

厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」

(R2-新興行政-一般-001)

研究分担報告書

分担研究課題 「全ゲノム解析による O157 の分子疫学的解析」

研究分担者 伊豫田 淳 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究協力者 李 謙一 (国立感染症研究所 細菌第一部)、
地方衛生研究所等

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) のサーベイランスにおける全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) 解析の有効性を検証するために、EHEC O157 の WGS 解析を行った。2020 年に分離された 202 株の O157 菌株の WGS 配列を新たに解読し、計 1146 株の WGS から単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を抽出した。multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) と SNP の比較を行ったところ、一部の例外を除き、MLVA で同一型または 1 座位のみ異なる型では少数の SNP のみ認められることが確認された。上記の解析結果をもとに、2020 年に報告された 3 事例の MLVA コンプレックスについて WGS 解析を行い、1178 株分の SNP データベースから近縁株を抽出した。この結果、2 事例ではコンプレックスとなった株のみが 10 か所以内の SNP を有していた。一方、コンプレックス 20c022 では、100 株以上の近縁株が抽出され、国内で近縁性の高い集団が流行型となっていることが判明した。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) は食品を媒介として人へ感染し、感染に必要な菌量も少ないことから、しばしば広域食中毒の原因となる。現在、同菌感染症の早期検知や原因の究明を目的としたサーベイランスでは、multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) 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菌株間の比較が行われている。近年、高速シーケンサーの実用化によ

り、集団感染等の調査に全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) を用いた解析が取り入れられつつある。これまでの研究によって、EHEC O157 においては MLVA と single nucleotide polymorphism (SNP) 解析は高い相関性を有することが示されている。本年度はそれを検証するためにより網羅的に国内株の解析を行った。また、これまでに確立した SNP データベースを用いて、2020 年に多数報告された MLVA 型の SNP 解析を行い、近縁株の抽出や関連性の解析を行った。

B. 研究方法

2020年1月から8月に分離された EHEC O157 202 株（150種の MLVA 型）について、ゲノム DNA 抽出を行い、Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina) または QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを使用して、HiSeqX (illumina) によってペアエンドシーケンシング (150-mer×2) を行った。得られたショートリードは、これまでに感染研・細菌第一部で既に解読した計 944 株の WGS と合わせ、BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインにて SNP を抽出し、MLVA 型別との比較を行った。

また、2020年に分離株数の多かった3種の MLVA コンプレックス (20c006, 20c020, および 20c022) について、これまでに感染研で SNP 情報をデータベース化した O157 計 1178 株から近縁な株を抽出した。先行研究では、集団感染由来株は 0-7 か所の SNP が存在することが知られているため、20c006 および 20c020 では SNP が 10 か所以内の株を抽出した。一方、20c020 では中心となる MLVA (16m0039) において、同一型でも 14 か所の SNP が存在したことから、2020年に分離された 16m0039 の株から 14 か所以内の SNP が存在する株を抽出した。

C. 研究結果

1. 国内 EHEC O157 1,146 株における MLVA と SNP 解析の比較

国内で 2020年に分離された EHEC O157 計 202 株と 2019年までに分離され

た 1,146 株における MLVA と SNP 解析との比較結果を図 1 に示す。これまでは、集団感染関連株や分離数の多い MLVA 型を中心に解析を行ってきたが、本年度は散発事例 (150 種の MLVA 型のうち、70 種は同一型が分離されていない散発事例) を含めた解析を行い、より網羅的に比較を行った。MLVA の差異別に見た SNP の平均値は、同一型、single locus variant, double-locus variant, triple-locus variant (SLV, DLV, TLV) でそれぞれ 2, 6, 12, 20 であり、MLVA で異なる座位が増えるにつれて SNP が蓄積する傾向が見られた。一方で、SLV でも 100 か所以上の SNP が存在する例や、11 か所の MLVA 座位が異なる場合にも SNP が存在しない例も認められた。今後、これらの株の関連性や特徴的な MLVA 座位等について、詳細に検討する必要がある。

2. 2020年集団感染事例の解析

EHEC O157 を対象に 2020年に同一 MLVA 型が多数発生した3種の MLVA コンプレックスについて、これまでに構築した EHEC の SNP データベースから近縁株を抽出して解析を行った。

