

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）
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、施設間での比較も容易なデータを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（地衛研）で広く使用されているが、O157 と O26 のみに適用可能である。そこで本研究では、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 についてはプロトタイプを作成し、プライマーセットと陽性コントロールを各地の地衛研に配布して現場での試用を依頼した（プロトタイプの検証）。その結果、いくつかの問題点が浮上したのでその改善に取り組んだ。また、昨年度開発した、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において使用していた ISMapper には判定精度の問題が認められたため、東工大・伊藤研究室と共同で、IS 挿入状況を高精度に判定することのできる解析プログラムを開発し、パイプライン全体の精度を向上させた。さらに最終的な IS-P システムを、26 部位を標的とする 2 チューブのマルチプレックス PCR とすることに変更し、分離解像度の向上を目指した。改良した解析パイプラインを用いて IS-P_O121 と IS-P_O103 の 26 箇所の標的部位を選定し、プライマーセットを作成した。プライマーセットの最終的な最適化と陽性コントロールの追加作成が残っているが、2 つの IS-P システムがほぼ完成できたといえる。

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、目的に応じて複数の方法が組み合わせて利用されている。IS-printing (IS-P) 法は、我々の研究室が独自に開発したゲノム情報を利用した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が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、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である。しかし、O157 と O26 のみに IS-P 法は適用可能であり、対象を拡大することが望まれる。そこで本分担研究では、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

昨年度までの O121 および O103 の系統解析と IS 挿入状況の網羅的解析によって、IS-P_O121 については IS600 と IS629 を、IS-P_O103 について

は IS629 を標的 IS として決定した。また、IS-P_O121 のプロトタイプを構築し、プライマーセット、プロトコル、陽性コントロールを作成した。これらを踏まえて、以下の開発研究を進めた。

1. IS-P_O121 プロトタイプの検証

作成したプライマーセット、プロトコル、陽性コントロールを、各地の地衛研に配布し、実際の菌株を対象とした検証を依頼した。その結果を基に、作成パイプラインの見直しや標的部位数の変更含む種々の改良作業を行なった。

2. IS-P 作成パイプラインの改良

(1) IS 挿入状況解析プログラムの開発

IS の挿入状況については ISMapper を用いて網羅的に解析していた。しかし、実際の PCR での判定結果との間に差異があるということ等が判明したため、より精度の高い解析プログラムの開発を行った。

(2) 解析パイプラインの変更

IS 解析プログラムの変更と標的部位数の変更に伴い、昨年度に構築した解析パイプラインを変更した。

(3) 検定使用株の最適化

IS-P 開発に使用してきた菌株の中には非常に近縁の株が含まれており、解像度の検定に問題があること判明したため、近縁菌株を除外して使用菌株を最適化した。

3. IS-P_O121 と IS-P_O103 の標的部位の選定と最終的な IS-P システムの作成

上記のパイプラインを用いてマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。

(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. IS-P_O121 プロトタイプの検証

IS-P_O121 プロトタイプ (15 箇所の IS-P 標的部位に対するプライマーセット、プロトコル、陽性コントロール) を、近年 O121 が分離された地衛研に配布し、現場での検証を依頼した。19 の地衛研から協力が得られ、97 事例 (154 株) の解析結果を得ることができた。

(1) 判定ができなかった事例

5 事例 (7 株) ではバンドが得られなかった。これまでの解析で、O121 のマイナー系統に属する株には IS600 と IS62 が存在しないことから、これらの株はマイナー系統に属する可能性が高いと判断される。

(2) 集団感染事例における検証結果

残りの 92 事例のうち、31 事例が集団感染事例であり、そのうち 16 事例では事例内でバンドパターンが一致した。残りの事例では同一事例内でバンドパターンが一致せず、特に 7 事例では、15 箇所の標的部位の中の特定の 1 箇所の判定結果が異なることが不一致の原因であった。この部位については、培養中に挿入されている IS が脱落することが我々の別研究で確認されたため、IS-P の標的部位としては不適切と判定した。

(3) 分離解像度の検討

各地衛研で解析された 92 事例での IS-P による型別パターンは 62 パターンであり、想定よりもやや低い分離解像度であった。また、IS-P_O121 のプロトタイプ作成に使用した 79 株から抽出した DNA を使って実際の PCR 解析を行い、ISMMapper の結果と比較したところ、結果が異なる挿入部位を多数認め、ISMMapper の判定精度に問題があることが判明した。

(4) 分離結果の判定

非特異バンドのためにバンドパターンの判定で問題が生じた例が多数報告された。これは、IS-P_O121 では IS600 と IS629 を 1 チューブで同

時に反応させていることが影響していると考えられた。また、バンドが非常に薄くなる標的部位があることや、バンドの間隔が狭いために判定が難しくなっている例も確認された。

2. ISprinting システムとその開発パイプラインの改善

(1) 挿入部位選定に使用するプログラムの開発

ISMMapper の判定精度には問題があることが判明ため、類似のプログラムである ISseeker を用いてみたが、ISMMapper と同様かそれ以下の結果であった。そこで、東京工業大・伊藤研究室と共同で、新たな IS 挿入状況解析プログラムとして IShunter (仮称) を開発した。ISMMapper、IShunter、PCR の結果を比較して精度評価を行ったところ、IShunter は ISMapper と比べて偽陽性・偽陰性判定が少なく、IS-P 開発に適していることが確認できたため、標的部位選定に使用する解析プログラムを IShunter に変更することとした。

