

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-POT 法の開発

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）
研究協力者 山田 和弘（愛知県衛生研究所・主任）

研究要旨

近年増加している non-0157 の腸管出血性大腸菌（EHEC）の迅速・簡易な分子疫学解析法として PCR based ORF typing (POT) 法改良の検討を行った。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 0157 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。さらに有効な ORF の検索を進めることで、多くの EHEC 血清型株を汎用的にタイピングできる POT 法の開発が可能であると期待される。

A. 研究目的

EHEC 感染症の原因菌として以前は 0157 が最も多く 026 と 0111 を加えた 3 血清型が大半を占めていたが、近年は上記 3 血清型に加え、0103 や 0121 等多様な血清型が検出されるようになった。さらに EHEC による diffuse outbreak も毎年のように報告され、全国で検出される EHEC の分子疫学情報を迅速に把握する手段を講じることが急務である。短時間かつ容易に実施可能で、遺伝子型の共有が容易である分子疫学解析法として 0157 については IS-printing system が市販され、全国の地方衛生研究所に普及している。しかし、0157 以外の血清型については簡易なタイピング方法は利用されておらず、その開発・普及が望まれる。

一方、愛知県衛生研究所では、マルチプレックス PCR による簡易な分子疫学解析法として PCR based ORF typing (POT) 法を開発し、大腸菌も含め 4 菌種について市販され、医療現場における感染管理に利用されている。POT 法では菌株毎の保有状態が異なる ORF の検出パターンを遺伝子型とするが、市販されている大腸菌用 POT 法は主に ST131 の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌をターゲットとしている。そのため、EHEC をタイピングした場合、菌株識別能力が低く、実用的ではない。EHEC をターゲットとした POT 法のセットも開発されているが、菌株識別能力は不十分で全国調査に利用できるレベルには達していない。そこで、本研究では新たな検

出 ORF を追加することで EHEC 用 POT 法の菌株識別能力を向上させ、実用的な分子疫学解析法に改良することを目的とする。

B. 研究方法

In silico による ORF の探索

ゲノムデータとしてインターネットデータベース上の EHEC 026、091、0103、0111、0121、0145 の全ゲノム情報（ドラフト配列を含む）を使用した。ゲノムデータはアノテーション情報あるいは prodigal による ORF 予測結果に基づき ORF 単位に分割した。ORF 塩基配列を比較し、ユニークな ORF のセットを作成し、さらに各ゲノムにおける前述の ORF の有無を検索し、1, 0 に置き換えることで、ゲノムデータを二値化した。二値化したゲノムデータを比較し、各血清型の EHEC 株を特徴付ける ORF の探索を行った。

分離株を用いた ORF 保有状態調査

In silico で予測された検出 ORF 候補の中からプライマー設計が可能であった 35 個の ORF について、愛知県衛生研究所で保存されている EHEC を用いて、ORF 保有状態を調査した。用いた株は 026 25 株、0103 8 株、0111 7 株、0121 3 株、0145 3 株、0165 2 株である。

（倫理面への配慮）

本研究は公開データおよび患者データが切り

離された分離菌株のみを扱うため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

検討した全ての血清型で汎用的に菌株識別できると予測された ORF は見つからなかったが、2-4 血清型で菌株識別に利用可能と予測される ORF が 40 個見つかった。この 40 個の ORF の保有パターンによって、in silico においては検討で用いたゲノムデータ株の多くが識別可能であった。40 個の ORF のうち、プライマー設計が可能であった 35 個についてプライマーを作成した。

分離株による 35 個の ORF の保有状態調査の結果、35 個すべては菌株により保有状態は異なっていたが、EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与したのは 6 個のみであった。この 6 個を従来の EHEC 用 POT 法と組み合わせると、従来分けられなかった株の多くが識別可能となった。

D. 考察

In silico による検索から多くの検出候補 ORF が見いだされたが、分離株を用いた調査では利用可能なものは限られていた。用いたゲノムデータの多くはドラフトであったことから、検索から漏れた配列が多く存在した可能性がある。また、データの多くは海外の研究者が登録したと考えられることから、日本で検出されるものとは遺伝的な特徴が異なる可能性も考えられる。

今回は non-0157 の EHEC 保存株が少なかったため、分離株による検討が十分とはいえない。株数を増やし、検討を加えることが必要である。

今回の検討は限定的であったにもかかわらず、

既存の EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与する ORF が見つまっている。有効な ORF をさらに探索することで、多くの EHEC に汎用的に使える POT 法の揮発が期待できる。

E. 結論

既存の EHEC 用 POT 法を改良するために必要な、菌株識別用 ORF はまだ存在し、さらに探索を進めることで、多くの EHEC 血清型を分子疫学解析可能な、EHEC 用 POT 法の開発が可能である。

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

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