

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 29 年度-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 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、我々が独自にゲノム情報を利用して開発した迅速かつ簡便な菌株識別手法である。本法は、施設間での比較が容易なデータを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。しかし、O157 と O26 のみに適用可能であったため、本研究では、O121 用及び O103 用の IS-P 法（IS-P\_O121 と IS-P\_O103）の開発を行った。まず、近年の分離株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析により各血清型の集団構造を明らかにし、主要系統などを同定した。また、参照ゲノムの解析から主要 IS を同定し、標的 IS として決定した（O121 では IS600 と IS629、O103 では IS629）。さらに、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる開発パイプラインを構築し、これを用いて IS-P\_O121 の標的部位を決定し、プロトタイプを作成した。この IS-P\_O121 プロトタイプを各地の地衛研に配布して現場での試用を行い、その結果等を踏まえて、開発パイプラインを改良した（IS 挿入状況を高精度に判定することのできるプログラムの新規開発を含む）。最終的には、分離解像度を向上するために、プロトタイプでの 15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR システムから、26 部位を標的とする 2 チューブのマルチプレックス PCR のシステムに変更し、改良した解析パイプラインによってそれぞれ 26 箇所の標的部位を選定した。プライマーセットの作成等は終了し、最終的な反応条件等の最適化と陽性コントロールの追加作成の作業が残っているが、当初の目的である IS-P\_O121 と IS-P\_O103 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 法は適用可能であったため、対象を拡大することが望まれていた。そこで本分担研究では、O157 用と O26 用 IS-P 法の開発経験を活かして、EHEC O121 用および EHEC O103 用の IS-P 法（以下、IS-P\_O121 と IS-P\_O103）の開発を行った。

## B. 研究方法

## 1. ゲノム情報の取得

国立感染症研究所（感染研）から O103 と O121

分離株の供与を受け、ゲノム情報を取得した。ゲノム配列の決定には、イルミナシーケンサと Platanus アッセンブラを用いた。クオリティ検定は、scaffold の総長(>5 Mb)と CheckM 解析による completeness (>95%) に基づいて行った。完全長配列の決定には、ナノポア社の MinION を用いた long read sequencing と Unicycler を用いたイルミナ配列との hybrid assembly を使用した。

## 2. 系統解析

各血清型で完全長配列が決定されている株の配列を参照配列として、各株において全ゲノムレベルで SNP を同定した。この情報を基に RAxML を用いて最尤法による高精度系統解析を行った。

## 3. IS 検索と標的 IS の決定

IS-P 標的候補の検索を行うため、両血清型の参照ゲノムに含まれる IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を、ISFinder による検索とその検索結果の個別解析により決定した。また、上記で取得したゲノム情報と ISMapper を使って、主要 IS の各菌株での分布を解析するとともに、参照ゲノムには

存在しない IS 挿入部位を検索した。

#### 4. 標的部位の選定と開発パイプラインの構築

ISMMapper を用いて O121 の参照ゲノムと解析対象株 83 株の解析を行い、ISMMapper による IS 検出の精度と *in silico* での解像度を検討した。また、ISMMapper の予測結果に基づいて最も解像度の高い組み合わせを選択できる開発パイプラインを構築した。

#### 5. IS-P O121 プロトタイプ作成と検証と検証及び開発パイプライン等の改良

上記の開発パイプラインを利用して、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。酵素、プライマー濃度等に関する至適条件の検討を行った後、19 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、開発パイプラインの改良 (IS 挿入状況解析プログラムの新規開発を含む) や標的部位数の変更含む種々の改良作業を行なった。

#### 6. IS-P O121 と IS-P O103 最終版の作成

IS-P\_O121 プロトタイプの検証結果と開発パイプラインの変更等を踏まえて、標的部位の数の変更と解像度検定用菌株の変更を行った。そのうえで、改良した開発パイプラインを用いて IS-P\_O121 と IS-P\_O103 の最終版を作成した。

