

厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
「食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究」

(H30-新興行政-一般-001)

研究分担報告書

分担研究課題 「全ゲノム解析による O157 の分子疫学的解析」

研究分担者 伊豫田 淳 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究協力者 李 謙一 (国立感染症研究所 細菌第一部)、
地方衛生研究所等

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) のサーベイランスにおける全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) 解析の有効性を検証するために、EHEC O157 の WGS 解析を行った。2013 年から 2018 年に分離された 319 株の O157 菌株の WGS 配列を新たに解読し、計 494 株の WGS から単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を抽出した。multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) と SNP の比較を行ったところ、一部の例外を除き、MLVA で同一型または 1 アリアルのみ異なる型では少数の SNP のみ認められることが確認された。また系統解析の結果、解析した菌株の clade は 2, 3, 7, および 8 が大部分を占めた。このうち clade7 においては、亜系統 (subclade) ごとに重症化率が異なっていたため、病原性の違いが示唆された。上記の解析結果をもとに、2019 年に報告された 2 件の国内集団感染事例について WGS 解析をおこなったところ、いずれの事例においても事例内での SNP は 5 か所以内となっていた。以上のことから、WGS によってより蓋然性の高い分子型別が可能となること、系統が明らかになることによって病原性が予測できる可能性が示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) は食品を媒介として人へ感染し、感染に必要な菌量も少ないことから、しばしば広域食中毒の原因となる。現在、同菌感染症の早期検知や原因の究明を目的としたサーベイランスでは、multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) やパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法といった分子型別手

法を用いた菌株間の比較が行われている。近年、高速シーケンサーの実用化により、集団感染等の調査に全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) を用いた解析が取り入れられつつある。これまでの研究によって、EHEC O157 においては同一 MLVA 型または single locus variant (SLV) の株間では、ゲノムレベルでも類縁性が高いことが示されている。そこで、過去 3 年間に分離された代表的な MLVA

型を示す O157 菌株の WGS 解析を行うことによって、集団感染に関与する O157 のゲノムの特徴を明らかにすることを目的とした。加えて、2019 年に報告された集団感染事例の解析を行い、実際の集団感染調査への WGS 解析の有効性を評価した。

B. 研究方法

2013 年から 2018 年に国内で分離された O157 計 319 株の WGS を新たに解読した。これらの菌株は、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) 等の重症例由来株や大規模集団感染事例由来株を中心に選んだ。各菌株について、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行い、Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina) を用いてライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを使用して、HiSeq (illumina) によってペアエンドシーケンシング (150-mer×2) を行った。得られたショートリードは、これまでに感染研・細菌第一部で既に解読した計 175 株の WGS と合わせて解析を行った。まず、spades や BLAST+ を利用した in-house pipeline によって、*de novo* アセンブルおよび病原性遺伝子等の検出を行った。次に、snippy などを用いた系統解析パイプラインを利用し、single nucleotide polymorphism (SNP) を抽出し、MLVA 型別との比較を行った。

また、2019 年に全国的に発生した集団感染事例 (事例 A および B) から分離された株および MLVA 類似株について、それぞれ 13 株および 23 株を (表 1) 上記の方法と同様に WGS 解析を行い、国内株と

