

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）
令和元年度 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）
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所・上席専門員）
木全 恵子（富山県衛生研究所・副主幹研究員）
原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所・主任研究員）
若林 友騎（大阪健康安全基盤研究所・研究員）
西嶋 駿弥（大阪健康安全基盤研究所・研究員）
江藤 良樹（福岡県保健環境研究所・専門研究員）

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の重症合併症を発症するリスクの高い感染症であり、多数の集団感染事例を含めて毎年 3,500-4,000 例の報告されている。これまで様々な行政対応がなされてきたものの、原因や感染経路等が判明しないケースも多数存在する。毎年報告される血清型は O157 が中心であり、次いで O26, O103, O111 などの報告数が多いが、それ以外の血清型も増加している。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て昨年度までに作製した O111 IS-P 法プロトタイプを改良して最終的なプライマーセット（FS, RS ver.2 の 2 セット）を構築した。また、各標的領域の PCR 産物をプラスミドヘクローニングし、PCR の陽性コントロール DNA として作製し、それらを用いた PCR 条件および PCR 産物の泳動条件の至適化を行った。プライマーセットと PCR 陽性コントロール DNA を協力機関に試用版として配布し、分離株および集団感染事例由来株を用いて、各機関の設備による有効性を検討した。

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て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 法プロトタイプからのプライマー選別および改良

H29-30 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 か所]）の構築が完了し

た。また、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 600 株のドラフトゲノム情報（イルミナ MiSeq データ）を基に行った高精度系統解析により選定した 206 株を用いてプロトタイプの検定を行い、菌株識別解像度が高くなる標的領域を選定し FS, RS ver.1 の 2 セット（標的部位、計 24 か所）を構築した。本年度は、菌株識別解像度の低い系統について解像度を上げるため、それらの系統に特異的に存在する IS629 挿入部位を標的部位としたプライマーを FS, RS プライマーセットに新たに追加した。

2) PCR および泳動条件の再至適化

PCR には KOD-Multi&EPI（東洋紡）を用い、PCR 反応液の組成は計 15 μ l（鋳型 DNA 1 μ l、外部プライマーミックス[各 5 μ M] 0.75 μ l、IS629 内部プライマー[50 μ M] 0.75 μ l、2 x PCR buffer 7.5 μ l、MilliQ 水 4.7 μ l、KOD-Multi&EPI 酵素 0.3 μ l)、PCR プログラムは 94°C 2min、30 サイクル（98°C 10 秒、58°C 30 秒、68°C 1 分）で PCR 機器として Biometra 社の T-professional を用いて行った。菌株からの鋳型 DNA 調整は、アルカリボイル法を用いた。電気泳動は 1.5-3.0 % の濃度で Agarose S（ニッポンジーン）in 0.5 x TBE バッファーおよび NuSieve™ 3:1 アガロース in 0.5 x TBE バッファーを用い泳動機器として MyRun を使用し、PCR 反応液 1 μ l を泳動するという条件で実施した。

3) PCR コントロール DNA の作製と精度管理

項目 1) で作製した ver.2 プライマーセットに用いた各標的領域（計 24 領域）について、各標的部位の外部プライマーと IS629 内部プライマーを用いて KOD-Multi&EPI 酵素で PCR 増幅し、PCR purification kit（Qiagen）で精製した。DNA Ligation Kit（Mighty Mix; Takara）を用いて T-vector pMD20 プラスミド（Takara）へクローニングし、コンピテントセル DH5 α （Takara）へ形質転換した。形質転換された株から各標的領域を含むプラスミドをそれぞれ QIAprep Spin Miniprep kit（Qiagen）を用いて精製した。精製したプラスミド DNA を鋳型として当該プライマーペアによる PCR 増幅を行い、標的サイズの PCR 増幅産物が得られることを確認した。

4) 協力機関へのプライマーセットおよびコントロール DNA の配布

項目 1) および項目 3) で作製した O111 IS-P 法プライマーセット（FS ver.2, RS ver.2 の 2 セット）と PCR コントロール DNA を協力機関である富山県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、福岡県保健環境研究所の 3 機関へ送付し、実際に分離株（異なる事例由来株および集団感染事例由来株）を用いて、個々の機関が使用している PCR 機器や泳動機器を用いて検討し、機器の違いによる増幅効率や泳動像の差異を検証した。

（倫理面への配慮）

該当しない。

C. 研究結果

1) O111 IS-P 法プロトタイプからのプライマー選別および改良

前年度に構築した FS1-3 について、解像度が高くなるよう選定した 12 か所の標的 IS 挿入部位のうち 2 か所については、ver.1 プライマーセットにおいて PCR 増幅サイズが類似しているため、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2 か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。RS1-3 についても、FS1-3 と同様、ver.1 プライマーセットにおいて PCR 増幅サイズが類似しているため、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2 か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。

FS, RS の ver.1 プライマーセットについて、前年度に 200 株のドラフトゲノム情報を基に菌株識別解像度の向上に繋がる株および系統特異的な IS629 挿入部位について、全ゲノム配列決定株 11128 株のゲノム情報から推定される挿入部位周辺にプライマーを設計し、挿入部位の配列を決定した。そのうち、特に菌株識別解像度の向上に繋がる 4 領域を選定した。前述の FS, RS ver.1 プライマーセットにおいて除去したプライマーの PCR 増幅バンドサイズと入れ替える形で新たに 4 領域を検出可能なプライマーを設計し、それらを加えたものを FS, RS ver.2 プライマーセットとした。また、この 2 プライマーセットを用いて系統の離れた 206 株について解析を行った

