

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 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る。そのため、集団感染事例を特定し、感染源を明確にすることが重要であるが、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 例と依然として多く、血清型も O157 が中心であるものの、O26, O103, O111 などの報告数も多い。また、原因や感染経路等が判明しないケースも多数残されている。我々はこれまでに EHEC O157 ゲノムにおいて挿入配列 IS629 の局在が株間で多様である点を利用し、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、参照株である 11128 株の IS629 挿入部位を標的とした O111 IS-P 法プロトタイプ（FS1~3, RS1~3 の 6 セット[計 52 カ所]）を構築した。それをを用いて系統の異なる 206 株についての菌株識別解像度検定を実施した結果、206 株を 149 パターンに識別することが出来た。また、この検定により、非特異的増幅がみられる、PCR 増幅効率が低い、菌株識別解像度が低い（PCR 陽性が 5 株未満、あるいは 190 株以上）、FS および RS（IS 両サイド）で結果が同じになる等の非効率なプライマーを同定し、選別・除去することによって FS, RS とともに 12 領域のプライマーの選定が完了した。

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ることで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

1) O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証

昨年度の研究で参照株 11129 株の IS629 挿入部位の情報を基に O111 IS-P 法プロトタイプ（FS1-3, RS1-3 の 6 プライマーセット[標的部位、計 52 カ所]）の構築が完了した。本年度は、O111 分離株のゲノム DNA を用いてプロトタイプの菌株識別解像度についての検証を行った。検証には、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）を基に高精度系統解析を行い、その中から系統の離れた 206

株を選定して実施した。PCRにはKOD-Multi&EPI(東洋紡)を用い、PCR反応液の組成は計15 μ l(template DNA 1 μ l、外部プライマーミックス[各4.5 μ M] 1 μ l、IS629内部プライマー[25 μ M] 1 μ l、2 \times PCR buffer 7.5 μ l、MilliQ水 4.2 μ l、KOD-Multi&EPI酵素 0.3 μ l)、PCRプログラムは94 $^{\circ}$ C 2min、30サイクル(98 $^{\circ}$ C 10秒、58 $^{\circ}$ C 30秒、68 $^{\circ}$ C 1分)、電気泳動は2% Agarose S(ニッポンジーン) in 0.5 \times TBEバッファーを用い、PCR反応液1 μ lを泳動するという条件で実施した(図1)。得られたPCR増幅バンドの有無(有りを「1」、無しを「0」)をデジタル化し、Clusterソフトを用いてバンド情報を基にしたデンドログラムを作成した(図2)。

2) 非特異増幅プライマーの同定

項目1)で実施したPCR結果判定に際し、目的サイズと明らかに異なるバンドが検出される株があった場合、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別PCRを行って、どのプライマーに由来する非特異増幅バンドかを同定した(図3)。

3) 菌株識別解像度の低いIS629挿入部位の抽出

O111 IS-P法プロトタイプからの菌株識別解像度向上ならびに検査現場で対応可能なプライマーセット(2プライマーセット)の最終構築のため、まず、プロトタイプにおいて識別解像度が低いIS629挿入部位の同定を試みた。項目1)の解析結果から、PCR陽性が5株未満、180-190株、190株以上という基準で該当領域を抽出し、必要に応じて該当プライマーを除去した。

4) 菌株識別解像度向上に向けた新規IS629挿入部位の検討

昨年度の研究において200株のドラフトゲノム情報から新たに同定したIS629挿入部位の中で、図4において菌株識別解像度が低かった系統を中心に解像度向上が見込まれる標的部位を抽出した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

1) O111 IS-P法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証 IS629挿入部位の網羅的抽出

系統の離れたO111 206株について、IS-P

法プロトタイプ6プライマーセットを用いたPCRを実施した。その結果、各プライマーセットにより泳動パターンに違いが見られることが分かった(図1: FS1セットの泳動例)。6セットのPCRにより得られたバンドパターンを基にclusterソフトでデンドログラムを作成した(図2)。その結果、206株が149パターンに分かれること、同じバンドパターンを示す株が2株(23タイプ)、3株(7タイプ)、4株以上(5タイプ)検出されること、また、計52領域の標的に対して検出バンドの本数が15本未満の株が19株存在することなどが明らかとなった。

