

別添 1

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

全ゲノム情報を用いた腸管出血性大腸菌サーベイランス実用化に

関する研究

平成29年度～平成30年度 総合研究報告書

研究代表者 李 謙一

平成 31 (2019) 年 4 月

別添 2

目 次

I . 総括研究報告

全ゲノム情報を用いた腸管出血性大腸菌サーベイランス実用化に関する研究-----1

李 謙一

II . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

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）
総括研究報告書

全ゲノム情報を用いた腸管出血性大腸菌サーベイランス実用化に関する研究

研究代表者 李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は、大規模な集団感染を起こしうるため、全国的なサーベイランスが行われている。本研究では、全ゲノム配列（whole genome sequence: WGS）を用いたEHECにおけるサーベイランス体制の実用化を目指し、SNP解析に影響を与える因子の解析および非メジャー血清群の解析を行った。*mutS*の欠失頻度測定では、室温での1年間の保存において同遺伝子の欠失は認められなかったが、*stx*遺伝子は最大で16.7%の頻度で脱落していた。同一患者におけるSNP蓄積頻度の推定を行ったところ、0-7か所のSNPが認められ、既報の塩基置換速度の推定よりも高い値が出ることを示された。非メジャー血清群の解析として、O69の代表株の完全長ゲノム配列を決定するとともに、計10株のWGS解析を行った結果、複数のクローナルな集団が見出された。また、EHECのWGS解析を行う自動化パイプラインの確立を行った。以上の結果から、WGSを用いたEHECサーベイランスにおける基盤となるような知見が得られたといえる。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は人に下痢などを主徴とする感染症を起こす食中毒細菌である。同菌感染症の重症例では血便や溶血性尿毒症症候群を経て死に至らしめ、国内では年間3,000名以上の感染症患者在報告されることから公衆衛生上の脅威となっている。同菌は菌体の抗原性によって多数のO血清群に分けられ、重症患者から分離される株の9割以上がO157、O26、O111、O103、O121、O145、O165（以下、メジャー血清群）に属する。一方で、O69、O5、O76、O177といった血清群でも、感染者の重症化が一定数存在することが我々のこれまでの研究から明らかになっている。現在当研究所では、地方

衛生研究所等から送付されたEHECについて、multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)法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サーベイランスによって、集団感染の検出や伝播経路の解明を試みている。

EHEC感染症の多くは、汚染食品が原因であると考えられるが、現在ほとんどの事例において原因食品は特定されていない。近年実用化されつつある全ゲノム配列（whole genome sequence: WGS）をサーベイランスに用いれば、より高精度の型別および系統情報から原因食品および伝播経路の推測を行うことが可能となる。そこで本研究では、WGSを用いたEHECサーベイランスの実用化を目指し、次の3

点の研究を行った：1) 菌株及び汚染食品保存中に出現する高率変異株 (*mutS*欠失株) の頻度および欠失機構の解明、2) 非メジャー血清群 (O69など) のEHECの完全長ゲノム配列の決定およびSNP解析手法の確立、3) WGSの自動解析パイプラインの構築。これらの研究から、効率的・高精度なEHECサーベイランスおよび地方衛生研究所等とのWGS情報共有化の仕組みを構築し、食中毒事例における原因究明および食品の安全確保に資することを目的とした。

B. 研究方法

1. *mutS*欠失機序の解明

計10株のEHEC (O157, 4株; O111, 5株; O113, 1株) について、単一コロニーを37°Cで一晩培養後、室温および-80°Cで保存した。これらの培地 10 µlを1か月、6か月および12か月後に採取し、段階希釈後、LB寒天平板に塗抹した。出現コロニーを100株釣菌し、*mutS*の全長および*stx*遺伝子を対象としたPCR(表1)によって、両遺伝子の欠失を確認した。

2. WGSを用いたEHECサーベイランス法の確立

ドラフトゲノムからコアゲノムMLST (cgMLST) を簡便・迅速に行う事ができる解析パイプラインをlocal BLASTおよびPerlを使用して構築した。*in silico*でのribosomal MLSTおよびcgMLST解析の結果は、*de novo* アセンブラーソフトウェアによって大きく異なる。そこで、cgMLST解析に適したアセンブラーの検討を行った。EHEC O26およびO121の10株(表2)について3種 (SPAdes v.3.11.1、A5-miseq v.20160825 および Platanus v.1.2.4) のアセンブラーでコンティグを作製し、コンティグ長などの統計値を集計すると共にcgMLSTを行った。この結

