

## 10. 日本各地域における腸管出血性大腸菌 O157 の 高病原性菌株の分布状況の把握

○平井 晋一郎（千葉県衛生研究所 細菌研究室 研究員）

### 【目的】

腸管出血性大腸菌 O157 (O157) は、ゲノム上の一塩基多型 (SNP) に基づき、進化系統学的な集団 (PG) である clade に分類される (図 1)<sup>1)</sup>。clade 8 に分類される O157 菌株は、他の PG の菌株より、感染者の重症化率が高いことが知られていた<sup>1)</sup>。近年、主要な病原因子である Shiga toxin 2 (Stx2) 転換ファージの型別により、clade 8 は 2 つの亜群 (subclade 8a 及び 8b) に分類され、その一方の subclade 8a の O157 菌株が Stx2 高産生性であると報告された<sup>2)</sup>。従って、subclade 8a が高病原性の PG だと思われる。

clade 8 の O157 菌株が優性に分布しているアルゼンチンでは O157 感染者の重症化率が高いことから<sup>3)</sup>、地域に高病原性 PG の菌株が、どのくらい分布しているかを把握しておくことは、公衆衛生対策上、重要である<sup>4)</sup>。しかし、O157 菌株が subclade 8a だと判定するには、①ゲノムの複数領域における SNP 検出により clade 8 に分類した後、②Stx2 ファージの型別を行う必要があり、労力と時間がかかる。

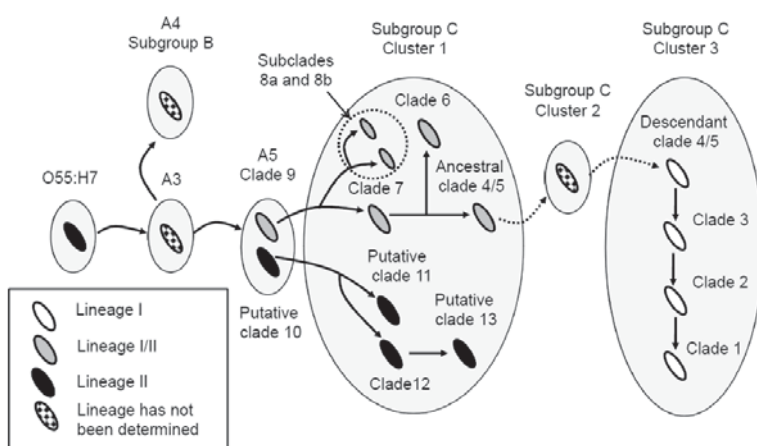


図 1 O157 における進化系統学的分類

本研究では、簡易・迅速性に優れた High resolution melting analysis (HRM 法) を用いて、subclade 8a 菌株の検出法の開発を目指した。また、開発した HRM 法を用いて、今後、全国各地における subclade 8a 菌株の分布状況の把握を計画しており、その計画の遂行に必要な準備について考察した。

### 【方法】

#### (1) O157 菌株を subclade 8a 及び 8b に分類

本研究では、1996～2014 年に千葉県内で感染者から分離された O157 菌株の内、疫学的な関連性がない O157 菌株を収集した。これまでに、我々は O157 の clade 8 菌株に特異的な 1 つの SNP を判定する HRM 法を開発している<sup>5)</sup>。この方法を用いて、収集した O157 菌株の中から clade 8 の菌株を選び出した。選び出された clade 8 菌株について、Stx2 ファージの型別法<sup>2)</sup>を行い、subclade 8a 及び 8b に分類した。

## (2) subclade 8a 菌株に特異的な SNP の選定

Griffing らは<sup>6)</sup>、O157 菌株のゲノム上の 32 領域の SNP を用いた分子疫学的解析法を開発している。この解析法を用いれば、clade 8 の菌株を 2 つのグループに分けることができる。この 2 つのグループは、subclade 8a 及び 8b に相当すると思われる。そこで、本研究では、この 32 領域の SNP の中から subclade 8a 菌株に特異的な SNP 領域を選定した。

### ① subclade 8a 菌株に特異的な SNP の「候補」を選定

(1) で subclade 8a 及び 8b に分類された O157 菌株の中から、遺伝的に様々な特徴を持つ菌株を選ぶために、ゲノムにおける insertion sequence (IS) 629 の分布状況を、既報に従い調査した<sup>7)</sup>。IS629 の分布状況が異なる subclade 8a 及び 8b 菌株を幾つか選び出し、選んだ菌株を次世代シーケンサーにより全ゲノム解析した。全ゲノム解析の結果から、Griffing ら<sup>6)</sup>の 32 領域の SNP の中から subclade 8a 菌株に特異的な SNP を選定し、選定した SNP を「候補 SNP」とした。

### ② HRM 法の「標的」とする SNP の選定

(1) で subclade 8a 及び 8b に分類された全ての菌株について、amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR 法) を用いて、「候補 SNP」を調査した。ARMS-PCR 法の反応条件には、touchdown PCR 法を用いた。「候補 SNP」の中から、subclade 8a 菌株に特に特異性が高い SNP (「標的 SNP」) を選び、選んだ SNP を HRM 法の標的とした。