2) 非特異増幅プライマーの同定

図3の例に示すように、FS1-3およびRS1-3のプライマーセットによるマルチプレックスPCR結果を検証する際、増幅されたバンドの中に目的サイズと明らかに異なるものが見られる株が複数検出された。これらの株について、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別PCRを行うことで、その非特異増幅バンドがどのプライマーに由来するかを同定した。この解析により、計8個の外側プライマーをプロトタイプから削除した。

3) 菌株識別解像度の低いIS629挿入部位の抽出

項目1)の解析結果から、PCR陽性が5株未満であった部位を9カ所、180-190株でPCR陽性であった部位を8カ所、190株以上でPCR陽性であった部位を2カ所同定した。この結果を基に、同定した計19カ所のうち、190株以上でPCR陽性であった1カ所を除く18カ所について標的候補から削除した。なお、190株以上で陽性となった1カ所については、PCRの陽性コントロールとして採用した。

項目2)、項目3)の過程を経てプロトタイプから採用されたプライマーセットでは、206株が108パターンに分かれ、菌株識別解像度が極端に下がる系統も見られた(図4)は

4) 菌株識別解像度向上に向けた新規IS629挿入部位の検討

200株のドラフトゲノム情報から新たに同定したIS629挿入部位について、項目2)、3)で選別したプライマーセットの結果から得られたデンドログラム(図4)の結果にその有無をプロットした結果、菌株識別解像度が図5のように164パターンへと向上した。

D. 考察

本年度の解析により、O111 IS-P 法プロトタイプに関して、菌株識別解像度の検証と不具合のあるプライマー(標的部位)の同定が完了した。現在、200 株のドラフトゲノム情報から得た新規 IS629 挿入部位について、菌株識別解像度向上のためのプライマー入れ換えを進め、最終セットの構築を進めている段階にある。

来年度は、最終プライマーセットで標的となった各領域に対するプライマーを設計し、PCR 増幅・プラスミドヘクローニングして、濃度調整等を行い、PCR 時のコントロール DNA とする。また、最終セットおよびコントロール DNA を協力機関に試用版として配布し、個々の機関で同様の結果を得られるかを検討し、PCR 機器の違いなどにより不具合が見られた場合には、プライマーおよび PCR を再度至適化し、共通の結果が得られるように検討する。また、今後、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

O111 IS-P 法プロトタイプの検証により、不具合のあるプライマーなどを削除した結果、系統の異なる O111 分離株 206 株を 108 パターンに分類することが出来た。現在、200 株のドラフトゲノム情報から得た新規標的部位を加えてさらに菌株識別解像度を高め、最終的に FS, RS の 2 プライマーセットで対応できるシステムの構築を進めている。今後、実際の検査現場で安定した結果を得

るため、協力機関で試用版の検討を行い、得られた結果をフィードバックして、プライマー等の最適化を進める。また、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 PCR 反応条件ならびに泳動条件の至適化も実施し、最終的に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

大岡唯祐、李謙一、桂啓介、伊豫田淳、蘭牟田直子、林哲也、大西真、西順一郎：腸管出血性大腸菌 O111 用 IS-printing system の開発、第 22 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、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