コンプレックス 20c006 は、岡山県および栃木県で計 12 株が報告され、20m0067 および SLV、DLV からなるコンプレックスを形成していた。そこで、20m0067 の株 (J2020-1) を基準として、SNP が 10 か所以内の株を抽出した。その結果、抽出された株はいずれも 20c006 に含まれる SLV または DLV であり、株間の SNP は最大で 2 か所であった (図 2)。

コンプレックス 20c020 は、主な MLVA

型を 20m0041 とし、SLV である 20m0198 から構成され、全国的に 17 株が報告されている。20m0041 の菌株を基準に SNP が 10 か所以内の株を抽出したところ、20m0041 の 2 株を含む計 6 株が抽出された。20m0041 の菌株間の SNP は 0 または 1 か所と、非常に近縁であった。その他の近縁株は、2019 年以前に分離された MLVA で 1 から 3 座位が異なる株であったが、18 か所以上の SNP が存在した (図 3) (近縁株で再解析を行ったために 10 か所以上の SNP が抽出された)。

コンプレックス 20c022 は、16m0039 を主な MLVA 型とし、全国的に 26 株が報告されている。同 MLVA 型では、同一型でも 14 か所の SNP が存在する場合があったことから、データベースから 14 か所以内の SNP が存在する菌株を抽出した。その結果、計 106 株が近縁株として抽出された (図 4)。これらの菌株には、2013 年分離株から 2020 年分離株までが含まれており、最大で MLVA 型が 5 座位異なる株が含まれていた。

D. 考察

これまでの EHEC O157 における MLVA と SNP 解析の比較では、集団感染株等の分離数の多い型を主な対象としてきたが、本年は散发事例株を含めた解析を行い、より網羅的に MLVA と SNP 解析の比較を行った。その結果、大部分の菌株間においては、これまでの解析と類似の傾向が見られた。すなわち、数か月以内に分離された同一型および SLV は、最大でも 10 か所程度の SNP のみ有する、という傾向であった。しかしながら、SLV でも数十か所の

SNP が存在する事例や、10 座位以上の MLVA 座位が異なっても SNP が存在しない事例等の例外的な事例が多く見られた。これらの事例については、特定の座位が関与している可能性や、異なる座位のリピート数の差などをより詳細に検討する必要がある。

2020 年に流行した MLVA コンプレックスの解析では、20c006 および 20c020 の事例では、コンプレックスとなった株のみが SNP でも近縁株となった。これらの結果は、MLVA で差異の大きい株間や、分離日が離れている類似型の株間では、SNP が多数存在する場合がある、というこれまでの知見と一致するものであった。

一方 20c022 の事例では、ごく少数の SNP (<14 か所) のみ存在する近縁な集団が、少なくとも 2013 年から国内で継続的に分離されていることが明らかとなった。本集団は、今回の解析株の約 9% を占めることから、国内 EHEC 制御の上で重要であることが示唆された。また、本集団の菌株については MLVA が類似していても SNP が多数存在する場合があり、MLVA の変異速度が遅い可能性がある。

E. 結論

本研究では、国内 EHEC O157 の網羅的ゲノム解析によって、MLVA と SNP 解析の関係性がより詳細に明らかとなった。また、一部で遺伝的近縁性の高い集団が継続的に国内で流行していることが明らかとなった。今後、このような流行型が他に存在するか探索するとともに、流行型の由来や分布について明らかにすることが、より効果的な EHEC 制御につながる