果を Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) によるcgMLST結果と比較した。

3. 同一患者由来EHECの解析

国内で同一患者から分離された計20事例のEHEC計42株(表3)のWGSをMiSeq (Illumina) によるペアエンド解析 (300 × 2 bp) にて行った。得られたショートリードを、O157についてはEHEC O157 Sakai株、その他のO群についてはEHEC O26 11368株を参照配列とし、既報の方法 (Leeら 2017. *Front. Microbiol.* 8.) でSNP解析を行った。得られたSNPと分離日の情報から、塩基置換速度の推定を行った。

4. 非メジャー血清群の解析

国内において重症例が報告され、EHECの病原性に重要なIII型分泌装置を有するEHEC O69-9株の完全長ゲノム配列の決定を試みた。まず、M9最小培地で37°C、16時間培養後にQIAGEN Genomic-tip 100/G を用いてDNAを抽出した。抽出DNAをPacBio RSIIシーケンサーを用いてロングリードシーケンス解析を行った。得られたロングリード配列による*de novo* アセンブリは、Hierarchical Genome Assembly Process 3 (HGAP3) およびUnicycler v.0.4.4 (Wick et al., *PLoS Comput Biol*, 2017.)を用いて行った。また、国内で分離されたEHEC O69、計10株(表4)の系統解析を行うためにMiSeq (Illumina) による全ゲノムのペアエンド解析 (300 × 2 bp) を行った。得られたショートリードを用いてコアゲノム SNP解析を行った。その際、参照配列として、EHEC O157 Sakaiの完全長ゲノム配列または本研究で完全長ゲノム配列を決定したO69-9株を用いて、両者による解析結果の比較を行った。また、BLASTをもと

にした自動解析パイプラインを確立し、保有病原性遺伝子などの解析を行った。

C. 研究結果

1. *mutS*欠失機序の解明

いずれの保存期間においても、*mutS*の欠失は認められなかった。1年間室温保存した3株からは2.1~16.7%の頻度で*stx2*が脱落していた。凍結保存株では*stx2*の脱落は認められなかった。

2. WGSを用いたEHECサーベイランス法の確立

3種のアセンブルによって得られたコンティグ(ドラフトゲノム)を比較した結果、コンティグ数及び最大コンティグ長はA5-miqおよびSPAdesで同等であり、Platanusでは他の2種のアセンブラーに劣っていた(表2)。総塩基長、GC割合およびN50の値はいずれのアセンブラーも同等であった。cgMLSTの結果をアセンブラー別に比較したところ、SPAdesでは9株でEnterobaseによる結果と一致したのに対して、A5-miseqおよびPlatanusではそれぞれ4および0株のみの一致であった(表5)。相同配列が存在しなかったアリアル数は、SPAdesが株によって0-5であったのに対して、他のアセンブラーではより多くのアリアルがドラフトゲノム中に存在しなかった。

3. 同一患者由来EHECの解析

同一患者から分離されたEHECのSNP解析を行った結果、0-7か所のSNPが存在することが明らかとなった(図1)。さらに、分離日の間隔から塩基置換速度を推定した結果、0-0.35か所/日と推定された(表3)。保有遺伝子の解析では、主にプラスミド上に存在する病原性遺伝子に保有/非保有の多型が認められた(表3)。これは、プラスミドの脱落によると考えられ

る。また、染色体上に存在すると考えられる遺伝子の多型も認められた。このうち、*nleC*および*tccPI*は、ファージ上に存在するエフェクター遺伝子であり、ファージの脱落や獲得によって保有プロファイルが変化することが示唆された。

3. 非メジャー血清群の解析

ロングリードシーケンサーから得られたリードをアセンブルした結果、完全長ゲノム配列として5.6 Mbの染色体および3種のプラスミド(それぞれ96.6, 8.3, 6.7 kb)を得ることができた(表6および図2)。国内分離株のコアゲノムSNP系統解析を行った結果、O157 Sakai株を参照配列として行った場合のSNP数の平均値は26か所であったのに対し、O69-9株を参照配列として用いた場合の平均値は178であった(表7)。