(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. ゲノム情報の取得と系統解析

(1) 本研究開始時点では、O121 のゲノム情報は我々と感染研の共同研究によって蓄積できていたが (76 株)、O103 のゲノム情報は蓄積できていなかった。そこで、感染研が収集した EHEC 分離株の中から約 100 株の O103 を選択し (2007~2017 年の国内分離株、2014 年以降が中心)、その中から、開発基盤となる 73 株のゲノム情報を取得した。また、29 株の O103 を各地の地衛研から収集し、ゲノム配列を取得した。本データは、最終的な IS-P データの検証用に使用する予定である。O121 についても、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使うべきであると判断し、近年分離された 85 株 (2011~2016 年の分離株) のゲノム情報を取得した。

(2) 解析の基準となる株の完全長配列 (参照ゲノム) に関しては、O103 については 2009 年に我々が決定しており、O121 についても未発表ではあるが既に我々が決定していた (O121 51104 株: 西

田、他、未発表)。しかし、次項に記載する高精度系統解析の結果から、O103 における IS 検索には複数の系統の完全長配列が必要と判断し、主要 3 系統から 1 株ずつを選択し、1 完全長配列を新たに決定した。

#### 2. 系統解析

IS-P 標的候補の検索等を行う前段階として、菌株の偏り (特定の亜系統への集中など) の有無を検討するために、全ゲノム配列に基づく高精度系統解析を行った。

(1) O121 については、ゲノム配列を取得した 85 株のうち、配列精度に問題のあった 2 株を除く 83 株の全ゲノム SNP を用いた系統解析の結果、83 株が大きく 2 つの系統に分かれることが判明した。主系統には 79 株が含まれ、マイナー系統には 4 株が含まれたが、どちらの系統の中にも地理的な偏り (分離地域の偏り) がないことを確認した。

(2) O103 についても、73 株の全ゲノム SNP を用いた系統解析を行った結果、複数の系統が存在すること、また以前に我々が完全長配列を決定した株 (参照ゲノム株) は、マイナー系統に属することが判明した。この結果に対応するため、前項に記載したように、主要な 3 系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を取得した。

#### 3. IS 検索と標的 IS の決定

(1) O121 については、参照ゲノムの解析から、21 種類 (111 コピー) の IS を同定し、IS600 と IS629 が主要な IS であることが判明した (28 コピーと 21 コピー)。このうち、プロフェージとプロフェージ様 Integrative element 及びプラスミドに挿入されているものは、それぞれ 24 コピーと 15 コピーであった。また、今回同定した 21 種類の IS のうち 4 種類 (ISO121-1~ISO121-4) は、既知の IS と 95% 以下の相同性を示すため、新規の IS であると考えられた。以上の解析から、O121 では IS600 と IS629 を標的 IS として決定した。

(2) O103 については、参照ゲノムの解析から、27 種類 (93 コピー) の IS を同定し、IS629 が主要な IS であることを明らかにした (31 コピー)。このうち、プラスミドに挿入されているものは、それぞれ 9 コピーであった。また、今回同定した 27 種類の IS のうち 2 種類 (ISO103-1 と ISO103-2) は、新規の IS であると考えられる。この結果から、O103 では IS629 を標的 IS とすることとした。新たに完全長配列を取得した 3 株についても、ISFinder を用いて IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を検討し、IS629 が主要 IS であることを確認した。

#### 4. 標的部位の選定と開発パイプラインの構築

(1) O121 の参照ゲノムの ISMapper を用いた解析では、参照ゲノム上に存在する 28 コピーの IS600 のうち、7 コピーは近傍に繰り返し配列等が存在するに検出できなかったが、21 コピーは ISMapper で検出でき、十分な精度があると判断した。さらに、ISMapper を用いた 83 株の検索により、IS600 の分布状況によって 83 株は 65 パターンに型別され、参照配列上に存在しない 6 箇所の IS600 挿入部位も同定された。IS629 に関する同様の解析でも、参照ゲノム上に存在する 21 コピーのうち 18 コピーが ISMapper で検出でき、IS629 の分布状況によって 83 株は 74 パターンに型別され、参照配列上に存在しない 5 箇所の挿入の存在も同定された。さらに、IS600 と IS629 の分布状況を合わせて用いると、83 株が 79 パターンに分類された。

