

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-POT 法の開発

研究分担者 鈴木 匡弘 （藤田医科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 81 個の ORF から既存の EHEC 用 POT 法の菌株識別能力向上に寄与する 9 個の ORF を特定することに成功した。改良型 POT 法では、特に O26 および O111 における Simpson's index は 0.98 以上と実用上十分な菌株識別能力に到達したほか、O103 や O145 についても同一の検出系でタイピング可能となった。

A. 研究目的

食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）においては、できる限り迅速に探知することが重要である。特に EHEC が原因である場合、被害が甚大になることがあることから、分子疫学的手法による早期の検出が必要である。EHEC 食中毒の原因菌として以前は O157 が最も多く O26 と O111 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、O103 や O121 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 O157 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、O157 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 - 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、主要な血清型に対して汎用的に用いることができる、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 O26、O91、O103、O111、O121、O145 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。（H29 年度）

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 81 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。

マルチプレックス PCR 反応系の設計

菌株識別能力向上への貢献度が高い ORF について、マルチプレックス PCR 反応系による検出を可能となるよう、プライマー設計を行った。

菌株識別能力の評価

利用可能な菌株の不足を補うため、ダウンロードしたデータを用いて POT 型を予測し、Simpson's index を計算した。用いたデータ数は、026 が 115 株、091 が 39 株、0103 が 88 株、0111 が 86 株、0121 が 47 株、0145 が 37 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 81 個見つかった。この 81 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。81 個の ORF についてプライマーを作成した。

分離株による 81 個の ORF の保有状態調査の結果、81 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する 9 個の ORF を特定することができた。この 9 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。

追加された 9 個の ORF を検出するため、従来の 1 反応系の EHEC-POT 法に加え、追加の反応系を設計した。新たに設計したマルチプレックス PCR には前述の 9 個の ORF に加え、*stx2* と *eae* 及び大腸菌のマーカーを加えた 12-plex PCR とした。

保存株におけるタイピング結果は 25 株の 026 は 21 種類の POT 型に、8 株の 0103 は 5 種類の POT 型に、7 株の 0111 は 6 種類の POT 型に、また、0121、0145、0165 の株はそれぞれ異なる POT 型となった。

ダウンロードしたゲノムデータによる Simpson's index は 026 で 0.991、0111 で 0.984、0103 で 0.974 と良好な菌株識別能を示し、特に 026 と 0111 では顕著な識別能向上が実現された。

また、0145 では 0.956 とやや菌株識別能力はやや低かった。一方、0121 については 0.534 と実用域から外れていた。091 については 0.974 と Simpson's index は良好な数値となったが、検出される ORF が少なかった。

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、データの欠落などが原因となった可能性がある。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が、ゲノムデータを用いた性能評価では特に ORF 選択に利用可能であった分離株数が多い血清型で性能向上が見られた。特に、026 および 0111 については十分実用域に達していると考えられた。各血清型の分離株によるスクリーニングを追加し、検出 ORF セットの調整を行うことでさらなる菌株識別能力向上の可能性もある。一方、0121 については ORF 保有パターンの多様性が乏しく、POT 法によるタイピングは困難と考えられる。また、091 は Simpson's index の数値は高くなったが、EHEC-POT 法の対象菌群から外れている可能性がある。

国立感染症研究所から分与された EHEC の DNA を用いた検討を進めており、その結果も踏まえ最終的な検出 ORF セットを決定することで実用的な手法になると期待される。

E. 結論

H30 年度までの検討によって、実用性の向上した EHEC-POT 法が完成しつつある。分離株を用いた調整を加えることで血清型汎用的に使える POT 法とすることができる。

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
なし

(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 |