また、病原性遺伝子および薬剤耐性遺伝子の分布を調べた結果、1型志賀毒素(*stx1a*)、III型分泌装置(*eae*等)および関連エフェクター(*nleA*等)、鉄獲得関連遺伝子(*irp2*)および亜テルル酸耐性遺伝子(*terE*)を共通して保有することが判明した。一方、*espP*や*katP*といった病原プラスミドに存在する遺伝子については多型が認められた(表4)。

D. 考察

1. *mutS*欠失機序の解明

研究期間(1年間)では使用した10菌株で、*mutS*遺伝子の欠失が認められなかった。しかしながら、*stx2*の脱落が認められたことから、保存菌株の変化が生じていることが示された。今後は、さらに長期間の培養での変化や、変化しやすいと考えられるプラスミドの脱落状況などを調べる必要がある。

2. WGSを用いたEHECサーベイランス法の確立

cgMLSTを含む、自動解析パイプライン確立のために、まず信頼性の高いアセンブラーの検討を行った。この結果、SPAdesを用いることによって、より信頼性の高いドラフトゲノムを得ることが確認できた。この結果をもとに、cgMLST解析と、別事業で開発した病原性遺伝子等の検出を行うプログラムを統合し、自動的に病原性遺伝子検出やMLSTなどを行う解析パイプラインを確立した。

2. 同一患者由来EHECの解析

同一患者由来株のSNP解析の結果、0-7か所のSNPが認められた。これは、集団感染内では最大で7か所程度のSNPが認められるという先行研究 (Leeら 2017. *Front. Microbiol.* 8., Holmesら2015. *J Clin Microbiol* 53:3565-73.)の結果と一致する。しかしながら、塩基置換速度を推定した結果は、最大で年間128か所のSNPが蓄積するというものであった。大腸菌における塩基置換速度の推定は、複数が報告されているが、いずれも年間1-2か所程度であり、この値と大きく離れる。これは、近縁株のみで解析を行ったことによって、SNP数が多めに算出されたと考えられる。さらに、同一株であってもわずかな多様性が存在する集団であることも理由であると考えられる。

3. 非メジャー血清群の解析

EHEC O69の1株について完全長ゲノム配列を決定した結果、コアゲノムおよび96.6kbのプラスミドはEHEC O26:H11と相同性が高く、他のプラスミドはその他のEHECのプラスミドと相同性が高いことが明らかとなった。また、SNP解析の際に同一血清型の株を参照株として用いることによって、より多くのSNPが検出され

解析の精度を高めることができた。EHEC O69の1株について完全長ゲノム配列を決定して、SNP解析の参照配列として用いた結果、遠縁な株を参照配列として用いるよりも詳細な系統解析が可能となった。例えば、O69-5とO69-8,9および10株の間には、O157を参照配列とした場合には2または3か所のSNPのみ認められ、クローナルな菌株であることが示唆された。しかしながら、O69を参照配列とした場合には16または18か所のSNPが存在し、遺伝的な距離がある程度離れていることが明らかとなった。さらに、O69にはO26などと類似した病原プラスミドが存在しているが、株によって保有の差があることが明らかとなった。今回の菌株では、症状との明確な関連性は認められなかったが、今後分離される株については、病原プラスミドの検出を積極的に行い、症状等との関連性について明らかにする必要がある。

E . 結論

本研究では、*stx2*の欠失頻度や同一患者由来株でのSNP蓄積速度など、サーベイランスにおいて基盤となる知見が得られた。また、同一患者由来株およびO69国内由来株のいずれにおいても病原プラスミドの多型を示唆する知見が得られた。これは、分離時に既に病原プラスミドを保有していなかった可能性と、保存中に脱落した可能性が考えられる。このため、*mutS*欠失試験でもちいた保存株等を用いて、プラスミドの脱落頻度を測定することも有用と考えられる。また、自動解析パイプラインの確立によって、EHECのゲノム解析および情報の共有化が容易となり、これまでより精度の高いサーベイランスにつながると考えられる。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato M, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, Maeda E, Pierard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee K, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T. 2017. Population structure of *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple lineages. Microb Genom 3.
2. Ishijima N, Lee K, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y, Hayashi T, Ohnishi M, Iyoda S. 2017. Identification of a new virulent clade in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- sequence type 29. Sci Rep 7:43136.
3. Lee, K., M. Kusumoto, T. Iwata, S. Iyoda, and M. Akiba , Nationwide investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups , Epidemiol. Infect. , 145 , 1557-1566 , 2017.

