

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）  
分担研究報告書食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究  
分担課題 腸管出血性大腸菌等の検査法(全ゲノム解析)の開発  
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

腸管出血性大腸菌（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てきたが、国内では反復配列多型解析法（MLVA 法）がその迅速性・精微性から主に用いられてきた。本研究班は、MLVA に関する蓄積データの検証や地方衛生研究所における利用促進のための精度管理手法の確立などを行うとともに、EHEC 等の検査への全ゲノム解析の適用に関する検討を行うことを目的とした。本分担者は、他の分担者とともに後者の課題を担当し、我が国でゲノム情報を利用したサーベイランスや事例調査を効率的に実施するために求められる解析手法とデータベースの必要要件等を明らかにするため、欧米諸国におけるゲノム情報の活用状況、使用する解析パイプラインやデータベース等の調査を行うとともに、我が国での活用法について検討した。この結果、ゲノム解析の主流はイルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であるが、解析パイプラインは国や研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクローンの判定基準についても国際的なコンセンサスが得られていないことから、国内で使用すべき解析パイプライン等に関しては、国際的に整合性のあるデータフォーマットや同一クローンの判定基準などを決定することが難しいことが明らかとなった。したがって、ゲノム情報の幅広い活用を我が国で早期に開始するためには独自のパイプラインを構築する必要があると結論した。これと並行して、ゲノム情報の収集とデータベース構築を進め、国内分離株のゲノム情報の収集整理を行い、これに公共データベースから収集した海外株のゲノム情報を加えたデータベースを構築した。参照配列になりうる株については、ロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。その結果、主要 EHEC 血清型のうち、0157、026、0145、0103、0121、0165 のグローバルなゲノム情報データベースを構築できた。0157 に関しては、0157 全体のデータベースとは別に、特に病原性が高いとされる clade 8 に特化したデータベースを構築し、0103 と 0165 に関しては血清型が異なる近縁株を含めたデータベースを構築した。さらに、収集整備したゲノム情報を利用して、各血清型のグローバルな集団構造とその中での国内株の分布等を明らかにするとともに、Stx フェージのバリエーションや Stx 産生量の菌株間での多様性等に関する詳細な解析を行い、その成果を論文化した。

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（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てきたが、反復配列多型解析法（MLVA 法）が迅速性・精微性に優れていることから、国内では MLVA 法を用いた解析が主に行われてきた。本研究班の目的の 1 つは、MLVA に関する蓄積データの検証や地方衛生研究所での利用促進のための精度管理手法の確立等であるが、もう一つの目的は「EHEC 等の検査への全ゲノム解析（WGS）の適用に関する検討」であり、本分担者は、

この課題を担当した。本分担課題は、国際整合性の観点から実施したものであり、まず海外で展開されている解析手法とデータベース（DB）等を検証し、国内の現状を踏まえた上で、効率的に事例調査やサーベイランスを実施するための解析手法とデータベースの必要要件等を明らかにすることを目指した。また、これと並行して、これまでに蓄積された国内分離株のゲノムデータと新たに取得する国内株のデータの整理と解析を行うとともに、海外株のデータを公共 DB から収集して EHEC

の WGS 情報 DB を構築し、さらに、これらの検証・解析結果を踏まえて、地方衛生研究所等でも利用可能な解析パイプライン、国際的に整合性のあるデータフォーマットや同一クローンの判定基準等を確立することを目標とした。また、本研究班では、これらの課題と関連して、MLVA 及び WGS 解析から得られたデータを利用して感染源や経路経路等に関する後方視的な疫学解析手法を検証することも目的とした。そのため、主感染源である食品からの分離菌株の WGS データ収集を可能とする方策の検討と臨床分離株との比較、同様に動物由来株のデータ収集を可能とする方策の検討と事例調査への利用を試みることであったため、本分担者は、これらの食品・動物分離株の WGS データ収集を随時サポートし、必要に応じて、上記のゲノム情報 DB に組み込んで解析する役割も担った。

## B. 研究方法

(1) 国内で WGS 解析を利用した事例調査とサーベイランスを効率的に実施するために求められる解析手法と DB の必要要件等を明らかにするため、文献情報を基に欧米諸国（英国、他のヨーロッパ諸国、米国、カナダ）における WGS の活用状況、解析パイプラインや DB 整備等の調査を行い、我が国の現状を踏まえた活用法について検討した。具体的には、WGS データの取得方法、解析法と解釈の基準、利用している DB、データフォーマット等を調査した。