結果、113パターンに分かれる(図1)ことを確認した。

2) PCR および泳動条件の再至適化

項目1)でプライマーの入れ替えを行ったことにより、PCR および PCR 増幅産物の電気泳動の条件を再検討した。PCR 条件については、前年度に構築した至適条件で問題なく機能したが、電気泳動条件については、1.5-3.0%のゲル濃度で検討を行い、MyRun による電気泳動では 1.5%で最も明確な泳動像が得られることが明らかとなった(図2)。

3) PCR コントロール DNA の作製

項目1)で作製した FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットに含まれる計 24 か所の IS629 挿入部位について、クローニングベクター pMD20 ヘクローニング、精製した。標的部位のうち1か所は形質転換株の増殖効率が悪かったため、大量培養し Plasmid Midi kit (Qiagen) を用いて精製した。クローニング成否の確認は、各精製プラスミドについて標的部位を増幅したプライマーを用いて行ったが、いずれも単一バンドのみ検出されたことから、FS ver.2 および RS ver.2 のそれぞれの鋳型 DNA となるよう、各精製プラスミドを各 20ng/μl になるよう混合した。

4) 協力機関におけるプライマーセットおよびコントロール DNA の検討

FS ver.2 および RS ver.2 プライマーセットを用い、協力3機関(A, B, C)において、臨床分離株と PCR コントロール DNA を用いた PCR および泳動に関する検討を実施した。
機関 A：散発事例由来株 10 株および3つの集団感染事例由来株(事例①6株, 事例②6株, 事例③6株)の計 28 株(表3)を用いて検討した。Mupid を用いた泳動では、3%ゲルでバンドの識別が容易であることが分かった。PCR コントロール DNA の結果から、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 1NR (986bp) と 2NR (887bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2 では 5R (637bp) と 9R (306bp) の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、全ての株で異なるバンドパターンが得られた(図3a)。また、集団感染由来株では3事例ともに同一バンドが検出された(図3b)。
機関 B：散発事例由来株 12 株および集団感染事例由来3株の計 15 株(表4)を用いて検討した。PCR コントロール DNA の結果から、

FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 1NR (986bp) と 2NR (887bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2 では 5R (637bp) と 9R (306bp) の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3株が同じバンドパターンであったが残り異なるパターンとなった(図4a)。また、集団感染由来株では3事例ともに同一バンドが検出された(図4a)。また、Mupid を用いた泳動では 3%ゲルでバンドの識別が容易であった(図4a, b)。

機関 C：散発事例由来株 21 株および8つの集団感染事例由来株(8事例, 計 25 株)の計 46 株(表5)を用いて検討した。PCR コントロール DNA の結果から、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 6R (502bp) と 7R (475bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2 では 5R (637bp) と 9R (306bp) の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3組計 8 株が同じバンドパターンを示し、バンドが検出されない株も 2 株(O111であることを確認済み)存在した(図5a, 表4)。また、集団感染由来株では8事例ともに同一バンドが検出された(図5b, 表4)。また Mupid-exU (Mupid) を用いた泳動では 1.5%で良好な結果が得られた。

マイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いた機関 B による検討：通常のゲル電気泳動と同様、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 1NR (986bp) と 2NR (887bp)、6R (502bp) と 7R (475bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいことが明らかになった(図6)。しかしながら、RS ver.2 の 6R (502bp) と 7R (475bp) については、菌株により判別できる場合もあり、株間で IS 挿入部位に多様性がある可能性が示唆された(図7)。

D. 考察

本年度は、昨年度までに作製した 6 本の PCR からなるプロトタイプ(FS1-3, RS1-3)からプライマーを選別し、最終版として FS ver.2, RS ver.2 の 2 プライマーセットを構築した。また、PCR コントロール DNA として、各プライマーペアの PCR 増幅産物をクローニングして混合したポジティブコントロール DNA とセットで配布することにより、PCR および泳動が機能していることを容易に確認できるものとした。協力機関による試用の結果、PCR 機器により増幅効率に違いが出ること、また、泳動機器の違いにより泳動

パターンが異なることなどの問題点が見られたことから、本セットの実用化には、プライマーセットの微修正（プライマー配列や各プライマーの混合比）や泳動機器の違いを考慮した精度管理が必要と考えられる。マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いた解析においてバンドサイズが異なるプライマーがあることから、株間で IS 挿入部位の配列に多様性がある場合もあり、増幅産物を判別しやすいサイズに変更するなどの工夫も必要と考えられる。また、3 機関で使用された株において、散発事例由来株でも同じパターンを示す株があり、加えて 2 株で全くバンドが検出されなかったことから、今後 PFGE やドラフトゲノム解析などによりこれらの株の類似度や系統関係を調べ、必要に応じてプライマーセットの改良を行う必要がある。なお、集団感染事例由来株では、全ての事例で同じバンドパターンを示したことから、本プライマーセットが集団感染の検出や菌株識別にある程度有用性があることが示された。

E. 結論

O111 IS-P 法プロトタイプを改良し、FS ver.2 RS ver.2 の 2 プライマーセットを構築した。菌株識別解像度は 206 株を 113 パターンに分類するにとどまったが、同じパターンを示す株がゲノム高精度系統解析で比較的近縁の株であること、また、3 つの協力機関で実施した試用により、本システムが集団感染検出および菌株識別能において有用である可能性が示唆された。

しかしながら、使用する機器の違い等により条件を検討する必要があるなど、改良の余地があることも明らかとなった。今後、プライマーセットや PCR コントロール DNA の微修正と条件の再至適化を行い、最終的に検査現場で利用可能な O111 IS-P 法を完成するとともに研究成果を学術論文として公表する予定である。

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
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