## (3) subclade 8a 菌株を簡易・迅速に検出する HRM 法の開発

「標的 SNP」について HRM 法を開発した。HRM 法で使用する試薬及び反応条件については、既報に従った<sup>5)</sup>。開発した HRM 法で正しく SNP を判定できるかを評価するために、(1) で subclade 8a 及び 8b に分類された全ての菌株を HRM 法で解析した。

## 【結果】

### (1) O157 菌株を subclade 8a 及び 8b に分類

1996～2014 年に千葉県内で感染者から分離された全ての O157 菌株の内、疫学的な関連性がない O157 は 1121 菌株であった。この内、clade 8 は 115 菌株であり、subclade 8a 及び 8b は、それぞれ 67 菌株及び 48 菌株であった。

### (2) subclade 8a 菌株に特異的な SNP の選定

#### ① subclade 8a 菌株に特異的な「候補 SNP」の選定

遺伝的に様々な特徴を持つ菌株として、IS629 の分布状況が異なる各 3 菌株の subclade 8a 及び 8b を選んだ。これら菌株について、全ゲノム解析を行ったところ、Griffing ら<sup>6)</sup>の 32 領域の内の 6 領域 (ECs5052、ECs2440、ECs25386、ECs3540、ECs0580 及び ECs2006) の

SNP が、subclade 8a 菌株に特異的であった（表 1）。この 6 つの SNP を「候補 SNP」とした。

## ② HRM 法の「標的 SNP」の選定

(1) で subclade 8a 及び 8b に分類された全ての菌株について、ARMS-PCR 法を用いて、6 領域の「候補 SNP」を調査したところ、3 領域（ECs2440、ECs2538 及び ECs2006）の SNP が subclade 8a 菌株に特異性が特に高かった（表 2）。この 3 つの SNP を「標的 SNP」とした。

**表 1 「候補 SNP」の遺伝子領域と塩基**

Locus	SNP position	SNP for subclade	
		8a	8b
ECs5052	5141169	A	G
ECs2440	2416801	C	T
ECs2538	2512684	T	C
ECs3540	3529080	C	T
ECs0580	639975	C	T
ECs2006	1984857	G	A

**表 2 subclade 8a 及び 8b 菌株における「候補 SNP」の調査**

(a) Subclade 8a (67 strains)

Locus	ECs5052	ECs2440	ECs2538	ECs3540	ECs0580	ECs2006
Typical SNP	A	C	T	C	C	G
Ratio of strains with typical SNP (%)	79.1	100.0	97.0	80.6	100.0	97.0

(b) Subclade 8b (48 strains)

Locus	ECs5052	ECs2440	ECs2538	ECs3540	ECs0580	ECs2006
Typical SNP	G	T	C	T	T	A
Ratio of strains with typical SNP (%)	97.9	97.9	100.0	100.0	89.6	100.0

## (3) subclade 8a 菌株を簡易・迅速に検出する HRM 法の開発

3 つの「標的 SNP」について、HRM 法を開発した（表 3）。(1) で subclade 8a 及び 8b に分類された全ての菌株について、開発した HRM 法を用いて SNP の判定を行った。subclade 8a の 2 菌株（菌株番号が CEC10073 及び CEC09002）と subclade 8b の 1 菌株（CEC96013）において、HRM 法と ARMS-PCR 法の結果が不一致だった（表 4）。CEC10073 菌株の ECs2538 の SNP については、ARMS-PCR 法では T と判定されたが、HRM 法では C と判定された。CEC09002 菌株の ECs2538 と CEC96013 菌株の ECs2006 の SNP については、HRM 法では遺伝子増幅が確認されず、SNP の判定ができなかった。また、CEC96013 菌株の ECs2440 の SNP について ARMS-PCR 法を行うと、C でも T のどちらでもない融解曲線が得られ、SNP

の判定ができなかった。しかし、これら以外の SNP については、HRM 法と ARMS-PCR 法の結果が一致していた。ECs2440、ECs2538 及び ECs2006 の SNP についての HRM 法と ARMS-PCR 法の結果の一致率は、それぞれ 99.1 % (114 菌株/ 115 菌株)、98.2 % (113 菌株/ 115 菌株) 及び 99.1 % (114 菌株/ 115 菌株) と極めて高かった。

表 3 「標的 SNP」を検出する HRM 法のプライマー

Locus	SNP position	SNP for subclade		Forward primer		Reverse primer	
		8a	8b	Designation	Sequence	Designation	Sequence
ECs2440	2416801	G	C	HRM2440-F	ATGCACCAACGGACTAAGGTTT	HRM2440-F	CCATTAAAGGCTTCGAGATTGC
ECs2538	2512684	C	A	HRM2538-F	CCGTTGTCTTTGATGGCGTAA	HRM2538-R	CGCCGGCCTCTTTAGTGAT
ECs2006	1984857	T	C	HRM2006-F	CCGTTGTCTTTGATGGCGTAA	HRM2006-R	CGCCGGCCTCTTTAGTGAT