(2) 既に蓄積されている国内分離株の WGS データの収集と整理を行なった。また、一部の血清型については、分担者あるいは本研究班の代表者らによって新たに WGS 情報を算出した。また、公共 DB（NCBI/EMBL/DDBJ と ENTEROBASE）から海外株のデータを収集した。WGS 情報の新規取得には、基本的にはイルミナ社のシーケンサ（MiSeq または NovaSeq）を使用し、ショートリード配列を取得した。参照配列になりうる代表的な菌株等については、ONT 社の MinION を用いたロングリードシーケンシングを併用して、完全長あるいは完全長に近い配列を取得した。その他、0157 clade 8、026、0145、0121 などについては、収集した WGS データに加え、Stx ファージ領域の個別シーケンス、Stx 産生量の測定（定量系の開発を含む）を行い、Stx ファージの多様性の解析や Stx 高産生亜系統の検索等を行った。

（倫理面への配慮）

該当しない

## C. 研究結果

(1) 欧米諸国における WGS の活用状況、解析パイプラインや DB 整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討：

シーケンシングの主流は、イルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であり、後発の中国製（MGI 社）のシーケンサの利用に関しては、欧米での利用が拡大していない。ロングリードシーケンサの利用は研究面にとどまっており、一般的なサーベイランス等での利用は現時点では行われていない。

解析パイプラインは、調査研究機関によって様々であり、WGS の取得には、i) 参照配列に対するリードマッピング、ii) リード配列のアセンブリのいずれかであり、後者で使われるアセンブラには SPAdes と Velvet が多く使われている。国内（分担者も含む）では、Platanus-b もアセンブリに使用されており、近縁菌株の SNP 解析には BactSNP も使用されている。WGS の解析では、i) コアゲノム配列に基づく系統解析、ii) コア遺伝子の配列に基づく系統解析、iii) コアゲノムあるいはコア遺伝子の配列に基づく cgMLST (core gene Multi Locus Sequence Typing) または wg (whole genome) MLST のいずれかが使用できるが、ii) と iii) が主流である。集団事例に関連するクローンの判定基準については、コアゲノムまたはコア遺伝子の SNP 距離（5 SNPs など）を採用していることが多いが、解析対象によって異なり、国際的なコンセンサスは得られていない。各血清型で使用するコアゲノムあるいはコア遺伝子についても同様で、こういった配列あるいは遺伝子を使うかについても、国際的なコンセンサスは得られていない。したがって、国際的なコンセンサスに基づいて国内で使用する解析パイプラインを決定することは難しく、現時点では現実的ではない。

(2) 国内・国外分離株の WGS 情報データの収集・解析と DB 構築：

主要 EHEC 血清群に関して、本分担者がこれまでに取得したデータ、新規に取得したデータ、公共 DB から取得したデータ（海外株のデータ）の収集を行った。3つの血清型については先行して収集整備を行い [026 (540 株：国内株は 314)、0145

(246 株：国内株は 88)、0121 (638 株：国内株は 211 株)、グローバルな集団構造とその中での国内株の系統進化的な分布、Stx 2 産生量の多様性 (Stx 2 定量系の作成を含む)などを明らかにし、論文文化した。026 に関しては、収集した WGS データに加えて、Stx1 ファージ領域の個別シーケンス、Stx1 定量系の作成を新たに行い、Stx1 ファージ領域の詳細な解析から 026 における Stx1 ファージの多様性を明らかにし、論文発表した。0145 に関しても、Stx2 について同様な解析を行った (論文準備中)。0121 については、収集した WGS データに加え、*lac* オペロンと *iee* 遺伝子や IS の関係を解析し、ラクトース利用能の多様性と多様化メカニズムを明らかにし、論文発表した。

0165:H25 に関しては、近縁株 (0172 : H25 EHEC など) を加えて、clonal complex 119 (CC119) としてデータを収集し、最終的に 197 株 (国内は 77 株) からなる WGS 情報 DB を構築した。CC119 についても、この情報を基に系統解析などを行って、グローバルな集団構造とその中での日本分離株の分布を明らかにし、論文発表した。

