

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 腸管出血性大腸菌 O111 に対する IS-printing 法の開発に関する研究

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）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は溶血性尿毒症症候群や脳症など生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い感染症であり、食中毒調査において様々な集団感染事例を特定し、その原因を明確にすることが重要である。しかしながら、これまで様々な行政対応がなされてきたものの、EHEC 感染症の報告数は毎年 3,500-4,000 例と依然として多数にのぼり、血清型も O157 が中心となるが、O26, O103, O111 などの報告数も多く、原因や感染経路等が判明しないケースが多数残されている。我々はこれまでに EHEC O157 株間での挿入配列 IS629 の多様性を利用し、簡便迅速菌株識別システムとして、検査現場での利用も可能な O157 IS-printing 法を開発してきた。本研究では、そのシステムを応用して、EHEC O111 について IS-printing 法を開発することを目指した。本年度は、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、菌株識別解像度の高い挿入部位の同定を行った。その結果、菌株識別に利用可能と考えられる IS 挿入部位が、約 70 カ所（全ゲノム配列が決定された参照株 11128 株で既に同定されている 30 カ所を含む）同定された。また、IS 挿入部位周辺の配列が確認されている参照株 11128 株の IS629 挿入部位を標的として、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。

A. 研究目的

生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い EHEC による食中毒調査において、様々な集団感染事例を特定し、その原因を明確にすることで、様々な衛生規範、基準の作成、改訂につながってきた。しかしながら、EHEC 感染症の報告数は 3,500-4,000 例と依然として多数にのぼり、血清型も O157 が中心となるものの、O26, O103, O111 などの報告数も多く、原因や感染経路等が判明しないケースが多数残されている。EHEC 感染症の事例調査のために、これまで各種分子型別法が開発され、複数の方法を組み合わせて目的に応じて使い分けているが、中でも、解像度は低いものの極めて迅速に比較的容易なデータが得られるスクリーニング法である IS-printing 法 (IS-P 法) と多検体処理が容易な高解像度解析法である MLVA 法との組み合わせが最も効果的とされている。しかしながら、IS-P 法は O157 と O26 のみに適用可能であり、分離頻度の比較的高い O111 や O103 についてはまだ存在しない。本研究では、O111 について、菌株識別解像度の高い IS-P 法を開発し、臨床検査の現場で安定した結果が得られるように反応系の最適化を行う

ことを最終目標とする。

B. 研究方法

平成 27-29 年度 感染症実用化研究事業「ゲノム解析に資する下痢原性細菌感染症サーベイランスの強化及びゲノム解析を利用した迅速診断法の開発に向けた研究（感染研・伊豫田淳代表）」で取得された O111 約 600 株のドラフトゲノム情報（イルミナ MiSeq データ）を利用し、以下の流れで行った。

- 1) 全ゲノム系統樹を用いた株の選定
600 株のドラフトゲノム配列を用いて進化系統樹を作成した。その中から、系統の離れた 200 株を選定した。
- 2) MiSeq データからの IS629 配列の網羅的抽出
解析対象株 200 株の MiSeq リード配列に対して、挿入配列 IS629 を含むリードを blastn により検索した。そのうち、MiSeq ペアリードの一方のみ挿入配列 IS629 を含むリードを選別し、対となるリード配列を網羅的に抽出した。
- 3) 200 株における IS629 挿入部位の推定

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム配列を参照配列とした。項目 2) で抽出した MiSeq リード配列を Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA)を用いてマッピングし、各株における IS629 の挿入部位を推定した (図 1)。

4) 推定された IS629 挿入部位の詳細な配列解析
項目 4) で推定された IS629 挿入部位について、O111 IS-P 法の標的としての有用性を検討するため、推定挿入部位の前後 1 kbp 付近の配列を得られるように外部プライマーを設計し、IS 内部プライマーとの PCR およびシーケンシングを実施した。解析は国立感染症研より精製 DNA の提供を受けた 200 株を対象に行った。