の比較等を行った。

C. 研究結果

1. 国内 EHEC O157 494 株の WGS 解析

まず、計 494 株の O157 の SNP を抽出し、MLVA 結果との比較を行った。その結果、一部の例外を除き、MLVA で差異が 1 か所以内の株間ではごく少数の SNP のみ認められることが示された (図 1)。次に、系統解析を行った結果、7 種の clade が認められ、それぞれ次のような株数 (割合) であった : clade 1, 1 株(0.2%); clade 2, 137 株(27.8%); clade 3, 169 株(34.3%); clade 4/5, 2 株(0.4%); clade 6, 1 株(0.2%); clade 7, 62 株(12.6%); clade 8, 119 株(24.1%)。重症者 (HUS または血便) の割合を算出したところ、clade 間での差異が認められた (表 2)。clade 2 および 3 では 95%以上が同一の *stx* 型(*stx1a 2a*)であったが、clade 7 および 8 では多様性が認められたため、*stx* 型毎に重症化率を算出した。その結果、clade 7 (*stx1a* のみ, *stx2a* のみ, *stx2c* のみ, *stx1a 2c* の両方をそれぞれ保有する 4 つのタイプに分かれる; 表 2) では *stx* 型ごとに重症化率が大きく異なり、*stx2a* 保有株、*stx1a 2c* 同時保有株で重症化率が高い傾向であった。Clade 8 では *stx* 型との関連性は見られなかった。

2. 2019 年集団感染事例の解析

これまでに確立した WGS 解析パイプラインを利用し、2019 年に発生した 2 件の集団感染事例の解析を行った。

事例 A は、全国的にチェーン展開する飲食店で食中毒として認定された事例であり、食中毒事例以外にも同一 MLVA 型

の株が関東以西の全国で分離されていた。これまでサーベイランスで集められた株からは 3 ローカス違い以内の近縁型は見つかっていなかった。そのため、本 MLVA 型 (18m0541) の 13 株について WGS を解読し、clade 等の *in silico* 解析および上記の 494 株との SNP 解析を行った。その結果、同 MLVA 型は *stx1a,2c* を保有する clade 7 であった。SNP 解析の結果、既存の WGS 解読株との間に近縁な株は見つからず、最も系統的に近い株とは 160 か所以上の SNP が存在した。一方、同一 MLVA 型内では最大 4 か所の SNP が存在した (図 2)。

事例 B は、食中毒と認定されなかったものの、飲食店との関連性が疑われる事例で、5 種の MLVA 型からなる MLVA コンプレックスを形成していた (表 1)。そこで、5 種の MLVA 型を含む 23 株について WGS を解読し、事例 A と同様の解析を行った。その結果、供試菌株はいずれも clade 8 に属し、*stx2a,2c* を保有していた。最も近縁な株とは 40 か所以上の SNP が存在した。同一コンプレックス内での SNP は 0-5 か所であり、同一のクローンであると考えられた。(図 3)

D. 考察

これまでに 7 種の MLVA 型を中心とした株を用いて WGS と MLVA との比較を行ってきた (Lee et al. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85)。本研究ではより解析対象を広げ、計 406 種の MLVA 型を含む 494 株の WGS 解析を行った。その結果、既報と同様に、MLVA での差異が 1 ローカス以内の株間では、ごく少数の SNP の

み認められることが示された。一方、3 か所以上の差異がある株間でも 10 か所以内の SNP しか認められない場合があることが明らかとなった。このことから、MLVA で差異が認められる場合でも疫学情報やゲノム情報を活用して、総合的な判断を行うことが重要と考えられた。

系統解析の結果からは、国内流行株の主な clade は 2, 3, 7, および 8 であることが示された。これは、過去の報告 (Iyoda *Open Forum Infect Dis.* 2014 Sep;1(2):ofu061.) と一致している。Clade 7 内には 4 種類の *stx* 型が存在し、clade 内亜系統と関連していた。このうち、clade 7 は比較的病原性が低いとされているが、本解析では clade 7 内の亜系統によって病原性が異なる可能性が示唆された。今後は、亜系統間の病原性の差異を明らかにする必要がある。

2019 年に発生した集団感染事例の解析では、いずれの事例でも同一型または同一コンプレックスの株は SNP 上も同一のクラスターを形成することが示された。先行研究から、疫学関連のある株間での SNP はおよそ 0-7 か所とされており、今回の事例でも供試菌株間の関連性は非常に高いと考えられる。

一方、いずれの事例の菌株においても、近縁な国内由来株は、感染研・細菌第一部および公共データベース上からは見出されなかった。EHEC の伝播経路の解明には、患者、食品、および動物由来 EHEC のゲノム情報のさらなる蓄積が求められる。

E. 結論

本研究によって、国内 EHEC O157 にお

ける系統の特徴や MLVA との関連性がより網羅的に明らかになった。これらの結果から、MLVA のみでは集団感染の判断が付きづらい場合でも、WGS によってより蓋然性の高い分子型別が可能となることが示唆された。また、WGS によって系統が明らかになることによって病原性が予測できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M.
Effective surveillance using multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157.
Appl Environ Microbiol. 2019 Sep 1;85(17).