2. 学会発表

1. Lee, K., Iyoda, S., Morita-Ishihara, T., Kimata, K., Watahiki, M., Sekizuka, T., Kuroda, M., Ohnishi, M., EHEC Working Group. 2018. Applicability of whole genome sequencing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 in the national surveillance. The 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections, Florence, Italy.
2. Ogura, Y., Gotoh, Y., Itoh, T., Sato, M., Seto, K., Yoshino, S., Isobe, J., E

toh, Y., Kurogi, M., Kimata, K., Maeda, E., Pierard, D., Kusumoto, M., Akiba, M., Tominaga, K., Kirino, Y., Ooka, T., Ishijima, N., Lee, K., Iyoda, S., Mainil, J., Hayashi, T. 2018. Population structure of *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple lineages. The 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections, Florence, Italy.

3. 菊地孝司, 李 謙一, 上野裕之, 泊賢太郎, 小堀すみえ, 嘉悦明彦, 松井真理, 鈴木里和, 関塚剛史, 黒田 誠, 宮崎元伸, 大西 真. 2018. アウトブレイク中に腸管出血性大腸菌がESBL遺伝子を獲得した事例. 第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 東京.

4. 石嶋 希, 李 謙一, 勢戸 和子, 大西 真, 伊豫田 淳. 2018. 混合感染が確認された HUS 症例 2 例から分離された腸管出血性大腸菌の性状解析. 第91回日本細菌学会総会, 福岡.

5. 石嶋 希, 李 謙一, 大西 真, 伊豫田 淳. 2018. HUS症例由来の*stx2e*, *stx2f*遺伝子保有株の病原性解析. 第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 東京.

6. 泉谷秀昌, 李 謙一, 石嶋 希, 伊豫田 淳, 大西 真. 2018. 腸管出血性大腸菌分離株の分子疫学解析状況について、2018年. 第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 東京.

7. 大岡唯祐, 李 謙一, 桂 啓介, 伊豫田 淳, 藺牟田直子, 林 哲也, 大西 真, 西順一郎. 2018. 腸管出血性大腸菌O111用IS-printing systemの開発. 第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 東京.

8. 李 謙一. 2018. 牛やその他の動物における腸管出血性大腸菌の保菌状況. In: 第101回日本細菌学会関東支部総会, 東京.

9. 李 謙一, 伊豫田 淳, 小椋 義俊, 林 哲也, 大西 真, EHEC Working Group. 2018. 腸管出血性大腸菌 O115 における国内分離株の系統解析および病原性評価. 第91回日本細菌学会総会, 福岡.
10. 李 謙一, 木全恵子, 綿引正則, 磯部 順子, 伊豫田 淳, 大西 真, EHEC Working Group. 2018. HUS患者由来LEE非保有型EHECの完全長ゲノム配列解析. 第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 東京.
11. 李 謙一, 伊豫田 淳., 泉谷秀昌, 大西 真, EHEC working group,. 2017. 腸管出血性大腸菌O157サーベイランスにおける反復配列多型解析と全ゲノム配列解析の分子型別能の比較. 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 鹿児島.
12. 木全恵子, 磯部順子, 綿引正則, 勢戸和子, 尾畑浩魅, 小西典子, 李 謙一, 伊豫田 淳, 大西 真. 2017. LEEを保有しない腸管出血性大腸菌のゲノム解析. 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 鹿児島.
13. 伊豫田 淳, 李 謙一, 石嶋 希, 勢戸和子, 齊藤剛仁, 大西 真. 2017. HUS発症例における血清診断とEHECの分離同定について. 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 鹿児島.
14. 小原敦美, 松本一俊, 近藤ひとみ, 原田誠也, 大迫英夫, 李 謙一, 伊豫田 淳, 大西 真. 2017. HUS患者から分離された EHEC O76:H7(*stx2* 陽性)について. 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 鹿児島.
15. 李 謙一, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 大西 真, EHEC Working Group. 2017. 腸管出血性大腸菌O157における反復配列多型解析と全ゲノム配列解析の比較. 第160回日本獣医学会学術集会. 鹿児島.

