

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
「感染症の病原体を保有していないことの確認方法について」の改定に資する研究
(20HA1009)
分担研究報告書

分担研究課題：長期排菌に関連した微生物学的特性を明らかにするための菌株解析

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）

全国の地方衛生研究所および保健所の細菌検査担当者

研究要旨

同一患者から長期間排菌される同一血清型の腸管出血性大腸菌（EHEC）について、その細菌学的特性を明らかにするため、疫学情報からこのような EHEC 株をいくつか抽出して全ゲノム配列解析を実施し、同一患者から分離される菌株間の相同性を解析した。その結果、一塩基置換（SNP）が検出されたゲノム上の位置は全部で 63 か所で、このうち 6 か所の SNP は大腸菌のストレス耐性をコントロールする *rpoS* 遺伝子上に存在していた。保有する病原性遺伝子の解析から、プラスミドや染色体上の病原性遺伝子群の脱落、志賀毒素遺伝子（*stx*）を運ぶファージ DNA の入れ替わりなどが観察されたことから、長期間の排菌事例においては PCR 等による病原性遺伝子の有無についても詳細に解析することが重要であると考えられた。

EHEC の陰性確認を実施している全国の地方衛生研究所または保健所の担当者へのアンケート調査を実施し、陰性確認手法について情報収集を行った。その結果、施設毎に様々な陰性確認法を実施していることが判明したが、多くの施設では PCR による *stx* の検出によって EHEC の陰性確認を実施していた。各施設で実施されている陰性化確認手法について標準化を目指した取り組みが必要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は、国内では毎年 3,000 名以上の感染者が報告される公衆衛生上重要な下痢原性細菌である。これまでの研究から、同一の EHEC 感染患者から、長期間かつ複数回にわたって同一血清型の EHEC が分離される事例が存在することが判明している。そこで本研究

では、同一患者から長期間排菌される同一血清型の EHEC 株について着目し、全ゲノム配列を用いた一塩基置換（SNP）解析を実施することで、長期間排菌される EHEC の細菌学的特徴について解明することを目的とした。加えて、EHEC の陰性確認を実施している全国の地方衛生研究所または保健所の細菌検査担当者へのアンケート調査を実施し、陰性確認手法の詳

細、特に PCR 等の遺伝子検査の実施段階について把握すると共に、陰性確認手法の標準化(プロトコール化)を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

1. 長期排菌分離菌株のゲノム解析

同一の患者から複数回 EHEC が分離された 35 事例 97 株 (表) について、ゲノム DNA 抽出を行い、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、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、株間の SNP 距離を算出した。また、SPAdes によるアセンブリを行い、保有遺伝子の検出を行った。

2. 陰性確認手法に関するアンケート調査

EHEC の検査を実施している全国の地方衛生研究所または保健所のうち、79 施設に対して、陰性確認の方法について電子メールによるアンケート調査を実施した。各施設への主な質問事項は以下の 4 つとした。

- 1) EHEC 分離途中段階での PCR 等遺伝子検査法による陰性確認法の是非について
- 2) 分離途中の段階で PCR を取り入れると仮定した場合に、患者便、増菌培養液、または選択分離培地上のコロニー使用のいずれが望ましいかについて
- 3) PCR に使用する鋳型 DNA 抽出法について
- 4) PCR の種類 (コンベンショナルまたはリアルタイム) またはその他の手法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification: LAMP 法など) の使用状況について

C. 研究結果

1. 長期排菌分離菌株のゲノム解析

解析を行った 35 事例 97 株では、最長で 360 日同一 EHEC の排菌が続いていた。本事例 (表の P26 の事例) を除くと、最長の排菌期間は 85 日であった。菌株間の SNP 数は大部分で 10 か所以内であり、各事例から分離された同一血清型の株は同一クローンであると考えられた。

SNP が検出されたゲノム上の位置は全体で 63 か所存在し、6 か所が *rpoS* 遺伝子上に存在していた。この 6 か所中 5 か所はナンセンス変異によって *rpoS* 遺伝子欠損型と考えられた。*rpoS* 以外で SNP が集中した領域は認められなかった。