これらの結果から、IS-P\_O121 と IS-P\_O103 の開発においては、ISMapper の予測結果を基に、標的部位の選定をすすめることとした。なお、83 株の O121 のうち、マイナー系統に属する 4 株には IS600 と IS629 は少数のコピーしか存在しないことが明らかとなり、IS-P\_O121 の対象としては考慮しないこととした。

(2) O121 の主系統に属する 79 株における ISMapper を用いた IS600 と IS629 の分布・局在情報を基に、挿入部位近傍の配列を解析し、近傍に IS の存在する IS コピーを同定した。これらを標的候補部位から除外した後、IS600 と IS629 挿入部位を上流下流に分けて 4 セットの IS 挿入部位データセットを作成した。さらに、各セットのクラスタリング解析を行い、最も解像度の高い組み合わせを選択できる開発パイプラインを構築した。

#### 5. IS-P\_O121 プロトタイプの作成と検証及び開発パイプライン等の改良

(1) O121 と O103 の IS-P 法としては、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR のシステムとすることに決定した。

(2) O121 において、上記のパイプラインを用いて、15 箇所の IS600 または IS629 の挿入部位を標的部位として決定した。この際、プラスミド及び同じプロフェージ（別研究の解析で保存性が高いことが判明している Stx2 フェージを除く）からはできる限り 1 箇所のみを選択することにより、プラスミドやプロフェージの脱落による影響を抑える工夫をした。

(3) 決定した 15 箇所の標的部位を標的としたマルチプレックス PCR 用のプライマーを作成し、使用する酵素の種類やプライマー濃度等に関して条件検討を行い、PCR 条件の最適化を行った。

(4) 上記の 15 標的部位が 1 株のゲノム上には存

在しないため、特定の株を陽性コントロールとして使用することができないことが判明した。そこで、標的となる 15 領域を pUC プラスミドにクローニングし、配布用陽性コントロールを作成した。

(5) 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、実際の現場での検証を依頼した。19 の地衛研から協力を得られ、97 事例（154 株）の結果を得ることができた。その結果およびプロトタイプの作成に使用した 79 株を使った実際の PCR の解析から、以下の知見が得られた。

i) 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 IS629 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した。

ii) 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 事例について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 箇所の標的部位のうち特定の 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、IS-P の標的部位としては不適切と判定した。

iii) 解像度：各地衛研で解析された 92 事例での IS-P による分離パターンは 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 のプロトタイプの作成に使用した 79 株から抽出した DNA を使って実際の PCR で判定を行い、標的部の選定に利用した ISMapper 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、ISMapper の判定精度に問題があることが判明した。

iv) 泳動結果の判定：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例も確認された。

(6) ISMapper の判定精度には問題があることが判明したため、類似のプログラムである ISseeker を用いてみたが、ISMapper 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。ISMapper、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プログラムを IShunter に変更した。また、これに応じて開発パイプラインを変更した

(7) O103 についても、ISMapper を使った開発パイプラインを用いて、15 箇所の IS-P 標的部位を決定し、IS-P\_O121 プロトタイプと同様の IS-P\_O121 プロトタイプを作成した（プライマーと陽性コントロールの作成、反応条件の至適化）。しかし、IS-P\_O121 プロトタイプの検証から上記のような問題点が浮かび上がり、種々の改善を行う必要が明らかとなったため、プロトタイプの検証作業は中止し、最終版の作成に進むこととした。

#### 6. IS-P\_O121 と IS-P\_O103 最終版の作成

(1) IS-P\_O121 プロトタイプの検証結果と開発パイプラインの変更を踏まえて、O121 において、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部位の数を増やすこととした。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の問題点も踏まえて、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 についても、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。

(2) 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 では 61 株を、O103 では 63 株を検定に使用することとした。

(3) IS-P\_O121 最終版の開発に関しては、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検討した。その結果をもとに、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 最終版の開発に関しても、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