0103:H2 に関しては、当初の解析で、系統の大きくなる 2 つの系統が存在することが明らかになり、さらに近縁株を含めた解析を行う中で、近縁株を含めた clonal complex として解析する必要があることが判明した。そのため、主要系統については、ST17 complex として、0 抗原型が異なる近縁株も含めた WGS 情報を収集した。具体的には、主要系統の 0103:H2 に加えて、40 の血清型 (69 の ST) に属する 6,091 株のゲノム情報を収集した (国内株は 199 株)。現在、これらの株のうち、低品質のものや菌株情報が不十分なものを除いた 5,051 株の WGS を使って大規模な系統解析を行っているところである。ST2307 を代表とするマイナー系統に関しては、少数の海外株 (ベルギー株など) の WGS 情報を追加収集して 080:H2 を中心とした小規模な比較解析のみを行い、論文発表した。

0157:H7 に関しては、特に病原性が高いと推察されている clade 8 の WGS 情報整備を最初に行った。最終的に 511 株 (国内株は 150 : 亜系統を代表する 18 株については完全長配列を取得) のゲノム情報を収集整備した。また、その詳細な解析から、clade 8 のグローバルな集団構造を明ら

かにするとともに、Stx2 高産生性で重症化頻度の高い亜系統を同定するなどの知見を得て、論文発表した。0157:H7 全体に関してもグローバルな WGS 情報の収集整備を進め、7,290 株 (国内は 3,275 株) からなる DB を構築した。このうち、分担者が以前にシーケンスした国内分離株の中には、当時のライブラリー調整キットの性能の関係で品質の低いものが多く含まれていたため、960 株を再シーケンスし、DB に組み込んだ。現在、これらの株の WGS 情報を使って大規模な系統解析を行っているところである。

食品や動物からの分離菌株のゲノムデータ収集については、本研究期間中には該当する解析対象がなかったため、実施しなかった。

#### D. 考察

(1) 欧米諸国における WGS の活用状況、解析パイプラインや DB 整備等の調査と我が国の現状を踏まえた活用法についての検討：

WGS 解析の主流がイルミナのシーケンサを用いたショートリード配列の取得であるが、解析パイプラインは国あるいは研究機関によって様々であり、集団事例に関連するクローンの判定基準についても国際的なコンセンサスは得られていない。したがって、国内で使用するべき解析パイプラインに関しては、国際的に整合性のあるデータフォーマットや同一クローンの判定基準等を確立することは難しいと考えられ、WGS の幅広い活用を我が国で早期に開始するためには独自のパイプラインを構築する必要がある。この点に関しては、コア遺伝子セットの配列に基づく cgMLST が地方衛生研究所などでは最も取り入れやすい手法であると思われる。この場合、英国等で使用されている約 2,600 の遺伝子セットと共通の大腸菌コア遺伝子セットも使用すれば、国際的にデータを共有できる可能性が高まるだけでなく、他の病原性大腸菌にも同じ解析パイプラインが利用できるというメリットがある。

(2) 国内・国外分離株の WGS 情報データの収集・解析と DB 構築：

上記のように、主要 EHEC 血清群のうち、0157、026、0145、0103、0121、0165 の WGS データの収集・整理を進めたが、海外からの公共 DB への登録が急速に進んでいること、また 0103 や 0165 のように、血清型は

異なるが極めて近縁の EHEC が存在することが明らかになったことから、0157 と 0103 では非常に大規模な WGS 情報 DB を構築することになった。他の血清型についても、幅広い継続的な収集と DB のアップデートが必要である。また、0103 や 0165 以外の血清型に関しても、近縁株を含めた DB に変更することを検討する必要がある。さらに、データ重複や品質の問題、株情報の不備等の問題があるため、収集したデータに関しては、整理作業を行っていく必要がある。同時に、DB のスリム化を図るために近縁クローンなどの重複を一定の基準で除外することも検討すべきである。参照配列あるいは landmark となりうる株に関しては、完全長あるいはそれに近い高精度配列を準備することも重要である。このような解析に加えて、国内株については Stx の産生量や臨床情報が利用できるという我が国の強みを生かして、今回行った 0157:H7 clade 8 の解析のように、高リスク系統の同定やその発生动向変化などを解析することも DB の活用という観点からは必要である。

#### E. 結論

欧米諸国の状況に関しては、シーケンシングの主流がイルミナのシーケンサーを用いたショートリード配列の取得である一方、集団事例に関連するクローンの判定基準や使用する解析パイプラインについては国際的なコンセンサスは得られていないため、WGS の幅広い活用を我が国で早期に開始するためには独自のパイプラインを構築する必要がある。

WGS 情報 DB の構築に関しては、主要 EHEC 血清群のうち、0157、026、0103、0145、0165 の国内・国外分離株の WGS データの収集・整理を行い、各血清型においてグローバルな大規模 DB を構築した。0103 と 0165 については、0 抗原型が異なる近縁株も含めた DB を構築したが、他の血清型についても同様な DB の構築を進める必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Nakamura K, Ogura Y, Gotoh Y, Hayashi T.: Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion

effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in *Escherichia coli*, PLoS Pathogens, 17(4):e1009073, 2021.

