

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 30 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、施設間等での比較も容易なデータが極めて迅速に得られるため、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 用及び O103 用の IS-P 法（IS-P_O121 と IS-P_O103）を開発する。本年度は、IS-P_O121 と IS-P_O103 は 15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR のシステムとすることを決定し、この方針に基づいて両 IS-P の開発作業を進めた。IS-P_O121 の開発では、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解析パイプラインを構築し、これを用いて標的部位の決定、PCR 用プライマーの作成、PCR 条件の最適化を行った。また標的となる 15 領域をプラスミドにクローニングすることによって陽性コントロールを作成した。IS-P_O103 の開発に関しては、昨年取得した O103 菌株のゲノム情報を使った高精度系統解析から、O103 には複数の亜系統が存在することや参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナー亜系統に属することが判明した。そのため、この問題への対応として、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得した。その解析から、IS629 が標的 IS として問題がないことといずれの株も参照ゲノムとして利用できることが確認できた。このような状況から、IS-P_O103 の開発は当初予定より遅れたが、O121 の解析で開発したパイプラインを用いることができることなどから、比較的早期に標的部位を決定し、プライマー及び陽性コントロールの作成ができると考えている。

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（地衛研）で広く使用されている。また、多検体処理が容易な高精度解析法（MLVA 法）との組み合わせによって、より高精度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 O157 用と O26 用 IS-P 法の開発経験を活かして、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

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（感染研）の共同研究によって蓄積できていたが（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、昨年度は、感染研が収集した EHEC 分離株の中から 100 株の O103 を選択し、73 株のゲノム情報を取得した。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 83 株のゲノム情報を取得した。また、これらの情報を基に高精度系統解析を行い、メジャー系統に属する 79 株と、大きく系統が異なるマイナー系統に属する 4 株を同定した。さらに、両血清型の参照ゲノムに含まれる IS の種類やコピー数などを検索し、O121 の主要 IS として IS600 と IS629 を、また、O103 の主要 IS として IS629 を同定し、それぞれの IS-P 法の標的 IS に決定した。O121 については、上記

83 株の IS600 と IS629 の分布を検討した結果、マイナー系統に属する 4 株には IS600 と IS629 は少数のコピーしか存在しないことから、IS-P_O121 の対象としては考慮しないこととした。一方、メジャー系統に属する 79 株については、IS600 と IS629 を用いた IS-P_O121 には十分な解像度が期待できることを確認した。以上の結果を基に、本年度は以下の解析を行った。

1. O121 の解析

(1) メジャー系統に属する 79 株における ISMapper を用いた IS600 と IS629 の分布・局在情報を基に、挿入部位近傍の配列の解析を行い、近傍に IS の存在する IS コピーを同定した。これらを標的候補から除外した後、IS600 と IS629 挿入部位の上流下流に分けて 4 セットの IS 挿入部位データセットを作成し、クラスタリング解析を行うことにより、最も解像度の高い組み合わせを選択できる解析パイプラインを構築した。

(2) 上記のパイプラインを用いて 15 箇所の IS600 または IS629 の挿入部位を標的部位として決定し、マルチプレックス PCR 用のプライマーを作成した。また、酵素、プライマー濃度等に関する至適条件を検討した。

(3) 配布用の陽性コントロールを作成するため、IS-P の標的となる 15 領域を pUC プラスミドにクローニングした。

2. O103 の解析

(1) 昨年度に取得した 73 株のゲノム配列から、全ゲノムレベルで各株の SNP を同定し (SNP 同定法の詳細については割愛する) この情報を基に RAxML を用いて最尤法による高精度系統解析を行った。

(2) 上記の解析結果から、O103 には複数の系統が存在し、以前に完全長配列を決定した参照ゲノム株は、マイナーな系統に属することが判明したため、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、ナノポア社の MinION を用いて long read sequencing を行った。さらに Unicycler を用いてイルミナ配列との hybrid assembly を行い、3 株の完全長配列を取得した。また各株において、ISFinder を用いて IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を検討した。