3. その他
なし

表 1 FS ver.2, RS ver.2 プライマー情報

FS ver.2

	primer name	primer_F	length	Tm	product size	
IS629 outside primer F	1NF	TAG	G	19	60	896
	2NF	GAG	AG	20	60	803
	3F	GCG	G	19	58	711
	4F	CTG	GAG	20	62	644
	5F	ACG	C	19	62	620
	6F	CCG	G	19	58	531
	7F	GCG	C	19	58	485
	8F	GCG	TG	20	62	387
	9F	ATG	C	19	62	312
	10F	GAG	TG	21	60	272
	11F	GCG	C	21	60	234
	12F	GAG	GCC	21	62	201
IS629 inside primer R	IS629IN-R2	CTCAGGGAGTTTAGTCTCCAGG	22	66	-	

RS ver.2

	primer name	primer_R	length	Tm	product size	
IS629 outside primer R	1NR	GTC	C	19	62	986
	2NR	CCG	CAAG	22	60	887
	3R	TCC	A	19	58	776
	4R	CAG	CA	20	60	711
	5R	ATG	GC	20	58	637
	6R	GAG	CA	19	58	502
	7R	ACG	C	19	62	475
	8R	GAG	AC	19	62	364
	9R	TCC	CG	19	62	306
	10R	GAG	GC	19	60	274
	11R	CAG	G	19	58	236
	12R	CAG	A	20	60	198
IS629 inside primer F	IS629IN-F3	TCTGGCAGCCTGAGTTCACAG	22	66	-	

※NF, NR : Ver.2 で新たに追加した標的部位に対するプライマー

※プライマー配列については未発表データのため非公開

表 2 使用した PCR および電気泳動機器

	PCR機器	泳動機器
機関A	TaKaRa TP650 PCR Thermal Cycler Dice Standard	Mupid
機関B	TaKaRa TP350 PCR Thermal Cycler Dice Touch	Mupid
機関C	Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	Mupid-exU(Mupid)
鹿児島大	Biometra T-professional	MyRun

表3 機関Aの解析株情報

No.	菌株名	分離年	O	H	
S1	1581	1998	111	NM	
S2	2151	2002	111	NM	
S3	2320	2004	111	NM	
S4	2429	2005	111	28	
S5	3002	2008	111	NM	
S6	3041	2009	111	NM	
S7	3111	2010	111	NM	
S8	3497	2013	111	NM	
S9	3703	2015	111	NM	
S10	3713	2015	111	NM	
集団感染事例①	O1	1853	2000	111	NM
	O2	1882		111	NM
	O3	1883		111	NM
	O4	1884		111	NM
	O5	1885		111	NM
	O6	1886		111	NM
集団感染事例②	O7	2695	2006	111	NM
	O8	2701		111	NM
	O9	2702		111	NM
	O10	2703		111	NM
	O11	2704		111	NM
	O12	2705		111	NM
集団感染事例③	O13	3188	2011	111	NM
	O14	3190		111	NM
	O15	3192		111	NM
	O16	3195		111	NM
	O17	3196		111	NM
	O18	3197		111	NM

表4 機関Bの解析株情報 ●：同じバンドパターン

	菌株番号	分離年	O抗原型	H抗原型	Stx;RPLA	備考	
散発事例株	PV221	1997	111	NM[8]	1		
	11H461	1999	111	NM[8]	1		
	● 13H38	2001	111	UT[8]	1+2		
	14H163	2002	111	NM[8]	1+2		
	PV06-50	2006	111	NM[8]	1+2		
	PV07-37	2007	111	NM[8]	1		
	● PV07-55	2007	111	8	1		
	PV07-157	2007	111	UT[8]	1+2		
	● PV08-103	2008	111	NM[8]	1+2		
	PV12-41	2012	111	NM	1		
	PV13-59	2013	111	NM	1		
	PV14-37	2014	111	NM	1		
	集団感染事例	PV15-30	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
		PV15-31	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
PV15-32		2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族	

図1 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる 206 株による PCR 結果のデンドログラム
 206 株 2 プライマーセットによる結果から、113 パターンに分類された。

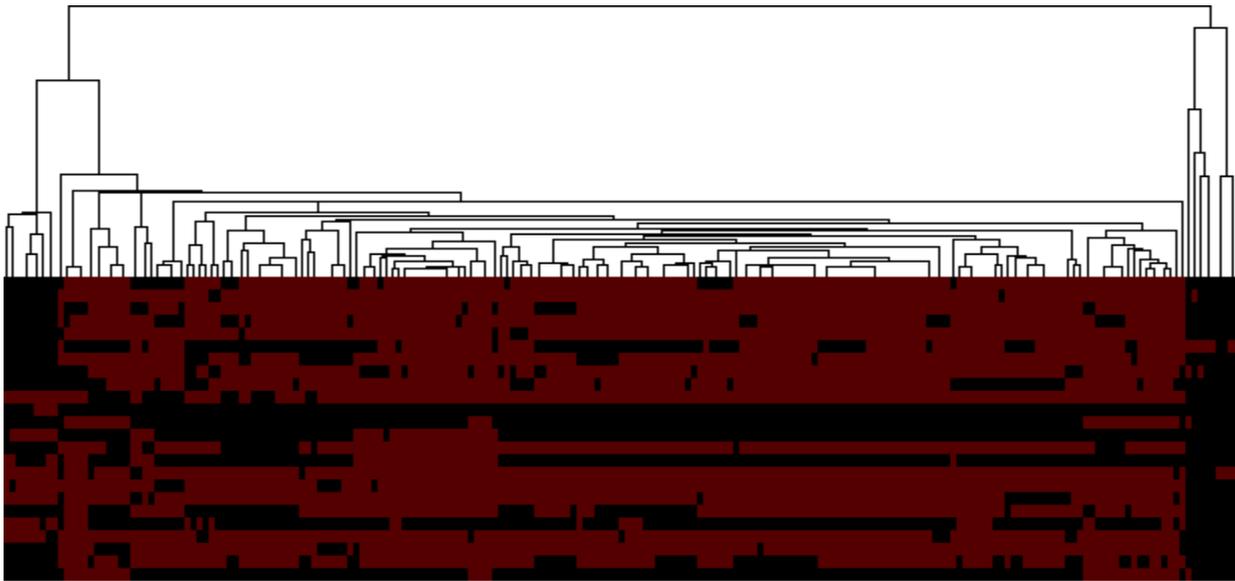
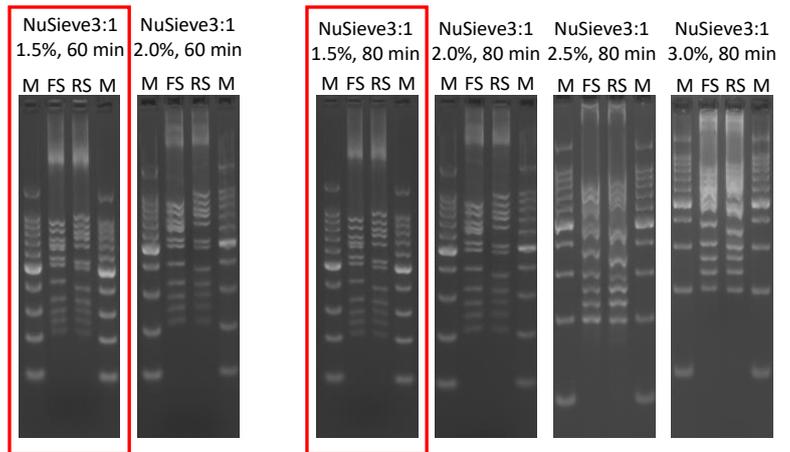