と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

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

図 1. MLVA と SNP の関連性

MLVA の異なる座位数別に見た SNP の分布を箱ひげ図で示す。

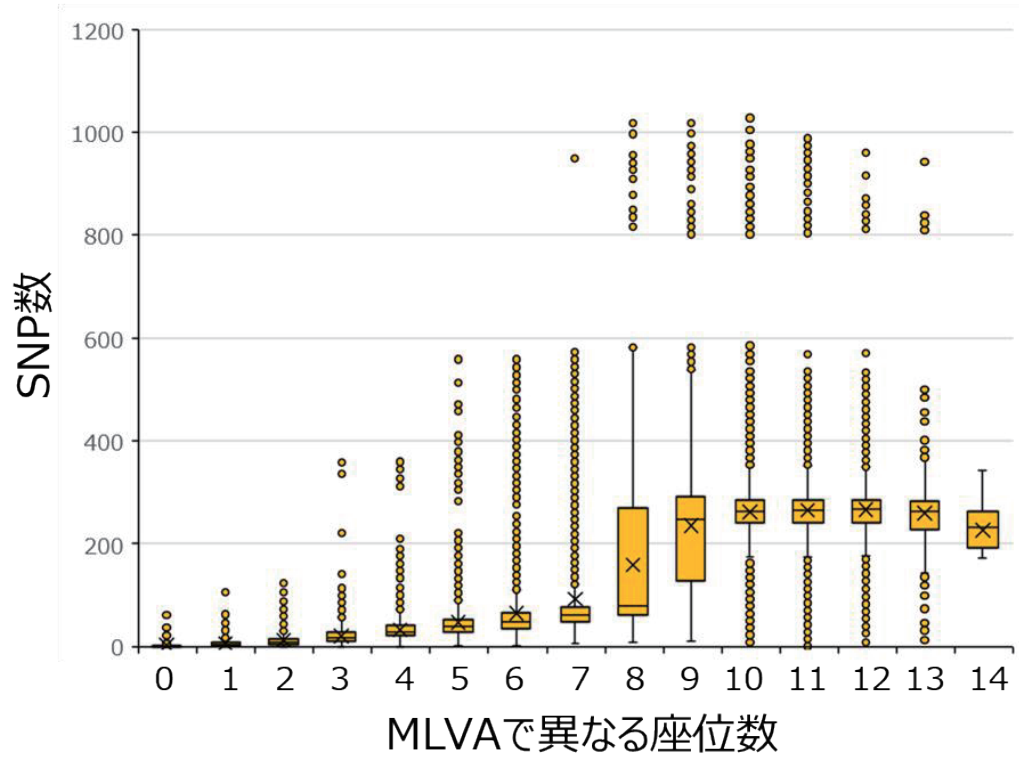


図 2. 20c006 における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 20m0067 と異なる MLVA 座位数を示す。

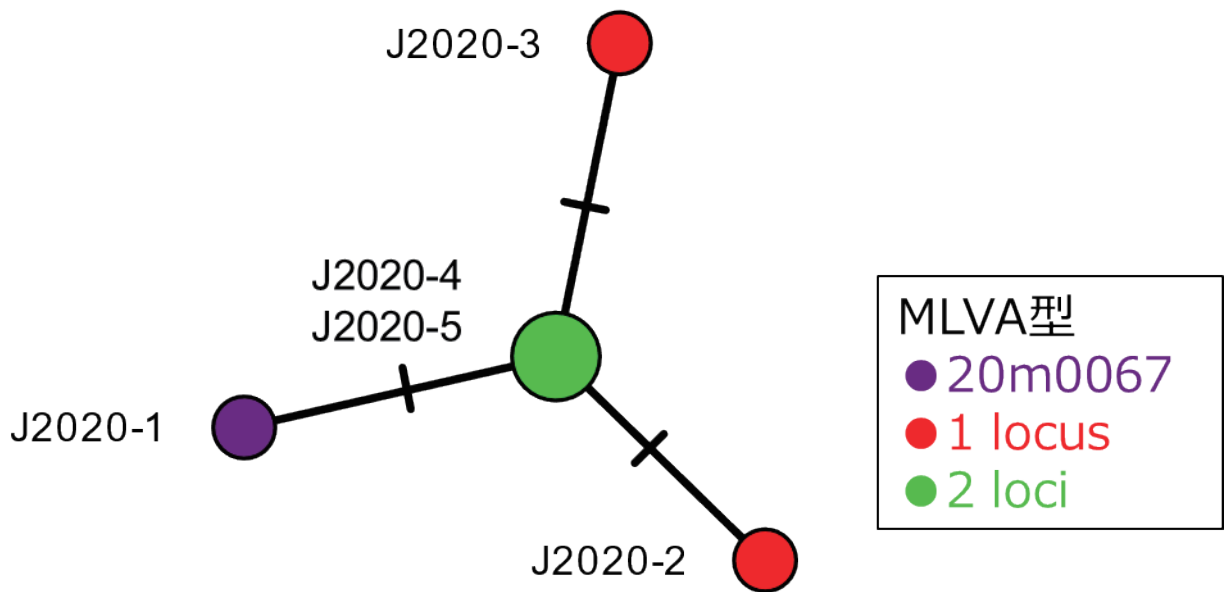


図 3. 事例 B における供試菌株の median joining tree

各ノード（丸印）は、各菌株を示し、大きさは株数を反映している。各ノードの結合線を直交する線は、1 本につき 1 か所の SNP を示す。色分けは、MLVA 型または 20m0041 と異なる MLVA 座位数を示す。