(3) ISMapper とは異なる IS 解析プログラムである ISseeker の性能 (検出感度と正確性) を検討した。また、ISMapper を使って、79 株における IS629 挿入部位を再度解析した。さらに、O121 の解析で開発したパイプラインを用いて、最終的な IS-P 標的部位の決定を行った。

(4) IS-P データの検証用データとして、新たに 29 株の O103 を収集し (感染研からの分与が難しかったため、各地の地衛研から直接分与を受け

た) 他の菌株と同様にイルミナシーケンサーと Platanus アッセンブラーを用いてゲノム配列を取得した。

(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 においても O103 においても、最終的な IS-P 法としては、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR のシステムとすることに決定した。

2. O121 の解析

(1) メジャー系統に属する 79 株の ISMapper を用いた解析と挿入部位近傍配列の解析から、近傍に IS の存在する IS コピーを同定し、これらを除いた IS600 と IS629 挿入部位の上流下流それぞれについて、19 箇所の標的候補部位を決定した。これらを組み合わせた 4 セットの標的候補部位データセットを作成し、クラスタリング解析を行うことにより、最も解像度の高い組み合わせを選択できる 15 箇所の IS600 と IS629 の挿入部位を最終的な PCR 標的部として選択した (候補部位選定のパイプラインの構築)。この際、プラスミド及び同じプロファージ (別研究の解析で保存性が高いことが判明している Stx2 ファージを除く) からは 1 箇所のみを選択することにより、プラスミドやプロファージの脱落による影響を抑える工夫をした。

(2) 決定した 15 箇所の標的部位を標的としたマルチプレックス PCR 用のプライマーを作成し、使用する酵素の種類やプライマー濃度等に関して条件検討を行い、PCR 条件の至適化を行った。

(3) 上記の 15 標的部位が 1 株のゲノム上には存在しないため、特定の株を陽性コントロールとして使用することができないことが判明した。そこで、IS-P 法の標的となる 15 領域を pUC プラスミドにクローニングし、配布用の陽性コントロールを作成した。現在、この陽性コントロールに含める各プラスミドの濃度に関して最終的な検討を行っているところである

3. O103 の解析

(1) 73 株のゲノム配列を基に高精度系統解析を行った結果、O103 には複数の亜系統が存在すること、また以前に我々が完全長配列を決定した株 (参照ゲノム予定株) は、マイナーな亜系統に属することが判明した。この結果に対応するため、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、long read sequencing とイルミナ配列との hybrid

assembly を行い、3 株の完全長配列を新たに取得した。完全長配列を用いて、各株における IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を検討したところ、IS629 が主要 IS であった。この結果から、IS-P_O103 の標的 IS を IS629 から他の IS に変更する必要がないことを確認した。

(3) ISseeker の性能 (検出感度と正確性) を検討した結果、read mapping による新規挿入部位の検索に関しては、ISMMapper の方が適していると考えられた。そこで、IS-P 標的候補部位の検索を行うため、79 株における IS629 挿入部位の検索を、3 株の完全長配列を加えて、ISMMapper を用いて再度実施した。現在、この結果を基に、O121 の解析で開発したパイプラインを用いて、15 箇所 IS-P 標的部位の決定を行っているところである。

(4) 新たに 29 株の O103 を各地の地衛研から収集し、他の菌株と同様にゲノム配列を取得した。本データは、IS-P データの検証用に使用する予定である。

D. 考察

最終的な IS-P としては、IS-P_O121・IS-P_103 とともに、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR を作成することに決定した。2 チューブを用いてさらに多数の標的部位を解析する系を作成することも可能であり、解像度の向上もある程度期待できるが、現場での作業の煩雑性やコストだけでなく、プライマーやコントロールの安定的な供給という面を考慮すると、妥当な判断ではあると考えている。