O121 のゲノム情報の取得に関しては、先行研究で取得済みであった国内分離株の分離年が古く、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使うべきであると判断し、当初予定を変更し、2011～2016 年の分離株 85 株のゲノム情報を取得した。O103 についても 102 株の情報を取得でき、さらに 3 株については完全長配列を決定した。これらのゲノム情報、また、取得したゲノム情報を用いた高精度系統解析から明らかになった両血清型の集団構造は、IS-P 法の開発にとって重要な知見であるが、O121 と O103 に関する様々な研究を進める上でも、重要な情報基盤となる。特に、O121 において主系統と異なる系統が見出されたことは、予想外の発見である。このマイナー系統に属する株は、IS600 と IS629 は検出できず、主要系統との遺伝的距離も、O157:H7 と O55:H7 との距離とほぼ同じレベルであることから、メジャー系統とは系統的に大きく離れた O121 系統であると考えられる。この系統の O121 株にも志賀毒素遺伝子やその他の EHEC 病原遺伝子が存在することは確認している。従って、この系統は IS600 と IS629 を用いた IS-P 法の適応外となるが、有症患者から分離されていることから、今後の分離動向については注意が必要である。

両血清型の参照株における IS の詳細な解析から、O121 では IS600 と IS629 が、O103 では IS629 が主要な IS であることを明らかとなり、この結果を基に、これらの IS を IS-P\_O121 と IS-P\_103 の標的 IS としたが、この解析から得られた IS に関する知見も、6 種類の新規 IS を同定したことを含め、細菌学的には重要な研究成果である。

プロタイプの作成を行う中で、ISMMapper を用いた IS 検索の結果を基に、最も解像度の高い標的部位の決定を行うパイプラインを構築できたことは、この研究での重要な技術的側面である。しかし、プロタイプの開発と検証を行う中で、ISMMapper の予測精度に問題があることが判明し、独自に IShunter (仮称) プログラムを開発した。このプログラムを組み込んで改良した 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、IShunter プログラムは、IS-P システムの開発だけでなく、他の IS 関連研究にも貢献すると期待される。

プロタイプの検証結果等を受けて、当初に決定した方針 (15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR の作成) を変更し、最終的な IS-P としては、26 部位を標的とした 2 チューブの解析系とした。現場での作業の煩雑性やコストを考えると 1 チューブのシステムの方が良いことは確かである。しかし、解像度の問題を考慮すると、この変更は妥当ではあると考えている。

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思われる。

#### E. 結論

O121 に関しては、2011~2016 年に分離された 83 株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析を行った結果、これまでに報告のない新規の O121 亜系統を同定した。また、参照ゲノムの解析から、IS600 と IS629 が主要な IS であることを明らかにし、この 2 つを標的として決定した。O103 に関しては、2007~2017 年の国内分離株 102 株のゲノム情報を取得し、3 株については完全長配列を決定した。参照ゲノムの解析では、IS629 が主要な IS であることを明ら

かにし、これを標的 IS とすることとした。

IS 挿入部位検索プログラムを用いた IS 検索の結果に基づいて最も解像度の高い標的部位の決定を行う開発パイプラインを構築し、これを用いて、IS-P\_O121 プロトタイプを作成し、各地の地衛研で検証を行った。この結果等を基に、開発用パイプラインを改善し (独自の IS 挿入部位検索プログラムの開発を含む)、これを用いて最終的な IS-P システムを作成した。作成した IS-P\_O121 と IS-P\_O103 は、いずれも、26 部位を標的とした 2 チューブのマルチプレックス PCR である。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) 松尾真奈、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：腸管出血性大腸菌 O121 用 IS printing の開発に向けた O121 に分布する IS の網羅的検索、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 27-29 日、福岡

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：腸管出血性大腸菌 O121 用 IS-printing system の開発を見据えた O121 に分布する IS の網羅的探索と国内分離株における分布状況の調査、腸管出血性大腸菌研究会、2018 年 11 月 8~9 日、東京

3) 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。

4) 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

5) 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.

6) 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 |