H . 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. *mutS* 欠失頻度測定に用いたプライマー

Primer	Target gene	Sequence (5' 3')	Amplicon size (bp)	Reference
mutS-F	<i>mutS</i>	ATGAGTGCAATAGAAAATTT	951 ^a	this study
mutS-R1		ATCGCGCACTGGCATATGCA		this study
mutS-F1		ACCCGCGTGTTGCTTGAGCG	1611	this study
mutS-R		TTACACCAGACTCTTCAAGCGATAAA		this study
LP30	<i>stx1</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348	Cebula et al., J.
LP31		CACCAGACAATGTAACCGCTG		Clin. Microbiol.,
LP43	<i>stx2</i>	ATCCTATTCCTCCGGGAGTTTACG	584	1995, p248-250
LP44		GCGTCATCGTATACACAGGAGC		

^aExpected size in EHEC O157 Sakai

表 2. アセンブラー別のドラフトゲノム統計量の比較

Serotype	Strain	Statistics	a5-miseq	Platanus	SPAdes
O26:H11 ^a	1	No. of contigs	285	918	279
		Largest contig	224,285	70,162	274,329
		Total length	5,546,492	5,153,567	5,427,786
		GC (%)	50.6	50.8	50.5
		N50	59,185	12,636	91,514
	8	No. of contigs	220	1,138	244
		Largest contig	266,864	48,488	224,910
		Total length	5,536,382	5,202,592	5,424,078
		GC (%)	50.5	51.0	50.5
		N50	102,360	9,603	105,136
	16	No. of contigs	205	810	245
		Largest contig	278,076	65,675	282,947
		Total length	5,620,003	5,285,318	5,492,102
		GC (%)	50.5	50.6	50.4
		N50	95,769	18,116	112,155
	21	No. of contigs	240	949	298
		Largest contig	233,668	74,228	230,709
		Total length	5,774,041	5,426,394	5,640,933
		GC (%)	50.5	50.7	50.4
		N50	85,581	14,860	96,948
25	No. of contigs	266	520	291	
	Largest contig	239,463	151,002	230,459	
	Total length	5,788,789	5,587,039	5,697,461	
	GC (%)	50.4	50.3	50.4	
	N50	63,142	38,866	104,236	
141341	No. of contigs	170	463	266	
	Largest contig	425,834	160,850	426,152	
	Total length	5,390,950	5,158,973	5,281,975	
	GC (%)	50.5	50.4	50.5	
	N50	138,303	54,581	134,860	
150174	No. of contigs	161	422	218	
	Largest contig	322,740	129,437	319,751	
	Total length	5,371,528	5,166,136	5,265,524	
	GC (%)	50.4	50.4	50.4	
	N50	127,612	44,439	134,860	
O121:H19	150373	No. of contigs	144	355	223
		Largest contig	436,921	229,130	435,274
		Total length	5,365,043	5,292,171	5,260,459
		GC (%)	50.4	50.4	50.4
		N50	161,233	84,618	134,860
150400	No. of contigs	148	357	217	
	Largest contig	442,834	257,870	434,980	
	Total length	5,324,964	5,255,106	5,220,650	
	GC (%)	50.5	50.5	50.5	
	N50	148,043	97,486	134,860	
150616	No. of contigs	151	447	226	
	Largest contig	435,449	152,402	435,193	
	Total length	5,356,998	5,192,610	5,259,933	
	GC (%)	50.4	50.4	50.4	
	N50	161,602	35,235	134,860	

^aSequence data was obtained from Ishijima et al. 2017. *Sci Rep* 7:43136. for O26 and Lee et al. 2017. *Front. Microbiol.* 8. for O121.

