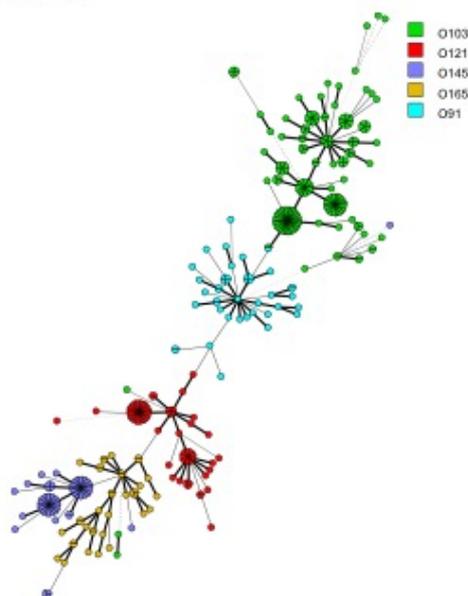
3. その他 なし

図1 新規開発 MLVA43 (MLVA17+26) と既存法 MLVA17 との比較

2つの MLVA 法で 0103, 0121, 0145, 0165, 091 株を解析し比較した。解析結果は MST 法で描画した。丸がそれぞれの菌株が示す MLVA 型で、同一の MLVA 型の場合は1つの円が分割して表示した。血清群ごとに色分けされている。異なる MLVA 型との関連は、線の太さと長さで示している

170615 add5

MLVA17



MLVA17+26

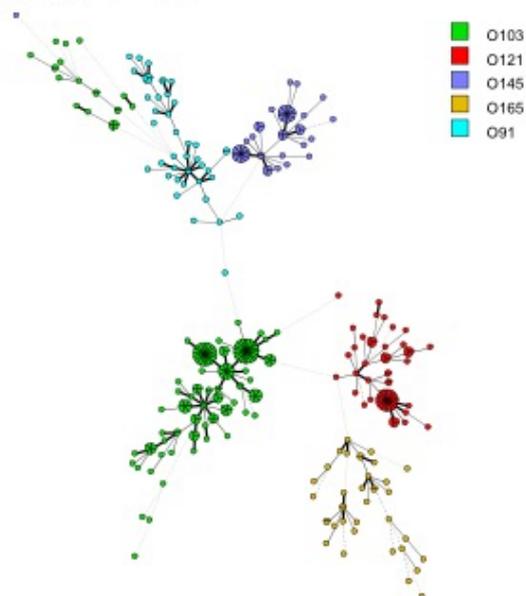


表1 各血清群ごとの MLVA17 および MLVA43 の解像度の比較

	株数	型数		多様性指数	
		MLVA17	MLVA43	MLVA17	MLVA43
0103	159	55	66	0.945	0.959
0121	58	24	34	0.857	0.912
0145	52	14	23	0.787	0.913
0165	37	27	33	0.983	0.994
091	43	33	38	0.982	0.993