5) O111:H- 11128 株の IS629 挿入部位 (30 カ所) を標的とした O111 IS-P 法プロトタイプ作成

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株に関しては、IS629 挿入部位約 30 カ所が既に同定されている。この株の IS 挿入部位を標的とし、O111 IS-P 法のプロトタイプを作成した。まず、IS629 の内部に共通な外向きの IS 内部プライマーを設計し、次に、各 IS 挿入部位の近傍領域に IS 内部プライマーと対をなす外側プライマーを設計した。その際、プライマー間の距離は 100 bp から 1 kbp の範囲内で、さらに標的ごとに PCR 増幅サイズが異なるように設計した (図 2)。プライマーの増幅効率の確認には、11128 株の精製ゲノム DNA を鋳型として用い、PCR 酵素には KOD Multi&EPI (東洋紡) を使用した。PCR 増幅産物のバンド解像度の確認には、2% のアガロースゲルを用いた。

(倫理面への配慮)
該当しない。

C. 研究結果

1) IS629 挿入部位の網羅的抽出

O111 株 200 株の MiSeq リードを参照株へのマッピングした結果、IS629 が挿入されていると推定され、菌株識別解像度の向上に有効と考えられる領域を約 70 カ所同定した。この中には、参照株に存在する部位含まれており、新規 IS629 挿入部位としては約 40 カ所同定されたことになる。

2) IS629 挿入推定部位の詳細な配列解析
項目 1) で同定された挿入部位について、参

照株の該当領域にプライマーを設計し、200 株を対象とした PCR および配列決定を実施した。現在までに 10 カ所の標的部位についてプライマー設計と PCR が完了しており、当該領域の配列取得作業を進めている段階にある (現在も解析を継続中)。

3) O111 IS-P 法プロトタイプの作製

図 2 に示すように 11128 株ゲノム上に存在する IS 挿入部位 30 カ所を標的に F/R プライマーセットの設計を試みた。そのうちの 5 カ所については、IS 挿入部位前後 1kbp の配列がゲノム上に複数存在することから、非特異増幅を避ける目的で PCR の標的から除外した。また、2 カ所の挿入部位に関しては F 領域が上記と同様の理由で標的から除外された。最終的に F セット、R セットはそれぞれ 25 領域、27 領域を標的とし、それぞれを 3 組 (1st-, 2nd-, 3rd-F primer set、1st-, 2nd-, 3rd-R primer set) に分けて計 6 PCR で判定出来る反応系とした。プライマー長は 19-21 bp、Tm 値は 58~62°C になるよう設計した。PCR 条件の最適化の判定には、11128 株の精製ゲノム DNA を鋳型として使用し、PCR 酵素には KOD-Multi&Epi (東洋紡ライフサイエンス) を使用した。詳細な PCR と電気泳動条件、PCR 増幅産物の泳動結果を図 3 に示した。PCR 増幅効率、電気泳動でのバンドパターンの識別には問題がないことを確認した。

D. 考察

本年度の解析により、O111 株 200 株のドラフトゲノム配列情報を用いて、200 株のゲノム上の IS629 挿入部位を多数推定することが出来た。現在、IS-P 法の標的として利用可能かどうかを検証するため、挿入部位周辺の配列決定を行い、株間での配列保存性や菌株識別解像度の検討を試みている。

全ゲノム配列決定株 11128 株の IS 挿入部位 30 カ所を標的としてプライマーを設計した IS-P 法プロトタイプに関しては、現在 27 カ所を標的として 3 組 (各 F, R) のプライマーセットを作成しており、PCR 条件については、今回実施した手法である程度の最適化が出来たと考えられるが、PCR 増幅効率をより改善するための検討も必要と思われる。今後、新たに同定された約 40 カ所の情報を加えて、さらに標的部位を厳選する必要がある。来年度は、得られた IS 挿入部位周辺の配列情報を精査し、より解像度の高いプライマーセットを作成して、最終的には 1 組の F, R セットとしての完成を目標として進める。

また、600株の系統解析の結果と比較し、分離頻度の高い系統に関して菌株識別解像能が得られていない場合には、その系統の株を複数株新たに選定し、ドラフトゲノム配列情報を用いた追加解析を行って、標的部位を抽出することも想定しておく必要がある。