(2) 分離解像度の向上に向けたシステムの改善

プロトタイプで試行結果を踏まえて、IShunter に変更したパイプラインを使用し、改めて 15 箇所の挿入部位を選定したところ、十分な分離解像度を得ることができないということが判明した。そこで、分離解像度を向上させるために標的となる挿入部位の数を増やすことにした。また、プロトタイプ検証で明らかとなった非特異バンドの出現やバンド間隔の狭さといった問題点も踏まえて、IS-P_O121 では IS600 と IS629 の標的部位をそれぞれ 13 箇所ずつ選定し、別々のチューブで反応を行うことに変更した。IS-P_O103 でも、IS-P_O121 プロトタイプの検証結果を踏まえて、IS629 の標的部位を 26 箇所選定し、2 チューブで 13 箇所ずつを解析するように変更した。

(3) 検定使用株の最適化

O121 については主要系統に含まれる 79 株、O103 については 73 株を使用して IS-P システムの開発を進めていたが、系統解析の結果から、SNP 距離が非常に小さい株 (非常に近縁の株) が複数含まれていることが判明した。これらの株では IS の挿入状況も類似していると推定されるため、解像度の判定に影響を及ぼす。そこで、SNP 距離が 10 以下となる株をクラスタリングし、同一クラスターから一株だけを代表株として使用することとした。その結果、O121 は 61 株、O103 は 63 株を検定に使用することになった。

3. IS-P_O121 最終版の開発

改良した開発用パイプラインを用いて、IS600 の 13 箇所と IS629 の 13 箇所を選定した。選定した挿入部位を使用すると、*in silico* の検定では、61 株を 54 パターンに分離できる。選定した標的部位について、それぞれ 1 チューブずつで判定す

るマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。作成したプライマーミックスを用いて実サンプルを用いたマルチプレックス PCR を実施し、バンドの増幅具合やバンド間隔などを確認し、さらにプライマーの変更を行い、最終版を作成した。現在、変更したプライマーに対する陽性コントロールの作成のみを残す状況となっている。

4. IS-P_O103 最終版の開発

改良した開発用パイプラインを用いて、IS629 の 26 箇所を選定した。選定した挿入部位について、13 箇所ずつ判定を行う 2 チューブでのマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。作成したプライマーミックスを用いて実サンプルを用いたマルチプレックス PCR を実施し、バンドの増幅具合やバンド間隔などを確認したところ、26 箇所のうち 2 箇所が判定には不適であることが判明した。そこで改めて他の挿入部位から 2 箇所を選定し直し、最終的なプライマーセットを作成した。このセットの *in silico* の検定では、63 株を 41 パターンに分離できる。現在、変更した標的部位に対する陽性コントロールの作成のみを残す状況になっている。

D. 考察

各地衛研における IS-P_O121 のプロトタイプ検証により、IS-P システム全体に関する問題点を洗い出すことができた。改良した IS-P 開発パイプラインは一定の精度を維持したまま大部分の作業をオートメーション化しているため、他の菌での IS-P システムの開発への応用が容易である。また、この改良過程で開発した IShunter プログラムは、IS-P システムの開発だけでなく、他の IS 関連研究にも貢献できると思われる。IS-P システムの開発に関しては、一部の陽性コントロールの作成のみを残すのみの状態であり、新型コロナウイルスの問題が落ち着いた段階でプライマーセット、プロトコル、陽性コントロールのセットを各地の地衛研へ配布する予定である。

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。本研究で作成した IS-P_O103 や IS-P_O121 は、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、効率化に貢献でき、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つながると期待される。また、本研究の開発戦略は、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利用できると考えられる。

E. 結論

IS-P_O121 のプロトタイプの各地の地衛研で検証結果等を基に、開発用パイプラインを改善し、最終的なシステムとして、IS-P_O121 と IS-P_O103 のいずれについても、26 部位を標的とした 2 チューブのマルチプレックス PCR を作成した。現在、一部の陽性コントロールの作成が残っているが、作成が完了次第、各地の地衛研へ配布できる状況となり、本開発研究の目標である IS-P_O121 と IS-P_O103 はほぼ完成できたといえる。

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

1) 腸管出血性大腸菌 O121 : H19 の乳糖分解性に関与する遺伝因子の特定, 中村佳司, 谷口愛樹, 西田留梨子, 後藤恭宏, 小椋義俊, 伊豫田淳, 大西真, 林哲也, 第 162 回日本獣医学会学術集会, 2019 年 9 月 10 日-12 日, 筑波。

2) 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 : O121:H19 EHEC 用 IS-printing system の開発に向けた IS の網羅的探索と国内分離株での IS 分布状況解析、第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19~21 日、名古屋

3) EHEC O121:H19 の継代培養中に生じる乳糖分解性の変化に関わる遺伝的メカニズムの解明, 中村佳司, 谷口愛樹, 西田留梨子, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 第 93 回日本細菌学会総会, 2020 年 2 月 19~21 日、名古屋。

4) 谷口愛樹, 中村佳司, 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 O103:H2 における高精度系統解析と完全長配列決定株のゲノム構造比較, 第 14 回日本ゲノム微生物学会年会, 2020 年 3 月 6~8 日、名古屋

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 |

