

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82507

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460540

研究課題名(和文)病原細菌の全ゲノム解析に基づくゲノム疫学の構築と集団感染症対策への応用の基盤研究

研究課題名(英文)basic research of the application of genome epidemiology for the control of mass outbreaks caused by pathogenic bacteria by whole genome sequencing.

研究代表者

横山 栄二(Yokoyama, Eiji)

千葉県衛生研究所・細菌研究室・室長

研究者番号：40370895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌による集団感染の被害拡大を防止するためには、その発生を早期に把握する必要があるが、同時期に発生している患者が全て集団感染によるとは限らないため、複数の患者から分離された病原細菌の同一性をより正確に判定する必要がある。病原細菌の全ゲノムを解析してその同一性を調査するゲノム疫学により腸管出血性大腸菌0157を調査したところ、従来採用いられていた方法より効果的であることが判明した。また、全ゲノム解析を行う際に留意すべき事項についての情報が得られた。

研究成果の概要(英文)：The onset of mass outbreaks by pathogenic bacteria is needed to detect in their early stage for prevention of expansion. However, all of the patients observed in a certain period are not always derived from the same outbreak; therefore, it is necessary to investigate the relatedness of the organism isolated from several patients. This research conducted genome epidemiology, which can reveal the identity of several strains of a pathogenic bacterium by whole genome sequencing, for differentiating outbreak related enterohemorrhagic Escherichia coli 0157 strains. The results of this study demonstrated that this approach is superior to previous methods. Additionally, some points to be careful to carry out genome epidemiology were elucidated.

研究分野：細菌感染症、分子系統学、分子疫学

キーワード：病原細菌 全ゲノム解析 ゲノム疫学 分子疫学 腸管出血性大腸菌0157

### 1. 研究開始当初の背景

病原細菌による集団感染の被害拡大を防止するためには、その発生を早期に把握する必要があるが、同時期に発生している散発事例の紛れ込みによって集団感染の決定が困難になることが多い。その解決策として有効な方法は、複数の患者から分離された病原細菌の同一性をより正確に判定することである。

申請者はこれまでに、病原細菌による集団感染の早期把握のためにパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)を用いた病原細菌の同一性確認法を開発し、千葉県感染症対策行政において集団感染の被害拡大防止に貢献して来た。その後、新たな同一性確認法として variable number of tandem repeat 型別(VNTR)を開発し、導入してきた。

PFGE や VNTR の限度として、病原細菌のゲノムのごく一部に発生する変異の有無を調べて同一性を確認する方法であるため、同一の集団感染由来株でなくとも PFGE や VNTR データが全く同一になることがあり得る点が挙げられる。その際には感染者からの聞き取りによる古典的疫学情報を加味しているが、潜伏期間が長い感染症では十分な疫学情報が入手出来ず、集団感染の決定に苦慮することが多い。

複数の感染者から分離された病原細菌の全ゲノムを解析してその同一性を調査するゲノム疫学により従前の限界を解決可能であるが、これまで全ゲノム解析には膨大な費用を要した。しかし近年の次世代シーケンサー(NGS)の発達・普及により費用は劇的に減少しており、細菌感染症対策において全ゲノム解析データの有効活用が可能な状況になって来ている。

### 2. 研究の目的

本研究では、NGS を用いて過去の集団感染および散発事例から分離された病原細菌の全ゲノム解析を行うことで、集団感染を特定可能なゲノム変異を特定し、全ゲノム解析データを集団感染の被害拡大防止に利用するゲノム疫学の構築のための基盤的データを収集することを目的とした。

### 3. 研究の方法

全ゲノム解析データ(WGS)の比較により集団感染を決定するゲノム疫学の構築のため、千葉県において全感染者から分離・収集されている腸管出血性大腸菌 0157(0157)を用いて、以下の事項を調査して集団感染を決定可能なゲノム変異を特定する。

集団感染及び散発事例由来の 0157 100 株を NGS により解析する。

得られた WGS を元に、同一の集団感染由来株間に存在する変異の発生状況を調査する。その変異数をしきい値として、異なる集団感染及び散発事例由来株間を区別可能なゲノム変異を調査する。

### 4. 研究成果

#### 1) NGS 解析の実施

NGS 解析は、平成 26 年度及び 27 年度東京農業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」共同研究に応募して採択されたことにより、同センターにおいて計 271 株を解析した。

解析データについては、DNA Data Bank of Japan の Short Read Archive に deposit した。(Accession No. DRA003729、DRA004581、DRA005274)

#### 2) 人工培地での培養が及ぼす影響の調査

0157 菌株は民間検査機関等で分離同定されることが多く、どのような培地で何回継代されているかは様々であるが、その影響が WGS による変異検出に及ぼす影響についてはほとんど知られていなかったため、ゲノム疫学について調査する前に、0157 菌株を培地で継代培養した場合に生じる変異について調査した。