図2 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる PCR および泳動条件の検討

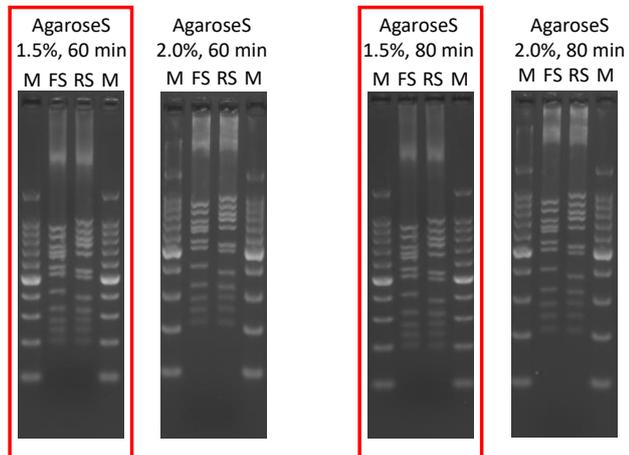
PCR 条件は昨年度と同様であり、全てのバンド (各 12 本) が検出された。また、MyRun による泳動結果から、NuSieve 3:1 および Agarose S のどちらにおいても、1.5%ゲルにおいてバンドの識別が容易であった。

NuSieve 3:1 (in 0.5 x TBE)

Marker (M): 100bp ladder



NipponGene Agarose S (in 0.5 x TBE)



【PCR反応液】 15 μ l scale

template DNA (positive control DNA)	1
primer F or R mix (各5 μ M)	0.75
primer IS629Inside R or F (各50 μ M)	0.75
2 x PCR buffer	7.5
D.W.	4.7
KOD-Multi&EPI	0.3
total	15

【PCR program】 3 step

1. 94 $^{\circ}$ C 2 min
2. 98 $^{\circ}$ C 10 sec
3. 58 $^{\circ}$ C 30 sec
4. 68 $^{\circ}$ C 1 min [step2-4: 25 cycles]

※PCR機器: T-professional (Biometra)

【電気泳動】 濃度1.5-3.0 % in 0.5xTBE

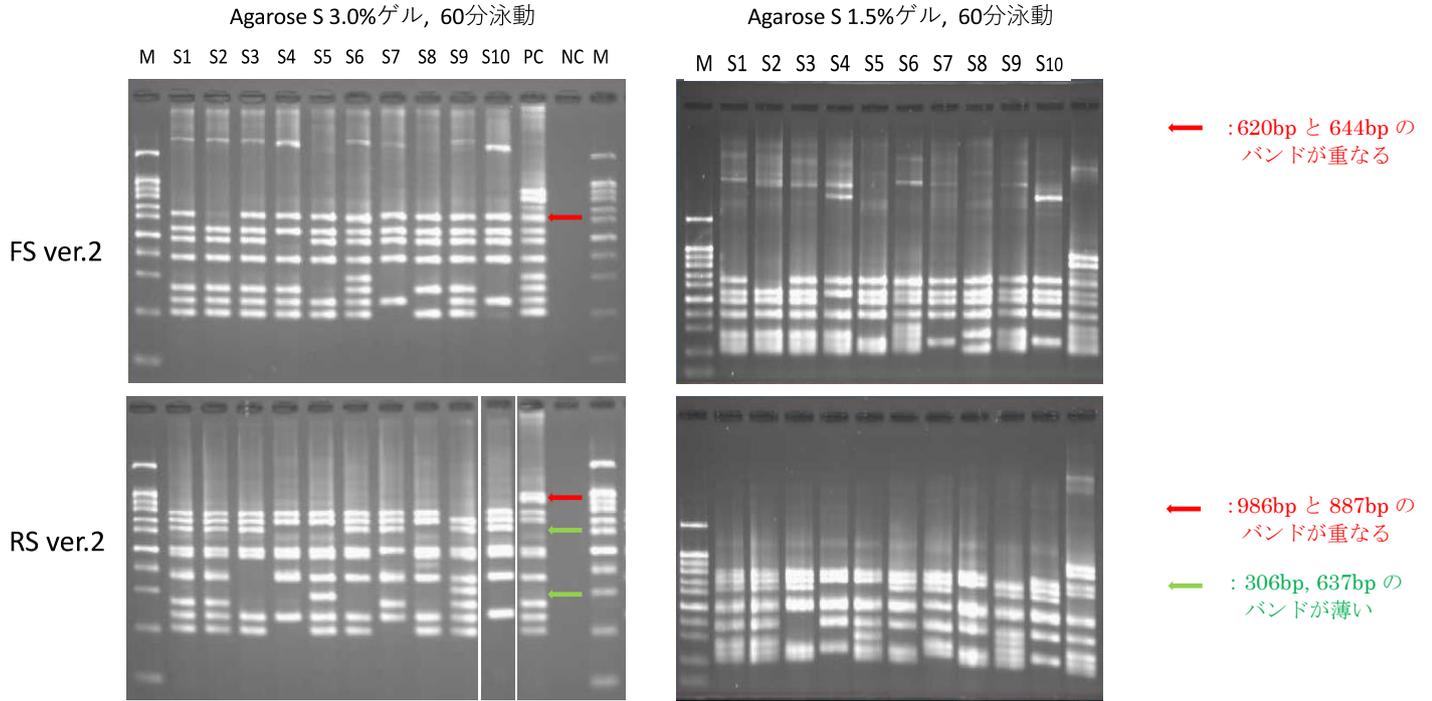
- ゲル: 1. NuSieve 3:1 (Lonza)
 2. Agarose S (Nippon Gene)