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

表 1 使用菌株

事例	ID	疫学情報	MLVA型
事例A			
	A01	散発	18m0541
	A02	散発	18m0541
	A03	散発	18m0541
	A04	散発	18m0541
	A05	なし	18m0541
	A06	散発	18m0541
	A07	店舗A	18m0541
	A08	店舗A	18m0541
	A09	店舗A	18m0541
	A10	散発	18m0541
	A11	散発	18m0541
	A12	散発	18m0541
	A13	店舗A	18m0541
事例B			
	B01	店舗B	19m0506
	B02	店舗B	19m0506
	B03	店舗B	19m0488
	B04	店舗B	19m0487
	B05	店舗B	19m0488
	B06	店舗B	19m0487
	B07	店舗B	19m0506
	B08	店舗B	19m0488
	B09	店舗B	19m0508
	B10	店舗B	19m0509
	B11	食品	19m0488
	B12	店舗B	19m0487
	B13	店舗B	19m0506
	B14	店舗B	19m0506
	B15	店舗B	19m0487
	B16	散発	19m0488
	B17	店舗B	19m0487
	B18	店舗B	19m0487
	B19	散発	19m0487
	B20	散発	19m0487
	B21	散発	19m0508
	B22	散発	19m0488
	B23	散発	19m0506

表 2 解析菌株の clade および stx 型と重症化率の関連性

Clade	stx type	株数	BD_HUS	
			株数	%
1		1	1	100
2		137	78	56.9
3		171	108	63.2
4/5		2	0	0
6		1	1	100
7		62	27	43.5
	1a2c	21	13	61.9
	2a	14	8	57.1
	2c	26	5	19.2
	1a	1	1	100
8		115	80	69.6
	2a	68	44	64.7
	2c	32	22	68.8
	1a2c	1	0	0
	2a,2c	18	14	77.8