表 3. 用いた同一患者由来株とゲノム解析によって得られた塩基置換速度および保有状況に多型が認められた遺伝子

患者ID	Phylogroup	血清型	株数	塩基置換速度		多型が認められた遺伝子		
				(/day)	(/year)	染色体上	プラスミド上	薬剤耐性遺伝子
P01	B1	O146:H21	2	0				
P02	B1	O26:H11	3	0.02-0.05	9.0-18.9		<i>cba, celb</i>	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>mph(A)</i>
P03	B1	O26:H11	2	0.02	8.5	<i>gad, nleC</i>	<i>ehxA, espP, katP,</i> <i>toxB</i>	
P04	E	O157:H7	2	0	0			
P05	B1	O26:H11	2	0.09	31.3			
P06	B1	O26:H11	2	0.05	17.0	<i>gad</i>		
P07	C	OUT:H11	2	0.03	10.4			
P08	B1	O26:H11	2	0.03	9.4			
P09	B1	O26:H11	2	0.35	127.8		<i>cba, ehxA, espP, k</i> <i>atP, toxB</i>	
P10	E	O145:H28	2	0.31	112.3	<i>tccP</i>	<i>espP, katP, toxB</i>	
P11	E	O145:H28	2	0	0	<i>tccP</i>	<i>cba</i>	
P12	E	O145:H28	2	0	0			
P13	E	O145:H28	2	0	0	<i>tccP</i>	<i>ehxA</i>	
P14	E	O145:H28	2	0	0		<i>cba</i>	
P15	E	O145:H28	2	0	0	<i>tccP</i>		<i>aadA, dfrA12,</i> <i>sul</i>
P16	E	O145:H28	2	0.08	28.1	<i>tccP</i>		
P17	B1	O26:H11	2	0.08	28.1		<i>toxB</i>	
P18	B1	O26:H11	2	0	0			
P19	B1	O26:H11	2	0	0	<i>tccP</i>	<i>cba, ehxA, etpD</i>	
P20	E	O157:H7	3	0	0		<i>ehxA, cba</i>	

表 4. EHEC O69 の病原性遺伝子および薬剤耐性遺伝子に保有状況

菌株	病原性遺伝子											薬剤耐性遺伝子								
	共通	<i>astA</i>	<i>cba</i>	<i>celB</i>	<i>cma</i>	<i>ehxA</i>	<i>espP</i>	<i>gad</i>	<i>katP</i>	<i>paa</i>	<i>tccP</i>	<i>toxB</i>	<i>traT</i>	<i>aadA</i>	<i>dfxA1</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>
O69-1		+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O69-2		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O69-3		-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
O69-4	<i>cif, eae, efa1, escV, esp</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
O69-5	<i>A, espB, espF, espJ, fyu</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O69-6	<i>A, iha, ip2, ipfA, map, nl</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
O69-7	<i>eA, nleB, nleC, stx1a, ter</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O69-8	<i>E, tir, ureD</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O69-9		+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O69-10		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O69-11		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-

表 5. アセンブラー別の cgMLST 結果の比較

Serogroup	Strain	ST in Enterobase	a5-miseq		Platanus		SPAdes	
			ST	No. of null ^a	ST	No. of null	ST	No. of null
O26 ^b	1	44911	-	1	- ^c	32	-	3
	8	44928	44928	5	-	58	44928	5
	16	44914	44914	0	-	15	44914	0
	21	44924	44924	0	-	23	44924	0
	25	44920	-	164	-	18	44920	1
O121	141341	46459	-	21	-	9	46459	1
	150174	46487	-	19	-	6	46487	1
	150373	46499	46499	1	-	17	46499	1
	150400	46502	-	2	-	9	46502	1
	150616	46492	-	8	-	14	46492	1

^aNumber of null alleles, ドラフトゲノム中で相同な配列が存在しなかったアレルの数

^bSequence data was obtained from Ishijima et al. 2017. Sci Rep 7:43136. for O26 and Lee et al. 2017. Front. Microbiol. 8. for O121.

^cNo known ST was assigned

表 6. EHEC O69 NIID150949 株 コンプリートゲノム配列の概要

Statistics	Chromosome	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3
Total Length (bp)	5,587,898	96,568	8,284	6,673
GC Content (%)	50.7%	48.0%	44.0%	50.2%
N50	5,587,898	96,568	8,284	6,673
No. of CDSs	5,404	99	8	8
No. of rRNA	22	0	0	0
No. of tRNA	98	0	0	0
No. of CRISPRS	2	0	0	0
Coding Ratio (%)	86.70%	78.70%	46.10%	61.80%