保有する病原性遺伝子の解析では、染色体上のプロフェージ領域に存在する志賀毒素遺伝子 (*stx*)、染色体上の病原性遺伝子領域の一つに存在するインチミン遺伝子 (*eae*) およびプラスミド上に存在するヘモリシン遺伝子 (*ehxA*) の有無を検出した。この結果、2 事例および 6 事例で、それぞれ *eae* または *ehxA* の脱落が認められた。表の P21 では *stx2* サブタイプの多型 (*stx2a* から *stx2c* タイプへのスイッチ) が認められた。

2. 陰性確認手法に関するアンケート調査

依頼を行った 79 施設のうち 57 施設からアンケート調査への回答が得られた (回収率 72.2%)。回答のあった 57 施設中 55 の施設で PCR または LAMP 法による遺伝子検査で *stx* の有無について確認を実施していることが判明した。EHEC の分離途中段階での陰性確認について、増菌培養液からアルカリボイル法で抽出した

鋳型 DNA を用いて PCR または LAMP を実施し、この結果が陰性の場合に確認終了としているのが 4 施設（PCR による陰性確認が 3 施設、LAMP による確認が 1 施設）あった。増菌培養を用いた PCR に加え、選択分離培地上に出現したコロニーを掻き集めて抽出した鋳型 DNA を用いる（コロニスweep）PCR 法を併用することで陰性確認が実施可能と回答したのが計 35 施設存在し、前出の 4 施設と合わせて回答のあった施設の 66.1%を占めたが、選択分離培地上に出現した典型的なコロニーの確認および（または）生化学的性状の確認、スweep PCR による確認法を必須としている施設がほとんどであることが判明した。加えて、分離途中段階での PCR 法のみによる陰性確認をすべきでないという回答があったのが 4 施設あり、その理由としては、分離途中段階での PCR のみによる陰性確認には科学的データの蓄積が必要である、増菌液を用いた PCR で陰性の場合でも EHEC が分離される場合がある、などであった。

PCR に使用する DNA 抽出法についてはほとんどすべての施設でアルカリポイル法が適切であるとの回答があった。

PCR の種類に関してはリアルタイム PCR 法と回答したのが 13 施設、エンドポイント（コンベンショナル）PCR 法と回答したのが 18 施設、どちらでもよい（選択可能としてもらいたい）と回答したのが 7 施設、LAMP 法を選択肢に入れてもらいたいと回答したのが 2 施設あった。その他、国内で分離頻度の高い 3 つの O 群（O157, O26, O111）については、選択分離培地が各種開発されており、迅速な分

離同定に有効であることから、PCR 法に加えてこのような選択分離培地の活用も併用する必要があるとの意見もあった。

D. 考察

長期排菌分離菌株のゲノム解析では、供試菌株では、長期排菌においても特徴的な変化は見られなかった。ただし、RpoS が機能欠損となるような SNP が集中して蓄積する傾向があり、環境ストレスへの抵抗性などの表現型の変化が起こっている可能性がある。

保有遺伝子は、*ehxA* で高頻度に脱落することが示された。*ehxA* はプラスミド上に存在するため、プラスミドの脱落によるものと考えられる。一方、*eae* が存在する locus of enterocyte effacement 領域は可動性因子とはされていないが、脱落する可能性が示唆された。*stx* については、プロフェージ領域が脱落することが知られているが、本解析では分離日が遅い方の株で以前の株からは検出されない *stx2c* が検出された。これは、保菌時に *stx2c* を獲得したか、*stx2a* 単独保有および *stx2a*、*2c* 同時保有株を同時に保菌していたが前者のみ検出されたか、が考えられるが、本事例では特定はされなかった。PCR 等の核酸検出法で保菌の確認をする場合には、*stx* 型が変化する可能性および染色体上の遺伝子も脱落する可能性を考慮する必要があることが明らかとなった。