IS-P_O121 の開発に関しては、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解析パイプラインを構築できた。これを用いて 15 箇所の標的部位を決定し、PCR 用 primer の作成と PCR 条件の至適化を行うことができた。また、IS-P_O157 などの場合と異なり、特定の株を陽性コントロールとして使用することができないことが判明したが、これに対する対応として、標的となる 15 領域をプラスミドにクローニングし、その DNA 混合液の陽性コントロールとして配布することとした。PCR の陽性コントロールとしては問題がないと考えている。なお、標的部位の選択において、プラスミド及び同じプロファージからは一箇所のみを選択するという工夫を行ったが、これにより、IS-P_O157 においてみられたプラスミドやプロファージの脱落による影響を少なくできると思われる。

IS-P_O103 の開発においては、O103 には複数の亜系統が存在することと参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナーな亜系統に属することが判明した。この予想外の結果への対応とし

て、比較的主要な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得したが、各株の主要 IS は IS629 であったことから、IS-P_O103 の標的 IS を IS629 とすることに問題がないと言える。また、これら 3 株はいずれも参照ゲノムとして利用できる。このような状況から、IS-P_O103 の開発作業は当初の予定より遅れているが、79 株における IS629 挿入部位の再検索を終え、IS-P 標的部位の決定を行っているところである。しかし、O121 の解析で開発したパイプラインを用いることができ、PCR 条件の検討に関しても一部は IS-P_O121 のものと重なるため、比較的早期に最終的な標的部位を決定して、プライマー及び陽性コントロールの作成ができると考えている。

今後の計画としては、IS-P_O121 に関しては、現在、陽性コントロールに含める各プラスミドの濃度の検討が終了次第、各地の地衛研にプライマー、プロトコル、陽性コントロールを配布し、現場で試験的な利用の段階に進むことができると考えている。IS-P 標的部位の決定を現在行っている IS-P_O103 に関しても、早期に現場で試験的な利用の段階に進むことができると考えている。

重症合併症を併発する EHEC 食中毒では、集団感染事例を迅速に検出し、原因や感染経路を特定することが重要であるが、原因や感染経路等が判明しないケースも多い。本研究で IS-P_O103 や IS-P_O121 が開発できれば、他の分子疫学解析手法や疫学情報と効果的に統合することによって、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 O103 EHEC と O121 EHEC による食中毒調査の迅速化、高度化、効率化が可能となる。結果として、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 (特にゲノム情報基盤や IS 解析のパイプライン) は、他の EHEC や腸管病原菌に対する対策や効率的調査法の開発にも応用できるため、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

IS-P_O121・IS-P_103 とともに、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR を作成することに決定し、この方針に基づいて両 IS-P の開発作業を進めた。IS-P_O121 に関しては、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる解析パイプラインを構築でき、これを用いて標的部位の決定し、PCR 用プライマーの作成と PCR 条件の至適化を行った。また、IS-P 標的となる 15 領域をプラスミドにクローニングすることによ

って、PCR の陽性コントロールを作成した。IS-P_O103 の開発においては、O103 には複数の亜系統が存在することや参照ゲノムとしての使用予定であった株がマイナーな亜系統に属することが判明したため、この問題への対応として、比較的 주요な 3 つの亜系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を新たに取得した。IS-P_O103 の標的 IS を IS629 とすることに問題がないこと、またはいずれの株も参照ゲノムとして利用できることが確認できたが、IS-P_O103 の開発作業は当初の予定より遅れた。しかし、O121 の解析で開発したパイプラインを用いることができ、PCR 条件の検討に関しても一部は IS-P_O121 のものと重なるため、比較的早期に最終的な標的部位を決定して、プライマー及び陽性コントロールの作成ができると考えている。

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

谷口愛樹, 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 system の開発を見据えた O121 に分布する IS の網羅的探索と国内分離株における分布状況の調査、腸管出血性大腸菌研究会、2018 年 11 月 8~9 日、東京

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