表 7. 参照配列に EHEC O157 Sakai 株または O69-9 株を用いた際のコアゲノム中の

pairwise SNP 数

参照株	菌株名	No. of pairwise SNP									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
O157 Sakai											
	1										
	2	14									
	3	7	11								
	4	35	43	36							
	5	30	38	31	35						
	6	38	46	39	29	38					
	7	6	16	9	37	32	40				
	8	30	38	31	35	2	38	32			
	9	30	38	31	35	2	38	32	0		
	10	31	39	32	36	3	39	33	1	1	
	11	4	12	5	33	26	36	6	26	26	27
O69-9											
	1										
	2	71									
	3	206	223								
	4	83	78	235							
	5	197	214	257	226						
	6	243	260	195	272	294					
	7	59	88	223	100	214	260				
	8	191	208	251	220	16	288	208			
	9	191	208	251	220	16	288	208	0		
	10	193	210	253	222	18	290	210	2	2	
	11	69	84	221	96	208	258	86	202	202	204

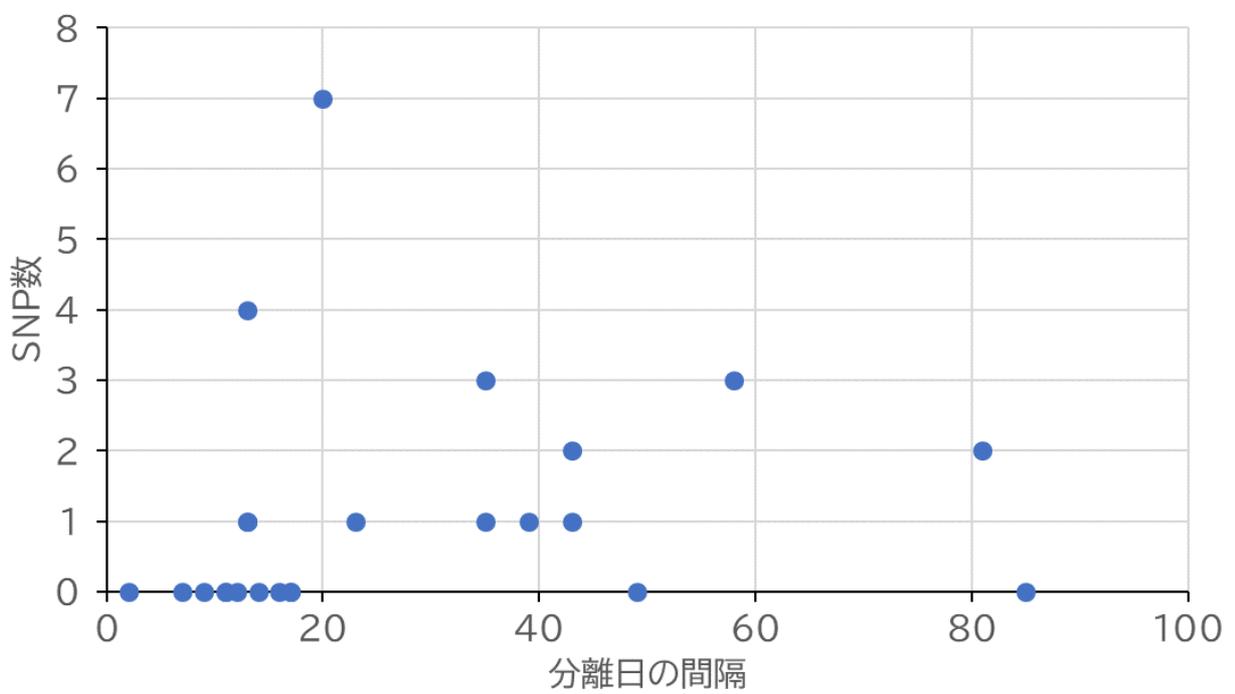


図 1. 同一患者由来株における分離日の間隔と SNP 数の関連性を示した散布図

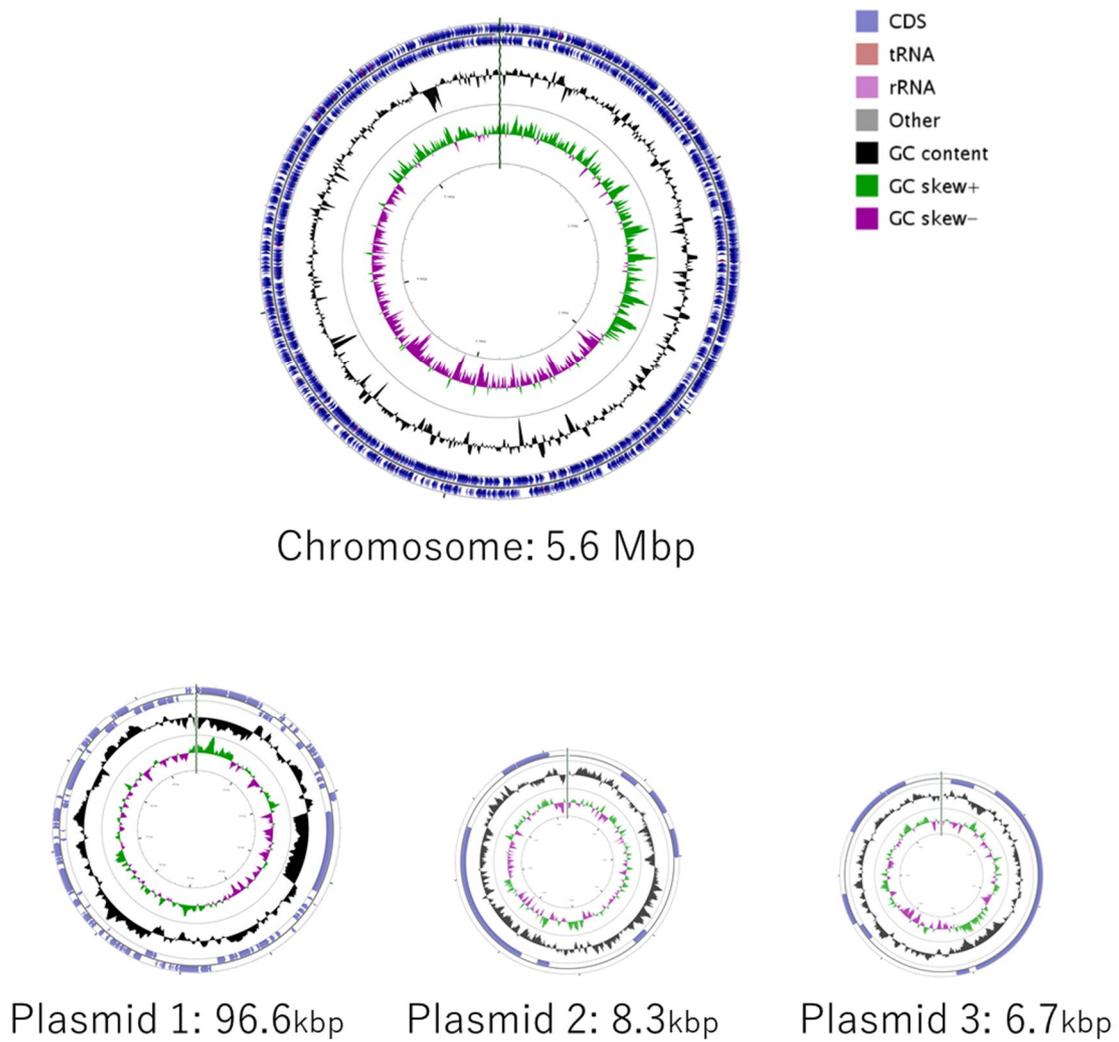


図 2. EHEC O69 NIID150949 株の完全長ゲノム配列

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato M, Seto K, Yoshino S, Ito J, Etoh Y, Kuragi M, Kimata K, Maeda E, Pierard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee K, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T.	Population structure of <i>Escherichia coli</i> O26:H11 with recent and repeated stx2 acquisition in multiple lineages	Microb Genom	3		2017
Ishijima N, Lee K, Kuwahara T, Nakayama-Imahiji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y, Hayashi T, Ohnishi M, Iyoda S.	Identification of a new virulent clade in enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O26:H11/H- sequence type	Sci Rep	7	43136	2017
Lee, K., M. Kusumoto, T. Iwata, S. Iyoda, and M. Akiba	Nationwide investigation of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups	Epidemiol. Infect.	145	1557-1566	2017