

厚生労働省科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
「ロングリードシーケンサーによる集団感染調査手法の確立」

(23KA3005)

研究総括報告書

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

Oxford Nanopore 社のロングリードシーケンサーを用いた集団感染調査手法の確立のために、腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli* : EHEC) を材料とし、全ゲノム配列 (whole-genome sequence, WGS) の解読を行った。過去 2 年間に国内で報告された集団感染事例を対象に、網羅的な WGS 解読を行った。各種解析条件の検討の結果、広く使われているカラム抽出キットおよびライブラリー調整キットによって、十分なデータ量が取得可能であることが明らかとなった。

研究分担者

李 謙一 (国立感染症研究所 細菌第一部)

A. 研究目的

病原体のサーベイランスにおける分子型別において、近年全ゲノム配列 (whole-genome sequence : WGS) 解析法が主流になりつつある。アメリカ合衆国 CDC においても腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) 等の食中毒菌のサーベイランスに用いる分子型別手法は、2019 年からパルスフィールドゲル電気泳動法から WGS 解析に移行している。日本においては、COVID-19 によるパンデミックによる影響で全国の地方自治体に次世代シーケンサー (next generation sequencer: NGS) が配備されたものの、病原細菌における活用例は未だ少ない。その理由としては、WGS 解読後の情報解析が複雑で、難易度が高

いことが挙げられる。

WGS の情報解析については、イルミナをはじめとするショートリード型 NGS に対応したプログラムは多数利用可能である。しかし、Oxford Nanopore 社のロングリード型 NGS から得られるデータを用いたプログラムは少ない。また、集団感染調査の際には、供試菌株が同一株であるかの判断を、コアゲノム単一塩基多型 (core genome single nucleotide polymorphism, cgSNP) の数をもとに行うのが一般的である。ショートリード型データを用いた際の、同一由来と判断するための基準は多数の菌種で報告されているが、ロングリード型データを用いても同様の判断ができるか、体系的に検討した報告は少ない。

そこで本研究では、EHEC を材料に、疫学関連が既知の株について体系的な WGS 解読後、cgSNP 解析を行うことで、ロングリード型 NGS を用いた集団感染調査の判

断基準の検討を行う。また、解析プログラムを構築し、地方自治体等への配布を目指す。今年度は、解析株の決定、約半数の WGS 解読、およびロングリード解析のための各種条件検討を行った。

B. 研究方法

分担研究報告書に記載。

C. 研究結果

2021 年および 2022 年に分離された EHEC のうち、5 株以上が分離された集団感染事例のうち、20 事例、102 株を解析対象とした。本年度はこのうち、約半数の株（48 株）についてショートリードおよびロングリードによる WGS 解読を行った。複数の DNA 抽出法およびライブラリー調整キットを用いた検討の結果、自動 DNA 抽出装置および Rapid Barcoding Kit を用いた際に最も長いリード長、自動 DNA 抽出装置および Native Barcoding Kit を用いた際に最も多いデータ量が得られた。カラム抽出キットおよび Rapid Barcoding Kit を用いた際には、両者の中間的な値が得られた。

D. 考察

本研究で WGS 解読を行った EHEC は、国内の主要血清群を網羅しており、同菌における普遍的な知見が得られると考えられる。

解析条件については、費用、労力および時間等を考慮すると、カラム抽出および Rapid Barcoding Kit を用いた手法が最も広く用いられる可能性がある。同法では 1 日でシークエンス開始が可能であり、20 株

程度の大腸菌のデータが得られることが示された。

E. 結論

国内で分離された EHEC 集団感染事例を網羅する菌株セットを決定し、半数の菌株のショートリードおよびロングリード解読を行った。一般的な DNA 抽出およびライブラリー調整の条件で、約 20 株の EHEC が一度に解析可能であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Y. Matsumoto, K. Lee, R. Akasaka, H. Honjo, M. Koizumi, T. Sato, A. Kubomura, N. Ishijima, Y. Akeda, M. Ohnishi, S. Iyoda. Increased resistance against tellurite is conferred by a mutation in the promoter region of uncommon tellurite resistance gene, *tehB*, in the *ter*-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol. In press.

2) 学会発表等

1. 李 謙一. 病原細菌における全ゲノム配列解析の基礎. 衛生微生物技術協議会第 43 回研究会. 岐阜, 2023.

2. 李 謙一. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) における WGS 解析. 令和 5 年度北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者研修会. 岩手, 2024.

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