(2) Nakamura K, Tokuda C, Arimitsu H, Etoh Y, Hamasaki M, Deguchi Y, Taniguchi I, Gotoh Y, Ogura Y, Hayashi T.: Development of a homogeneous time-resolved FRET (HTRF) assay for the quantification of Shiga toxin 2 produced by *E. coli*. PeerJ, 9:e11871, 2021.

(3) Nishida R, Nakamura K, Taniguchi I, Murase K, Ooka T, Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Toyoda A, Mainil JG, Piérard D, Seto K, Harada T, Isobe J, Kimata K, Etoh Y, Hamasaki M, Narimatsu H, Yatsuyanagi J, Kameyama M, Matsumoto Y, Nagai Y, Kawase J, Yokoyama E, Ishikawa K, Shiimoto T, Lee K, Kang D, Akashi K, Ohnishi M, Iyoda S, Hayashi T.: The global population structure and evolutionary history of the acquisition of major virulence factor-encoding genetic elements in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121:H19, Microbial Genomics, 7(12):000716, 2021.

(4) Nakamura K, Seto K, Isobe J, Taniguchi I, Gotoh Y, Hayashi T.: Insertion Sequence (IS)-Excision Enhancer (IEE)-Mediated IS Excision from the lacZ Gene Restores the Lactose Utilization Defect of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O121:H19 Strains and Is Responsible for Their Delayed Lactose Utilization Phenotype, Applied Environmental Microbiology, 88(16):e0076022, 2022.

(5) Miyata T, Taniguchi I, Nakamura K, Gotoh Y, Yoshimura D, Itoh T, Hirai S, Yokoyama E, Ohnishi M, Iyoda S, Ogura Y, Hayashi T.: Alteration of a Shiga toxin-encoding phage associated with a change in toxin production level and disease severity in *Escherichia coli*. Microbial Genomics, 9:0009935, 2023.

(6) Ikeda R, Nakamura K, Saulmont M, Habets A, Duprez JN, Korsak N, Hayashi T, Thiry D, Mainil JG.: *Escherichia coli* O80 in Healthy Cattle: Absence of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *E. coli* O80:H2 and (Phylo) Genomics of

Non-Clonal Complex 165 *E. coli* O80, *Microorganisms*, 11(2):230, 2023.

(7) Yano B, Taniguchi I, Gotoh Y, Hayashi T, & Nakamura K: Dynamic changes in Shiga toxin (Stx) 1 transducing phage throughout the evolution of O26:H11 Stx-producing *Escherichia coli*, *Scientific Reports*, 13(1):4935, 2023.

(8) Nakamura K, Seto K, Lee K, Ooka T, Gotoh, Taniguchi I, Ogura Y, Mainil JG, Piérard D, Harata T, Etoh Y, Ueda A, Hamasaki M., Isobe H, Kimata K, Narimatsu H, Yatsuyanagi J, Ohnishi M, Iyoda S, Hayashi T: Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25, *Microbial Genomics*, 9:000959, 2023.

## 2. 学会発表

(1) 林哲也 (教育講演) : 腸管出血性大腸菌のゲノム解析 : 次世代シーケンサを用いた感染症と病原体の解析の例として, 第90回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第63回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第68回日本化学療法学会西日本支部総会 (合同学術集会), 2020. 11. 5-7, 福岡.

(2) 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也 : プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム, 第15回日本ゲノム微生物学会年会, 2021. 3. 4-6, 福岡.

(3) 宮田達弥, 小椋義俊, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊豫田淳, 伊藤武彦, 大西真, 林哲也 : EHEC O157 clade 8のゲノム多様性とStx2とStx2ファージのバリエーション, 第94回日本細菌学会総会, 2021. 3. 23-25, 岡山.

(4) 中村佳司, 小椋義俊, 後藤恭宏, 林哲也 : プロファージ内プロファージによる大腸菌への3型分泌エフェクターと志賀毒素遺伝子の蓄積メカニズム, 第94回日本細菌学会総会, 2021. 3. 23-25, 岡山.

(5) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也 : 腸管出血性大腸菌O26:H11におけるStxファージの遺伝的多様性とダイナミクス, 第94回日本細菌学会総会, 2021. 3. 23-25, 岡山.