BD: Bloody diarrhea

HUS: Hemolytic uremic syndrome

図 1 MLVA と SNP の関連性

Locus variant (LV)ごとの SNP 数を箱ひげ図で示す。0LV および 1LV は、それぞれ同一 MLVA 型および 1 アリアル違いを示す。

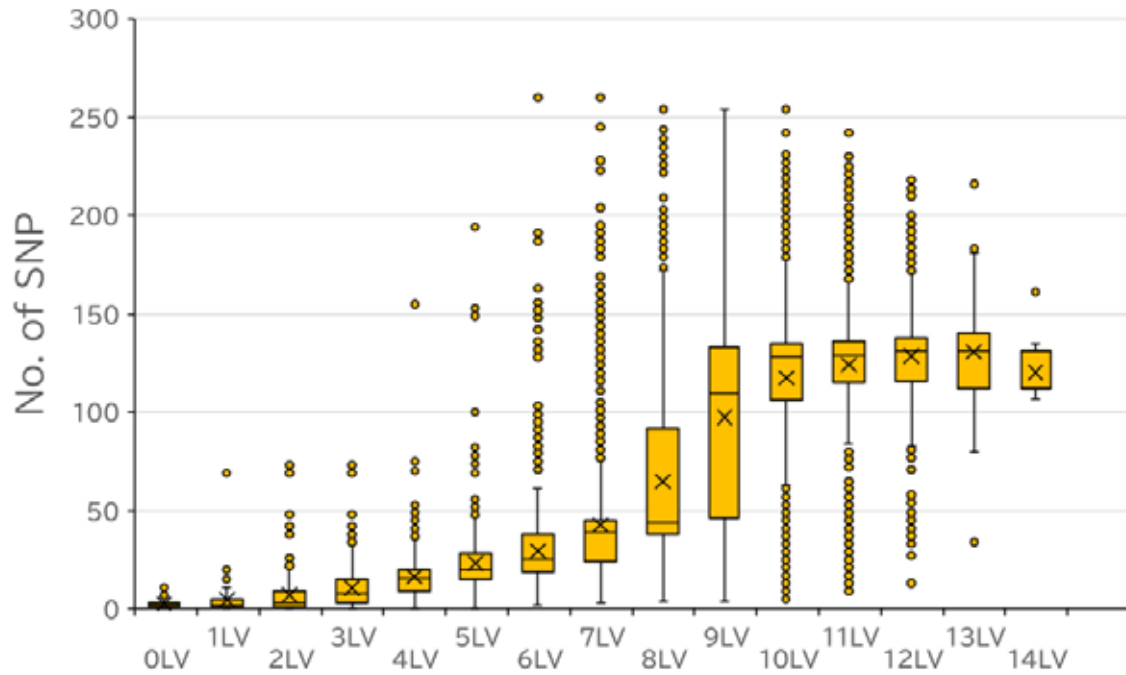


図 2 事例 A における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、分離元の自治体を示す。

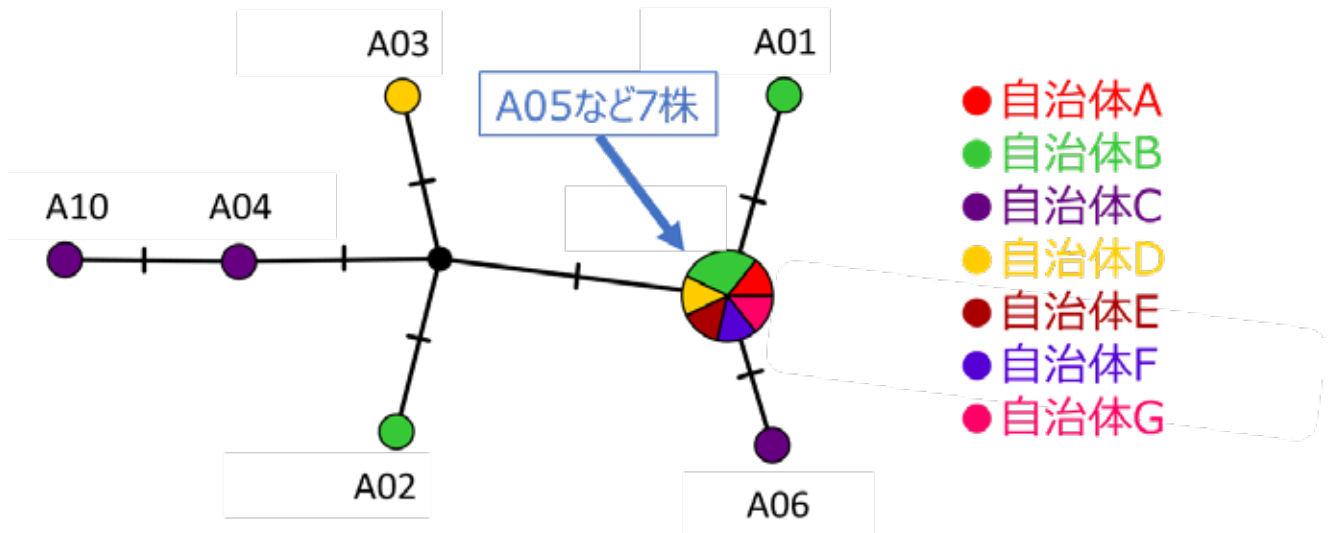


図3 事例Bにおける供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1本につき1か所のSNPを示す。色分けは、由来（左図）および MLVA型（右図）を示す。