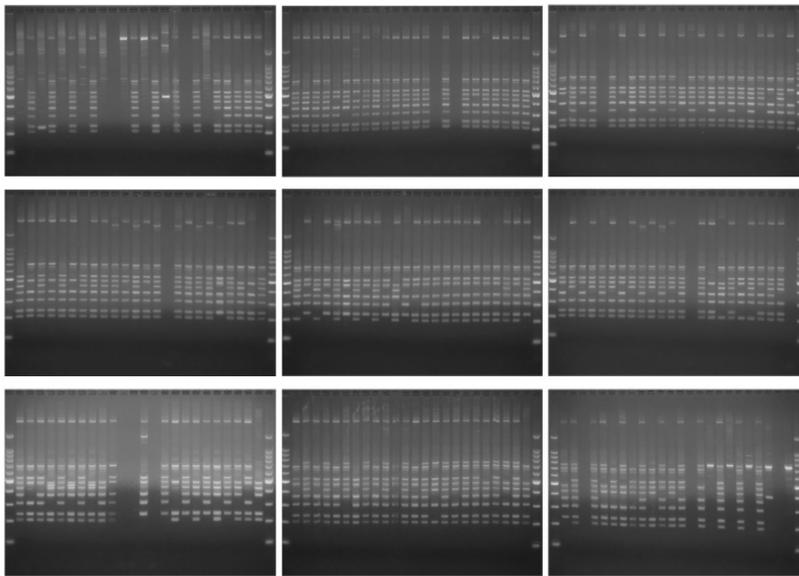


図1 O111 IS-P 法プロトタイプによる 206 株の PCR・電気泳動結果の例 (FS1 プライマーセット)。
206 株で異なるバンドパターンが得られているが、全くバンドが検出されない株やほぼ全株で検出されているバンドがある。

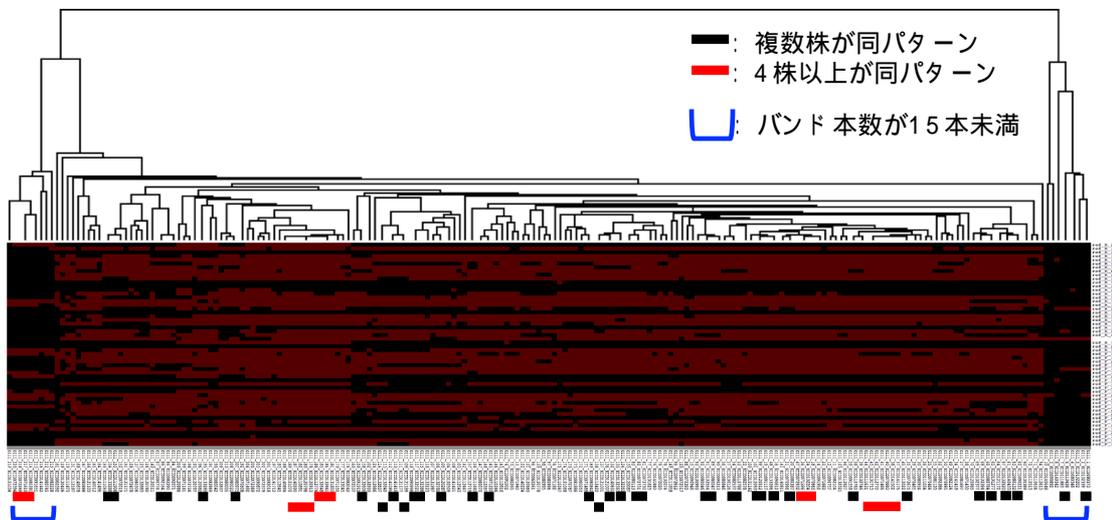


図2 O111 IS-P 法プロトタイプ 6 プライマーセットによる PCR 結果のデンドログラム
FS1-3 および RS1-3 の 6 プライマーセットによる結果から、149 パターンに分類されたが、複数株が同じパターンを示す場合なども見られた。