Marker: 100 bp ladder

※泳動機器: MyRun

図3 機関AのPCRおよび泳動結果

a) 散发事例株（10株）での ver.2 プライマーセットの検討：10株のデータから同じバンドパターンを示す株は見られなかった。また、ゲル濃度の比較から、Mupid を用いた場合、3%ゲルの解像度が比較的高いことが明らかとなった。



PCR機器: Takara Dice PT650
泳動機器: Mupid

b) 集団感染事例由来株（3事例、各6株）での ver.2 プライマーセットの検討：3事例全てで集団感染事例株では同じバンドパターンを示した。

Agarose S 1.5%ゲル, 60分泳動

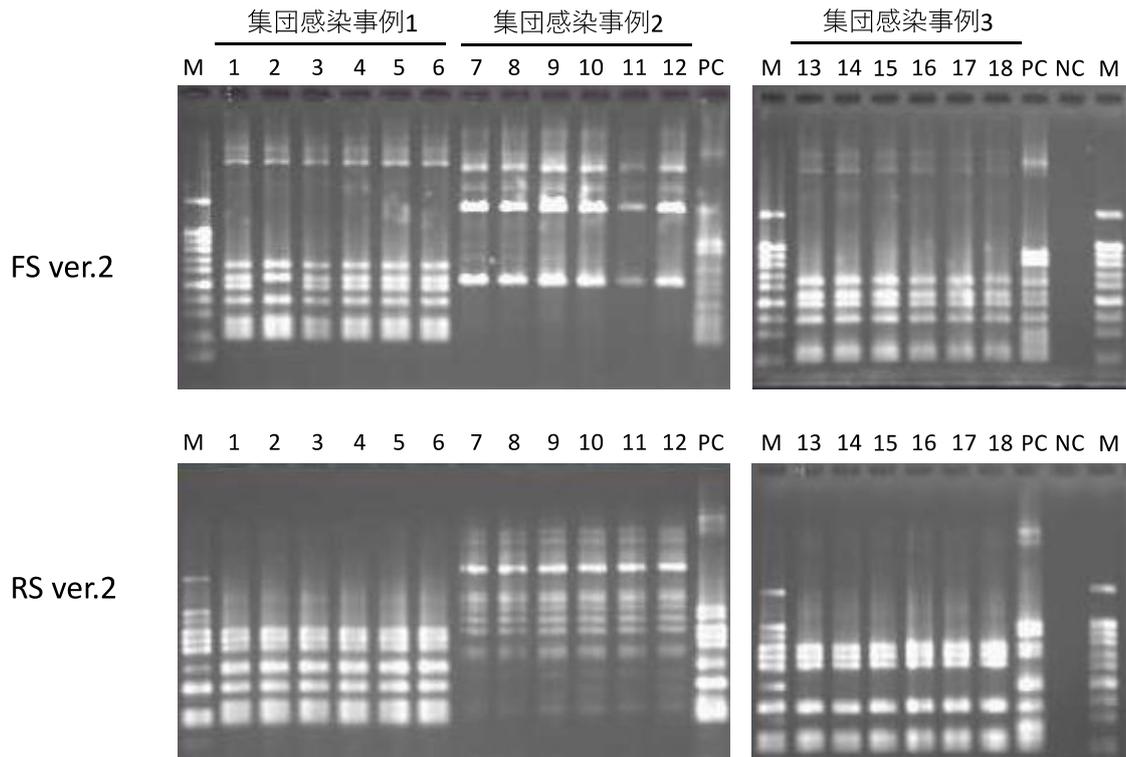
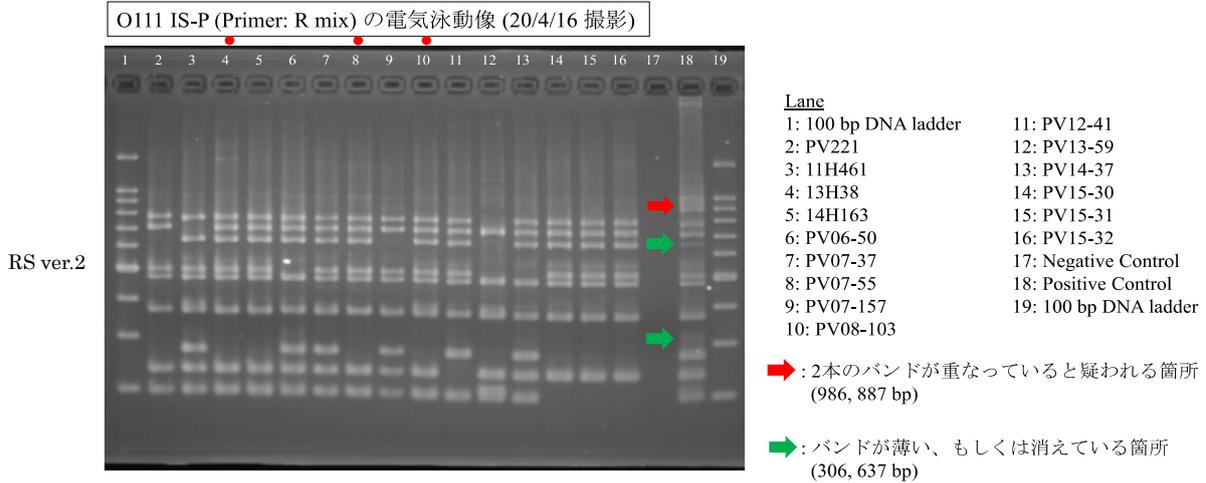
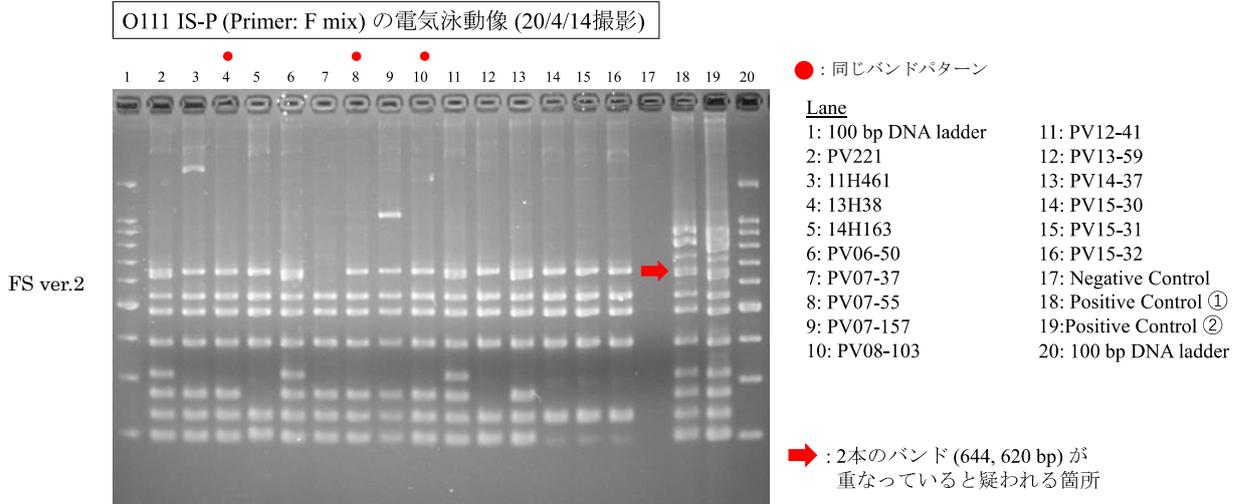


