

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 分担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
分担課題 EHEC O103, O121 に対する IS-P 法の開発に関する研究

研究分担者 林 哲也（九州大学・大学院医学研究院・教授）

研究要旨

IS-printing (IS-P)法は、我々がゲノム情報を利用して独自に開発した迅速かつ簡便な菌株識別手法である。本法は、極めて迅速に施設間等での比較も容易なデータが得られるため、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。本研究では、O121 用および O103 用の IS-P 法 (IS-P_O121 と IS-P_O103) を開発する。O121 に関しては、本年度は 2011～2016 年に分離された 83 株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析を行い、新規の O121 亜系統を同定するとともに、メジャー系統に属する 79 株には地理的にも遺伝系統的にも偏りが無いことが確認した。また、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 83 株の解析により、IS600 と IS629 の分布状況によって 83 株を、それぞれ 65 パターンと 74 パターンに型別でき、両方の IS を用いると 79 パターンに型別できた。この結果は、2 つの IS を標的とする IS-P 法の有用性を示唆する。O103 に関しては、2007～2017 年の国内分離株 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。O103 の高精度系統解析や ISMapper を用いた解析は、30 株のゲノム情報を追加取得後に実施する予定である。

A. 研究目的

EHEC 感染症の事例調査のために各種の分子型別法が開発され、現在は目的に応じて複数の方法が組み合わせて使われている。IS-printing (IS-P)法は、我々がゲノム情報を利用して独自に開発した迅速かつ簡便な菌株識別手法である。本法は、解像度は低いものの極めて迅速に施設間等での比較も容易なデータが得られるため、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。また、多検体処理が容易な高解像度解析法 (MLVA 法) との組み合わせによって、より強力な分子型別が可能となっている。しかし、現時点では、IS-P 法は O157 と O26 のみに適用可能であり、対象を拡大することが望まれる。本分担研究では、これまでの IS-P 法開発の経験を活かして、O121 用および O103 用の IS-P 法 (以下、IS-P_O121 と IS-P_O103) を開発する。

B. 研究方法

1. 本研究開始時点では、O121 のゲノム情報は我々と国立感染症研究所の共同研究によって蓄積出来ていたが (76 株)、O103 のゲノム情報は蓄積できていなかった。解析の基準となる株の完全

長配列 (参照ゲノム) に関しては、O103 については 2009 年に我々が決定しており、O121 についても未発表ではあるが既に我々が決定している。そこで、国立感染症研究所が収集した EHEC 分離株の中から 100 株の O103 を選択し、ゲノム情報の取得を行った。O121 についても、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使うべきであると判断し、近年分離された 85 株のゲノム情報を新たに取得した。ゲノム情報の取得にはイルミナシーケンサーと Platanus アッセムブラーを用いた。クオリティの検定は、scaffold の総長 (>5 Mb) と CheckM 解析によるコンプリートネス値 (>95%) に基づいて行った。

2. IS-P 標的候補の検索等を行う前段階として、菌株の偏り (特定の亜系統への集中など) の有無を検討した。具体的には、各株において全ゲノムレベルで SNP を同定し (SNP 同定法の詳細については割愛)、これを基に RAxML を用いて最尤法による高精度系統解析を行った。

3. IS-P 標的候補の検索を行うため、両血清型の参照ゲノムに含まれる IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を、ISFinder による検索とその検索結

果の個別解析により正確に決定した。また、上記で取得したゲノム情報と ISMapper を使って、主要 IS の各菌株での分布を解析するとともに、参照ゲノムには存在しない IS 挿入部位を検索した。

(倫理面への配慮)

本分担研究では、分離菌株とそのゲノム情報のみを扱うため、特別な倫理面での配慮は必要としない。

C. 研究結果

1. O121 の解析

(1) 国立感染症研究所から、2011～2016 年に分離された 85 株の分与を受け、ゲノム配列を取得した。O121 51104 株(西田、他：未発表)を参照ゲノムとして同定した全ゲノム SNP を用いて、これらの菌株(配列精度に問題のあった 2 株を除く 83 株)の高精度系統解析を行った結果、83 株は大きく 2 つの系統に分かれることが判明した。メジャー系統には 79 株が含まれ、その中では地理的にも遺伝系統的にも明らかな偏りがないことを確認した。マイナー系統に属する 4 株の分離地域にも偏りはなかった。

(2) 参照ゲノムの解析から、21 種類(111 コピー)の IS を同定し、IS600 と IS629 が主要な IS であることが判明した(28 コピーと 21 コピー)。このうち、プロファージとプロファージ様 Integrative element 及びプラスミドに挿入されているものは、それぞれ 24 コピーと 15 コピーであった。また、今回同定した 21 種類の IS のうち 4 種類 (ISO121-1～ISO121-4) は、既知の IS と 95%以下の相同性を示すため、新規の IS であると考えられた。以上の解析から、O121 では IS600 と IS629 がメインの IS であるため、両者を標的候補として以下の解析を行うこととした。

(3) ISMapper を用いた参照ゲノムの解析 (ISMapper の有用性の検証) では、参照ゲノム上に存在する 28 コピーの IS600 のうち、7 コピーは近傍に繰り返し配列等が存在するに検出できなかったが、21 コピーは ISMapper で検出でき、十分な精度があることが確認できた。さらに、ISMapper を用いた 83 株の検索により、IS600 の分布状況によって 83 株を 65 パターンに型別でき、参照配列上に存在しない 6 コピーの IS600 も同定できた。