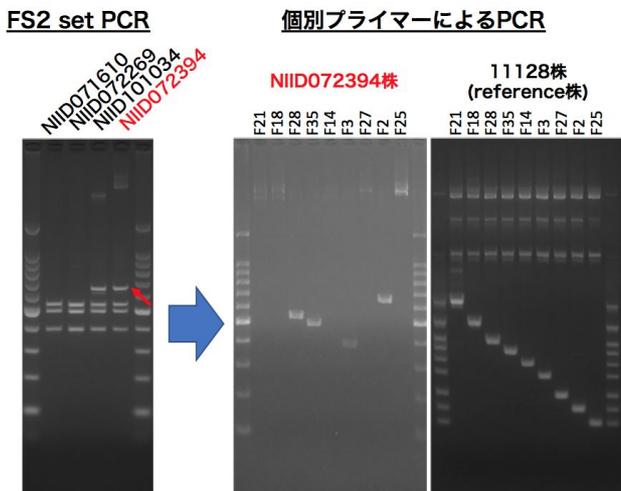


図3 非特異増幅によるバンド検出とその原因プライマーの同定の例 (FS2 セット、NIID072394 株)
NIID072394 株 (および NIID101034 株) で見られた非特異増幅バンド (赤矢印) について個別 PCR による検証の結果、F2 プライマーにより該当バンドが検出されることが判明した。

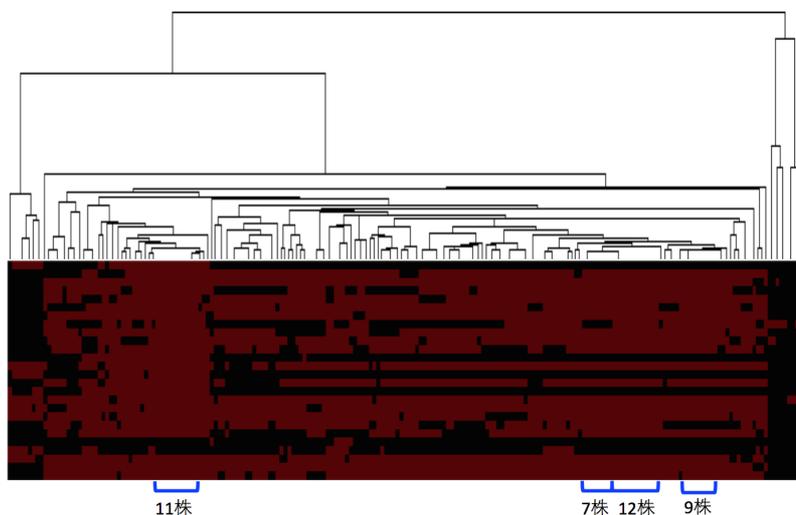


図4 PCR増幅効率が低い、非特異増幅があるプライマーを除去した後の菌株識別解像度。

項目2), 3)で該当するプライマーを除去した結果、菌株識別解像度が108パターンに下がり、特に解像度が下がる系統が4グループ検出された。

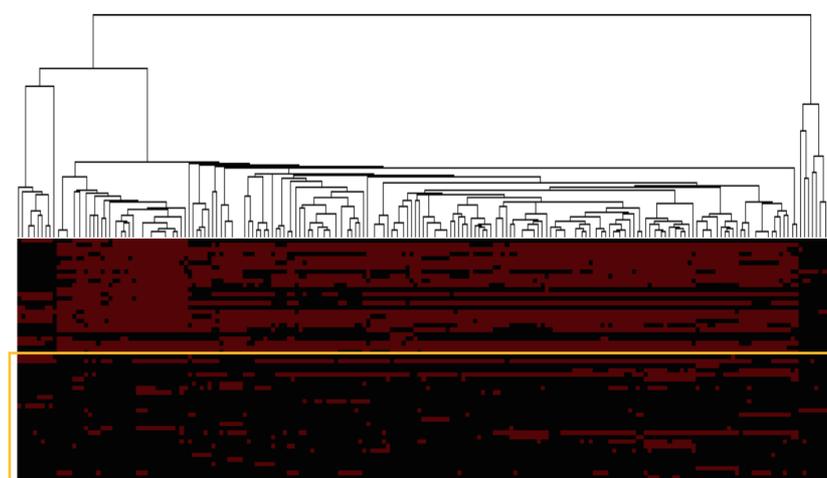


図5 新規IS629挿入部位(29カ所)の情報追加による菌株識別解像度の向上

図4のデータに新規IS629挿入部位(計29カ所)の情報を追加することにより、108パターンであった菌株識別解像度が164パターンにまで向上した。