図4 機関BのPCRおよび泳動結果

- a) 散发事例株12株のうち、3株が同じバンドパターンを示した。また、集団感染由来株(3株)は同じバンドパターンを示した。



アガロース 3%(NuSieveGTG;SeaKemGTG=2:1)
 泳動条件 50V 45min + 100V 45min
 露光時間 15s(FluorChem Q system使用)

泳動量 Test sample 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)
 PC plasmid mix 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)
 100bp Ladder 3 μL

- b) 1.5%アガロースを用いた泳動結果: 3%と同条件の泳動では500bp以下のバンドが流れきってしまった。

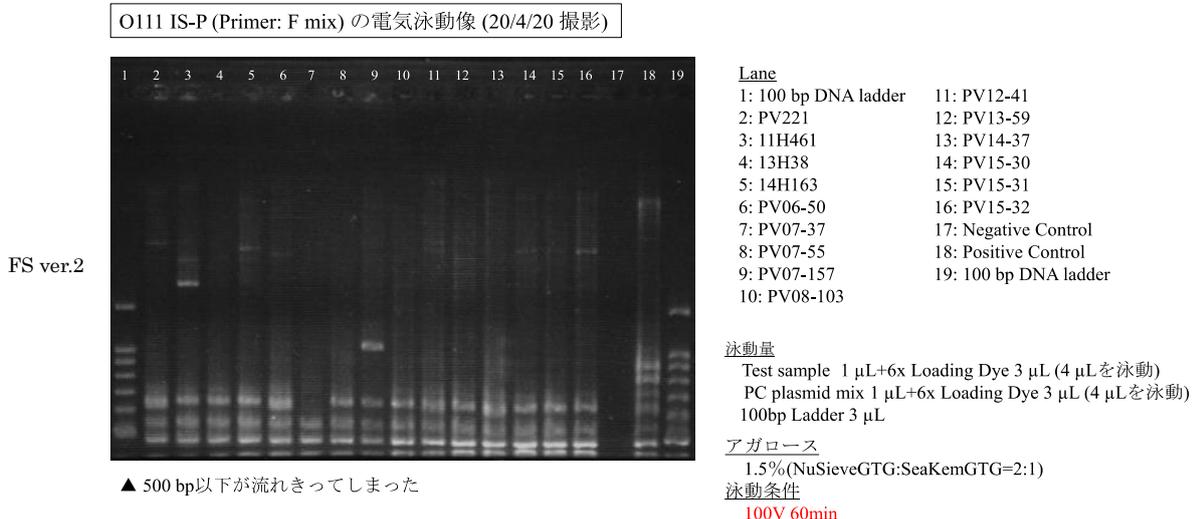
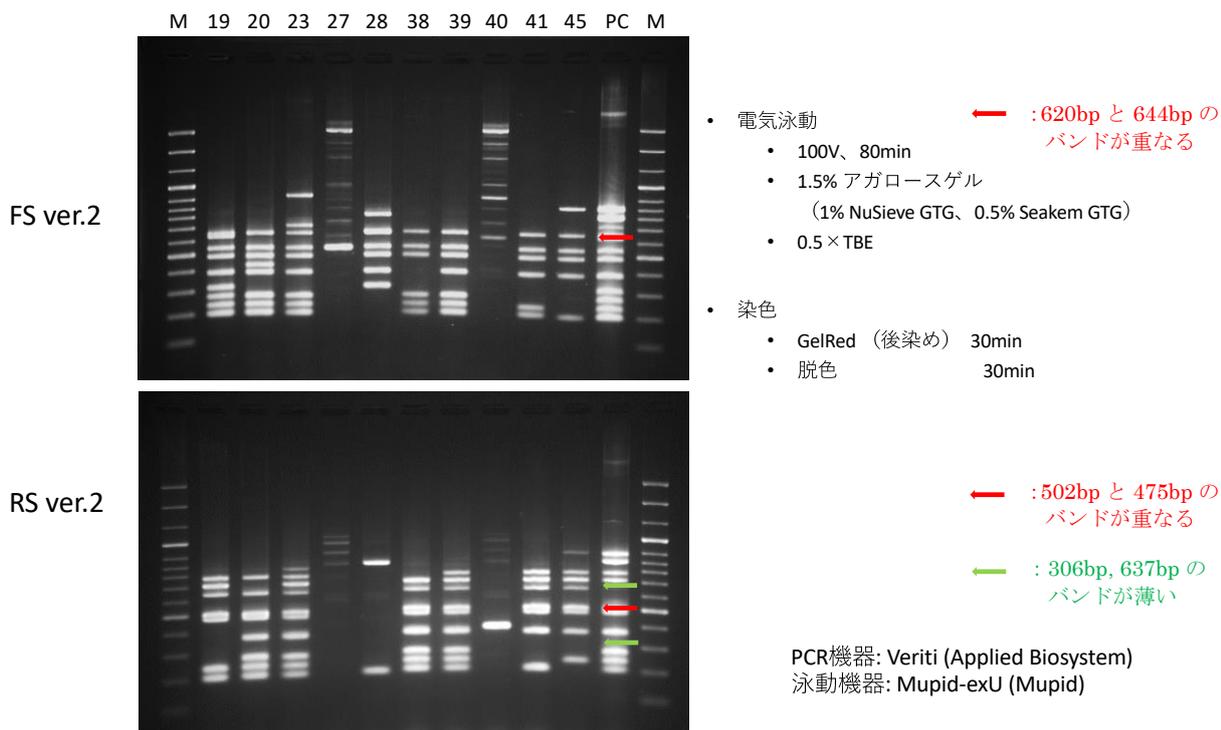


図5 機関CによるPCRおよび泳動結果

a) PCR結果の一部：1.5%ゲルで良好な泳動結果が得られた。



b) 集団感染由来株（事例②, 事例⑤）の結果

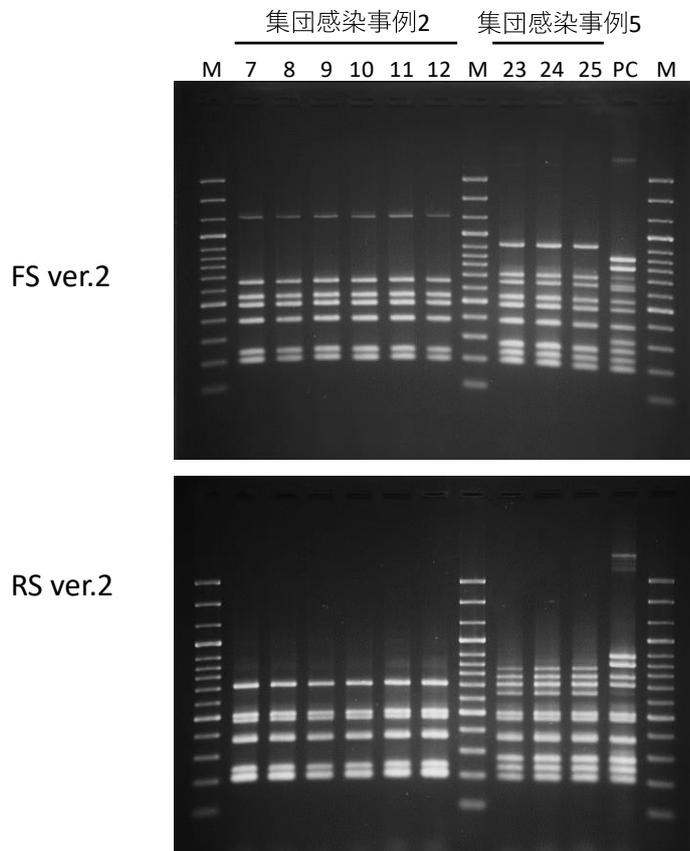
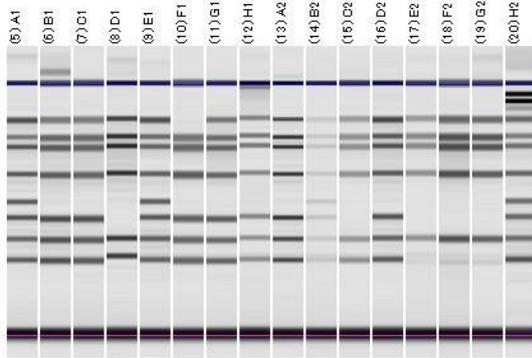