(6) 林哲也 (招待講演) : 次世代シーケンサ (NGS) の活用によって進展する細菌ゲ

ノムの進化・多様性解析, 2021年第41回阿蘇シンポジウム, 2021. 8. 21, 阿蘇市.

(7) 林哲也 (特別講演) : 大規模ゲノム解析から紐解く細菌の多様性, 2021年度日本生化学会九州支部例会, 2021. 6. 12, 久留米 (オンライン).

(8) 林哲也 (特別講演) : 細菌感染症とゲノム解析について, 令和3年度地方衛生研究所地域専門家会議 (地域保健総合推進事業), 2021. 11. 25, 太宰府

(9) 林哲也 (招待講演) : ゲノム解析を基盤とした細菌学遺伝的多様性に関する研究, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 30, 東京 (オンライン).

(10) 矢野文悟, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 中村佳司 : 腸管出血性大腸菌 O26:H11 ST21 系統における Stx1 ファージのゲノム多様性, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(11) 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 李謙一, 大岡唯祐, 小椋義俊, 大西真, 伊豫田淳, 林哲也 : 大腸菌 O103:H2 国内分離株とデータベース株を用いた高精度系統解析及び完全長配列決定株のゲノム構造比較, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(12) 中村佳司, 瀬戸和子, 磯部順子, 林哲也 : 挿入配列の切り出しによる大腸菌 O121:H19 の乳糖分解性の再活性化, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(13) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 小椋義俊, 大西真, 伊豫田淳, 林哲也 : 完全長配列を用いた EHEC O157 clade 8 のゲノムと Stx2 ファージの多様性解析, 第95回日本細菌学会総会, 2022. 3. 29-31, 東京 (オンライン).

(14) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊藤武彦, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC O157:H7 clade 8 のグローバルな集団構造および系統・Stx2a phage subtype と Stx2 産生量・重症度の関連性, 第24回 EHEC 研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(15) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 志賀毒素産生性大腸菌 O26:H11 ST21 系統における Stx1 ファージゲノム多様性と Stx1 産生性. 第24回 EHEC 研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(16) 西田留梨子, 中村佳司, 谷口愛樹, 伊豫田淳, 林哲也, STEC O121:H19 のグローバルな集団構造と主要病原因子をコードする遺伝子の進化. 第24回 EHEC 研究

会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(17) 中村佳司, 勢戸和子, 磯部順子, 林哲也, Insertion sequence (IS)-excision enhancer (IEE)を介したISの切り出しによるSTEC 0121:H19の乳糖分解性の変化における乳糖の関与. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(18) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 吉村大, 伊藤武彦, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC 0157:H7 clade 8のグローバルな集団構造および系統・Stx2a phage subtypeとStx2産生量・重症度の関連性. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(19) 矢野文悟, 中村佳司, 谷口愛樹, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 志賀毒素産生性大腸菌 026:H11 ST21系統におけるStx1ファージゲノム多様性とStx1産生性. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(20) 西田留梨子, 中村佳司, 谷口愛樹, 伊豫田淳, 林哲也, STEC 0121:H19のグローバルな集団構造と主要病原因子をコードする遺伝子の進化. 第24回EHEC研究会,

2022. 10. 13-14, 川崎.

(21) 中村佳司, 勢戸和子, 磯部順子, 林哲也, Insertion sequence (IS)-excision enhancer (IEE)を介したISの切り出しによるSTEC 0121:H19の乳糖分解性の変化における乳糖の関与. 第24回EHEC研究会, 2022. 10. 13-14, 川崎.

(22) 林哲也(特別講演): 次世代シーケンサを活用した病原細菌と細菌感染症研究, 第54回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2022. 11. 5, 福岡.

(23) 宮田達弥, 谷口愛樹, 中村佳司, 後藤恭宏, 平井晋一郎, 横山栄二, 大西真, 伊豫田淳, 小椋義俊, 林哲也, STEC 0157:H7 clade 8の世界的な集団構造とStx2とStx2aファージのバリエーション. 第96回日本細菌学会総会, 2023. 3. 16-18, 姫路.

(24) 中村佳司, 瀬戸和子, 李謙一, 後藤恭宏, 伊豫田淳, 林哲也, 隠れた志賀毒素産生性大腸菌系統, Clonal complex 119(CC119)の集団構造とCC119菌株の糖代謝. 第96回日本細菌学会総会, 2023. 3. 16-18, 姫路.