EHEC の陰性確認を実施している地方衛生研究所または保健所の細菌検査担当者に向けたアンケート調査から、ほとんどの施設において、PCR による *stx* の検出によって EHEC の陰性確認を実施してい

ることが明らかとなった。従って、PCR をどの段階で実施するか議論が必要であるが、施設によって多様な検査法を実施していることが判明した。一方、陰性確認のために各検査施設に搬入される便検体の性状（固形、泥状、血性便、粘液性）・形態（排出便、直腸便、便スワブ）や採取後の日数等も多様なものがあるため、一様に陰性確認法についてプロトコール化することは非常に困難である、との意見もあったが、現在のところ、EHEC の分離確認の方法として、PCR 法による陰性確認とは記載がないことから、可能な限り具体的な基準となる資料をまとめて欲しいとの要望も多数あったことから、今後陰性確認の標準化に向けた取り組みを加速していく必要があると考えられた。

E. 結論

1) 同一患者由来株の解析から、長期保有株の一部では大腸菌のストレス耐性をコントロールする遺伝子 *rpoS* に変異が入ることが明らかとなった。遺伝子の脱落・獲得の可能性があるため、PCR で病原性遺伝子を検出する際には注意が必要なことが明らかとなった。

2) EHEC 陰性確認法

アンケート調査の集計から、PCR による結果はあくまで陰性確認に限定し、陽性の場合には EHEC の分離同定を実施する必要がある。増菌培養後のみならず、選択分離培地上でのコロニースイーブ PCR 法の併用を条件とした PCR による陰性確認法について改訂案をまとめる必要がある。

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

表. 同一患者から分離された EHEC のゲノム解析結果

患者ID	Phylogenetic group	血清型	株数	分離日の間隔	SNP数	病原性因子の変化
P01	B1	O146:H21	2	85	4	
P02	B1	O26:H11	3	23 - 81	0 - 1	<i>ehxA</i> (-)
P03	B1	O26:H11	2	43	31	
P04	E	O157:H7	2	17	0	<i>ehxA</i> (-)
P05	B1	O26:H11	2	35	3	
P06	B1	O26:H11	2	43	2	
P07	C	OSB9:H11	2	35	1	
P08	B1	O26:H11	2	39	1	
P09	B1	O26:H11	2	20	3	<i>ehxA</i> (-)
P10	E	O145:H28	2	13	0	
P11	E	O145:H28	2	9	0	
P12	E	O145:H28	2	7	1	
P13	E	O145:H28	2	11	0	<i>ehxA</i> (-)
P14	E	O145:H28	2	49	0	
P15	E	O145:H28	2	17	1	
P16	E	O145:H28	2	13	2	
P17	B1	O26:H11	2	13	0	
P18	B1	O26:H11	2	11	0	
P20	E	O157:H7	4	2 - 14	0	<i>ehxA</i> (-)
P21	E	O157:H7	5	0 - 8	0 - 2	<i>stx2a</i> → <i>stx2a</i> , <i>2c</i>
P22	B1	O111:H8	4	0 - 13	1 - 2	
P23	B1	O146:H21	7	3 - 32	0 - 1	
P24	E	O157:H7	3	2 - 9	1 - 2	<i>eae</i> (-)
P25	E	O157:H7	3	2 - 6	0	
P26	A	O80:H2	12	0 - 360	1 - 16	<i>eae</i> , <i>ehxA</i> (-)
P27	E	O157:H7	2	6	0	
P29	B1	O111:H8	2	3	0	
P30	E	O157:H7	2	22	1	
P31	E	O157:H7	2	7	0	
P32	E	O145:H28	2	4	1	
P33	B1	O174:H21	3	11 - 69	0 - 1	
P34	B1	O91:H14	2	83	0	
P35	B1	O26:H11	2	12	0	
P36	E	O157:H7	3	0 - 15	0 - 2	
P37	B1	O111:H8	2	28	1	