E. 結論

系統の異なるO111分離株200株のドラフトゲノム配列を用いた参照株11128株へのマッピング解析により、IS-P法の標的となるIS629挿入部位を約70カ所(参照株におけるIS挿入部位30カ所を含む)同定することができた。また、11128株のIS挿入部位約30カ所を標的とし、IS-P法のプロトタイプとなるプライマーセットを構築した。実際の検査現場で菌株コロニーから粗精製したDNAを用いて安定した結果が得られるようにするためには、まだ検討の余地があるものの、PCR反応条件ならびに泳動条件の至適化もある程度完了した。マッピング解析により、200株のゲノム上に11128株のIS挿入部位と同じ挿入部位が多数検出されていることから、プロトタイプにおいてもある程度の菌株識別解像度が得られると思われる。次年度以降、本研究で同定した200株で新たに同定されたIS挿入部位を精査し、IS-P法の標的としてプロトタイプで作成した標的と入れ替えることにより、より菌株識別解像能の高い挿

入部位を標的としたプライマーセットに更新することが期待される。最終的には、当初の解析対象株600株についてのIS-P結果を蓄積し、検査現場で利用可能なO111 IS-P法を完成する。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

【PCR反応液】 [15 µl scale]

Template DNA	1
Primer outside mix (4.5µM each)	1
Primer IS629Inside (25pM)	1
2x PCR buffer	7.5
D.W.	4.2
KOD-Multi-&EPI	0.3
Total	15

* primer final conc.: 0.3µM

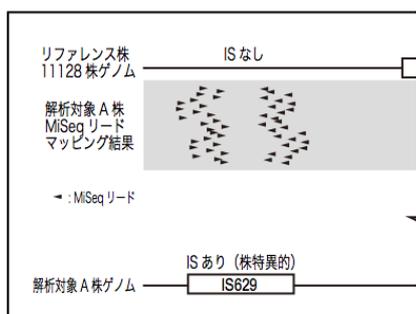
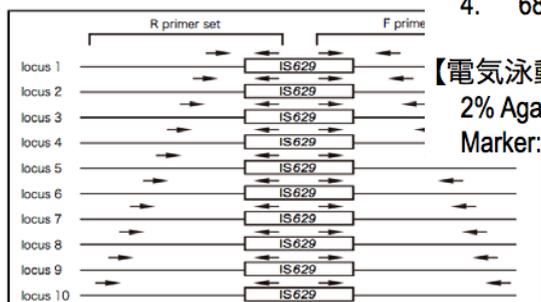


図1 マッピングによるIS629挿入があるかどうかを推定

【PCRプログラム】3 step

1. 94°C 2 min
2. 98°C 10 sec step 2-4: 25 cycles
3. 58°C 30 sec
4. 68°C 1 min

マッピングの結果から、解析対象株にIS

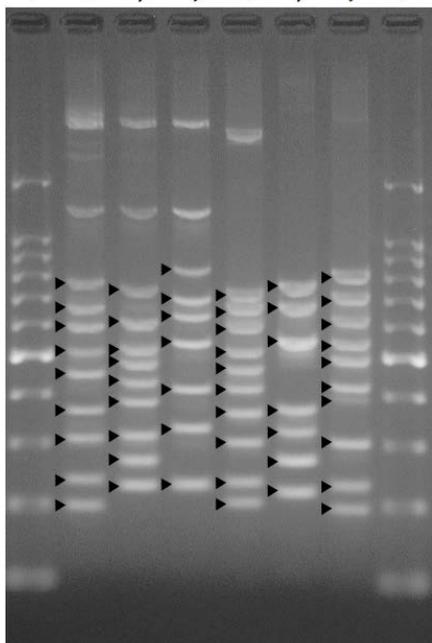


【電気泳動】

2% Agarose S in 0.5 x TBE
Marker: 100 bp ladder

図2 O111 IS-P法の模式図. IS内部に外側へ向けて設計したIS内部プライマーと対になるように外側プライマーを設計することで、ISの前後にFセット、Rセットを設計する。

100 bp ladder
1st_R set
2nd_R set
3rd_R set
1st_F set
2nd_F set
3rd_R set
100 bp ladder



▶: 陽性バンド
(F set 計 27 本, R set 計 25 本)

図3 O111 IS-P法プロトタイプに至適条件およびPCR産物泳動結果. 至適条件でPCRを行った結果、参照株11128株DNAを用いた場合、Fセット(計27本)、Rセット(計25本)がバンドはほぼ均一に検出されており、PCR増幅サイズの識別も可能である。