表 4 HRM 法と ARMS-PCR 法での SNP 判定の不一致

Strain	Subclade	SNP determined by HRM/ ARMS-PCR		
		ECs2440	ECs2538	ECs2006
CEC10073	8a	C/ C	C/ T	G/ G
CEC09002	8a	C/ C	NA <sup>a)</sup> / T	G/ G
CEC96013	8b	ND <sup>b)</sup> / T	C/ C	NA/ G

a) 遺伝子増幅が確認されなかった。

b) SNP 判定が不能。

#### 【考察】

HRM 法は、PCR 法の作業だけで実施できる簡易な方法であり、解析に要する時間も数時間と迅速性に優れた SNP 判定法である。本研究では、subclade 8a 菌株に特異的性が高い 3 領域 (ECs2440、ECs2538 及び ECs2006) の SNP を対象とした HRM 法を開発した。この HRM 法を用いれば、clade 8 の O157 菌株を簡易・迅速に subclade 8a 及び 8b に分類できる。これまでに、我々は、clade 分類されていない O157 菌株の中から clade 8 の菌株を検出する HRM 法を開発している<sup>5)</sup>。この方法と本研究の方法を組み合わせれば、高病原性 PG である subclade 8a の菌株を簡易・迅速に検出することが可能になる。

本研究で開発した HRM 法による SNP 判定の正確性は非常に高かった。我々は、ARMS-PCR 法による SNP 判定の正確性は高いことを報告している<sup>8)</sup>。「標的 SNP」について、ARMS-PCR 法と本研究で開発した HRM 法で SNP 判定した結果を比較すると、ほぼ 100% 一致した。しかし、幾つかの SNP において、HRM 法と ARMS-PCR 法の結果が不一致だった (表 4)。

HRM 法と ARMS 法の結果の不一致の原因として、SNP の周辺の遺伝子領域の変異が原因だと思われる。HRM 法では、SNP を含む遺伝子領域を増幅させた後、融解曲線を測定して SNP を判定する。融解曲線は、遺伝子増幅産物の塩基の組成で決まるため、増幅遺伝子内に「標的 SNP」以外の遺伝子変異があると、誤って SNP が判定 (CEC10073 菌株の ECs2538) されたり、判定不能 (CEC96013 菌株の ECs2440) になる。特に、HRM 法でプライマーがアニーリングする遺伝子領域が変異していると、遺伝子が増幅されないことが予想される

(CEC09002 菌株の ECs2538 と CEC96013 菌株の ECs2006)。この問題を解決するには、HRM 法で遺伝子増幅する領域を短くすることや「標的 SNP」の変更が有効だと思われる。

結論として、本研究では、HRM 法を用いた subclade 8a 菌株の簡易・迅速検出法の開発に成功した。各自治体の地方衛生研究所では、その地域で感染者から分離された全ての O157 菌株を保管している。本研究で開発した HRM 法を用いて、これらの菌株を解析すれば、全国各地における subclade 8a 菌株の分布状況を解明できるだろう。今後、地方衛生研究所間の研修会等を利用し、本研究で開発した HRM 法を紹介し、各地域の地方衛生研究所に本方法の導入を図る予定である。

#### 【謝辞】

本研究の一部は、平成 26 年度東京農工大学生物資源ゲノム解析センター「生物資源ゲノム解析拠点」共同研究により実施された。

#### 【参考文献】

- 1) Manning, S. D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 4868-4873 (2008)
- 2) Mellor, G. E. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 78: 4724-4731 (2012)
- 3) Ogura, Y *et al.*, Sci. Rep. 5:16663 (2015)
- 4) Hirai, S. *et al.* J. Appl. Microbiol. 117: 1191-1197 (2014)
- 5) Etoh, Y. *et al.* Infect. Genet. Evol. 24: 140-145 (2014)
- 6) Griffing, S. M. *et al.*, PLoS One. 10. e0131967 (2015)
- 7) Hirai, S. *et al.* Lett. Appl. Microbiol. 61: 267-273 (2015)
- 8) Hirai, S. *et al.* Infect. Genet. Evol. 18: 94-99 (2013)

#### 【研究発表業績】

- 1) 平井 晋一郎, 横山 栄二. 腸管出血性大腸菌 O157 の subclade 8a 及び 8b における Stx2 産生の誘導性の比較. 第 20 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016)

#### 【経費使途明細】

使途	数量	金額 (円)
MeltDoctor HRM Master Mix	4	159,408
ペロトックス-F 「生研」	1	40,176
塩化ナトリウム	1	760
ダイヤモンドグリッププラス M	7	6,653
シリコーンゴム栓	5	135
投稿論文の英文校閲	1	90,870
銀行口座振り込み手数料	5	1,998
合計		300,000