図 6 機関 B による MultiNA を用いた解析結果 1

O111 IS-printing system FS ver.2

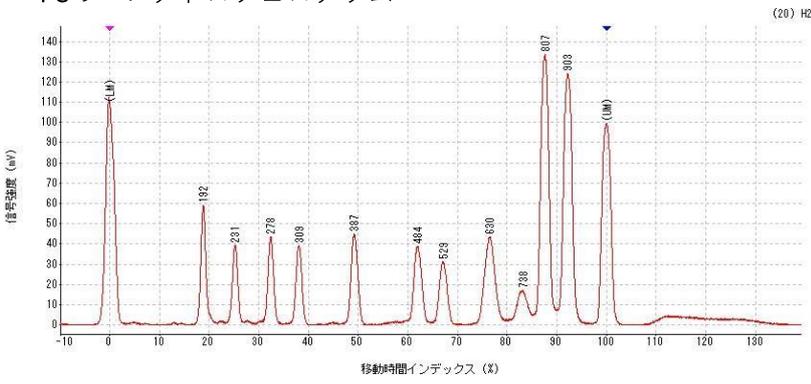
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- | | |
|--------------|--------------|
| A1: PV221 | A2: PV08-103 |
| B1: 11H461 | B2: PV12-41 |
| C1: 13H38 | C2: PV13-59 |
| D1: 14H163 | D2: PV14-37 |
| E1: PV06-50 | E2: PV15-30 |
| F1: PV07-37 | F2: PV15-31 |
| G1: PV07-55 | G2: PV15-32 |
| H1: PV07-157 | H2: PC |

PCのエレクトロフェログラム

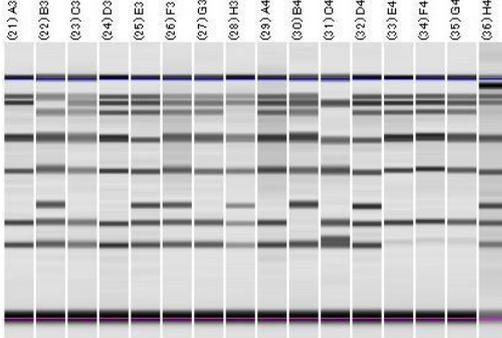


・ 644 bp と 620 bp のピークが重なっている

O111 IS-printing system RS ver.2

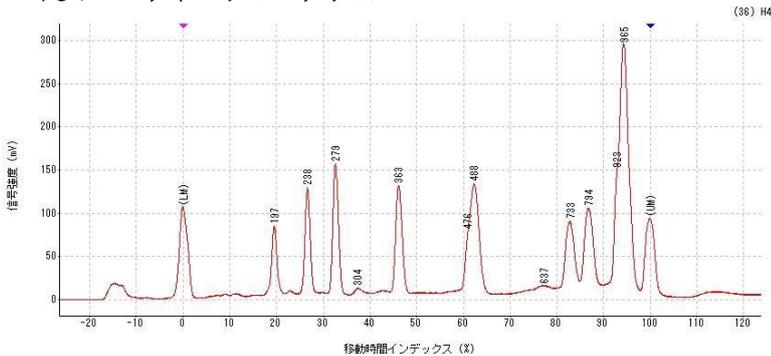
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- | | |
|--------------|--------------|
| A3: PV221 | A4: PV08-103 |
| B3: 11H461 | B4: PV12-41 |
| C3: 13H38 | C4: PV13-59 |
| D3: 14H163 | D4: PV14-37 |
| E3: PV06-50 | E4: PV15-30 |
| F3: PV07-37 | F4: PV15-31 |
| G3: PV07-55 | G4: PV15-32 |
| H3: PV07-157 | H4: PC |

PCのエレクトロフェログラム



・ 986 bp と 887 bp、502 bp と 475 bp のピークが重なっている

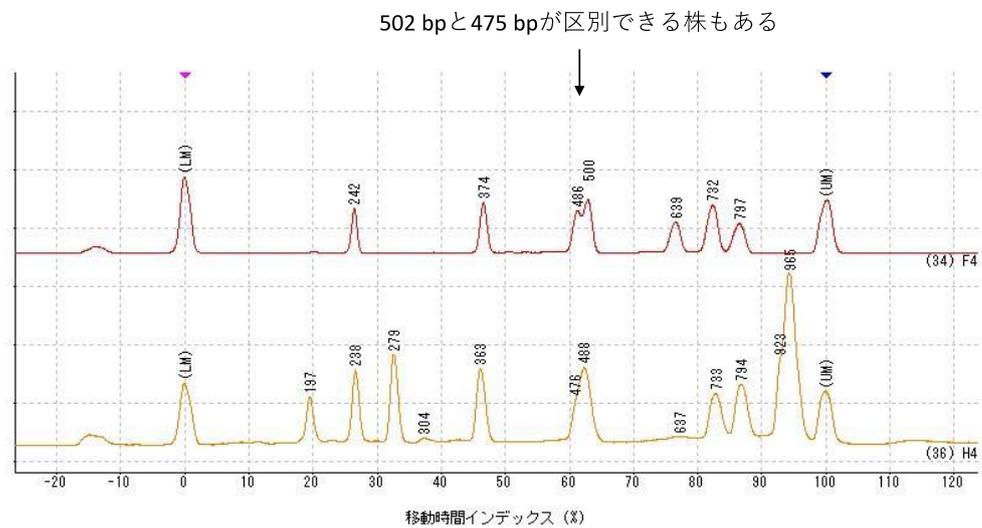
・ 637 bp と 306 bp のピーク弱い

図7 機関BによるMultiNAを用いた解析結果2

O111 IS-printing system RS ver.2

MultiNA DNA 1000 kit

PV15-31 (R mix)のエレクトロフェログラム



上段 F4: PV15-31

下段 H4: PC