IS629 に関する同様の解析では、参照ゲノム上に存在する 21 コピーの IS629 のうち 18 コピーが ISMapper で検出でき、IS629 の分布状況によって 83 株を 74 パターンに型別できた。また、参照配列上に存在しない 5 コピーが同定で

きた。

さらに、IS600 と IS629 の分布状況を合わせて用いると、83 株が 79 パターンに分類された。

2. O103 の解析

(1) 73 株(2007～2017 年の国内分離株、2014 年以降が中心)のゲノム情報を取得した。残り 30 株のゲノム情報は現在取得中である。全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析は、そのゲノム情報取得後に実施する予定である。

(2) 参照ゲノム (O103 12009 株) の解析では、27 種類 (93 コピー) の IS を同定し、IS629 が主要な IS であることが判明した (31 コピー)。このうち、プラスミドに挿入されているものは、それぞれ 9 コピーであった。また、今回同定した 27 種類の IS のうち 2 種類 (ISO103-1 と ISO103-2) は、新規の IS であると考えられる。この結果から、O103 では IS629 を標的 IS とすることに決定した。

(3) ISMapper を用いた解析は、(1) の精度系統解析と同様に、30 株のゲノム情報を追加取得した後に実施する予定である。

D. 考察

O121 のゲノム情報の取得に関しては、先行研究で取得済みの国内分離株の分離年が古く、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使うべきであると判断し、当初予定を変更し、2011～2016 年の分離株 85 株のゲノム情報を取得した。O103 に関しては、予定した 100 株のうち、73 株の情報は取得できたが、残り 30 株分については現在取得中である。

両血清型の参照株における IS の詳細な解析から、O121 では IS600 と IS629 が、O103 では IS629 が主要な IS であることが判明した (この解析で、新規 IS を同定したことは、本来の研究目的とは異なるが細菌学的には重要な研究成果である)。この結果から、O103 では IS629 を標的として決定して良いと考えられたが、O121 については IS600 と IS629 の両方を標的とする方向で検討すべきと考えられる。実際に、ISMapper を用いた *in silico* の解析では、IS600 のみでも 83 株が 65 パターンに、IS629 のみでも 74 パターンに型別できたが、両方を用いると 79 パターンに分類された。

ISMapper を用いた IS の検出に関しては、O121 の解析では、プロファージなどの上存在する IS などについては問題があるものの、参照株をモデルとした予備的な解析でも、83 株の解析でも、染色体バックボーン上の IS に関しては問題なく検出できた。また、参照配列上に存在しないコピーも同定できた。今回開発する IS-P 法では、

できる限り染色体バックボーン上の IS をターゲットとすることを考えているため、ISMMapper による IS 検索法は、今後実施する O103 の解析にも有効であると思われる。

83 株の O121 の高精度系統解析で、メジャー系統とは異なる系統が見出されたことは、予想外の発見である。このマイナー系統に属する 4 株は、ISMMapper による検索でも、IS600 と IS629 は検出できず、メジャー系統との遺伝的距離も、O157:H7 と O55:H7 との距離とほぼ同じレベルであることから、メジャー系統とは系統的に大きく離れた O121 亜系統であると考えられる。これら 4 株にも志賀毒素遺伝子やその他の EHEC 病原遺伝子が存在することは確認している。従って、この系統は IS600 と IS629 を用いた IS-P 法の適応外となるが、有症患者から分離されていることから、今後の分離動向については注意が必要である。

今後の計画としては、O103 の追加ゲノム情報の取得と系統解析や ISMapper による解析を進め、さらに両血清型において ISMapper を使った解析で同定された多数の IS コピー（挿入部位の異なるコピー）の中から、実際の IS-P 法で PCR 標的とするコピーを決定することになるが、in silico の解析から得られる各コピーの分布頻度は、極めて有用な基礎情報となる。

生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い EHEC 食中毒では、集団感染事例を迅速かつ正確に特定し、原因や感染経路を特定することが重要である。しかし、原因や感染経路等が判明しないケースも多数存在する。本研究で IS-P_O103 や IS-P_O121 が開発できれば、これと疫学情報との効果的な統合を可能とする仕組みを構築することによって、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 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。また、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。

E. 結論

O121 に関しては、2011～2016 年に分離された 83 株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析を行った結果、これまでに報告のない新規の O121 亜系統を同定するとともに、メジャー系統に属する 79 株には地理的にも遺伝系統的にも明らかな偏りがないことが確認できた。また、参照ゲノムの解析から、IS600 と IS629 が主要な IS であり、この 2 つが標的候補になることが判明した。さらに、ISMMapper を用いた解析により、IS600 の分布状況によって 83 株を 65 パターンに型別でき、参照配列上に存在しない 6 コピーが同定できた。IS629 に関する同様の解析でも、83 株を 74 パターンに型別でき、参照配列上に存在しない 5 コピーが同定できた。さらに、両方の IS を用いると、83 株が 79 パターンに分類され、この両 IS 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、2007～2017 年の国内分離株 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。高精度系統解析や ISMapper を用いた解析は、30 株のゲノム情報を追加取得した後に実施する予定である。

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

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