その結果、同一菌株から継代した菌株において一塩基多型(SNPs)が検出された。その数は菌株によって 10 倍程度の差があり、backbone、O-island、mobile element のいずれの領域にも存在した(図 1)。

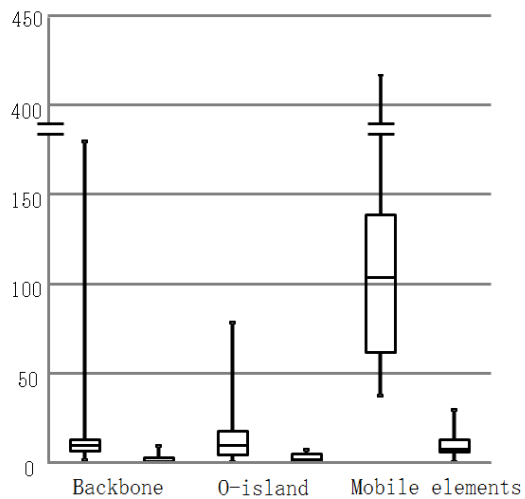


図 1 領域別 SNPs 発生数

また、その発生頻度は同一菌株内においても領域ごとに異なることが判明した。

この研究成果については論文で公表した(Curr. Microbiol. 74:425-430)。

#### 3) 分子疫学的解析の検討

0157 を分離年ごとに PFGE 解析して形成されたクラスターから、0157 の進化系統群による bias を避けるために日本で分離される主な lineage と clade が含まれるように、17 クラスターを選択した。それらには、集団感染 11 事例、家族内感染 16 事例が含まれていた。それら菌株の WGS データから、前記 2) に記載したような人工培地での培養で SNPs を生じる gene を除去して、培養による影響を排除

した。

供試菌株のうち、疫学情報により単一暴露の outbreak であることが明らかな 9 事例由来株間の SNPs を検出した(図 2)。

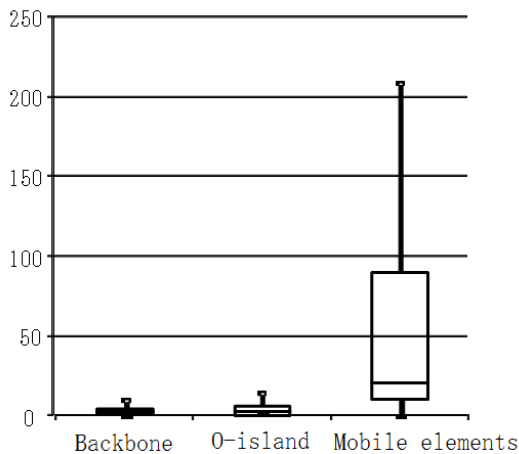


図 2 単一暴露 outbreak 由来株間の SNPs 数

そのデータを minimum spanning tree(MST)で解析し、それらの単一暴露の outbreak 内における最大 pair-wise distance をしきい値として MST で outbreak の特定を行った。その結果、backbone に存在する SNPs の Hunter-Gaston Discriminatory Power Index(HGDI)は 0.9293 であり、PFGE の HGDI である 0.8754 より高かった。また、PFGE のクラスターの一部が細分化された(図 3)。

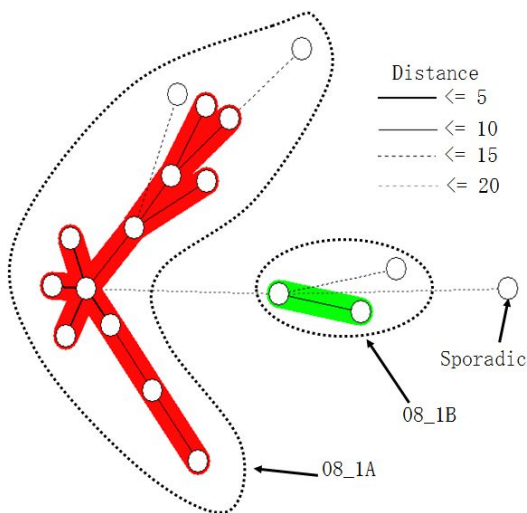


図 3 細分化されたクラスター

W 試験により recombination の発生の有無を調査したところ、O-island に存在する SNPs に有意な recombination の発生を認めたことから、O-island に存在する SNPs は分子疫学的解析に適してないことが示唆された。また、mobile element に存在する SNPs は MST で巨大なクラスターが形成された。そのクラスターに含まれていたのは進化系統群のうち lineage I であったことから、mobile element に存在する SNPs は lineage I の 0157

菌株の型別能力が低いことが判明した。lineage I はわが国に多く存在する進化系統群であることから、mobile element に存在する SNPs はわが国で分子疫学的解析には使用出来ないと考えられた。

この研究成果については現在論文を投稿中である。

#### 4)まとめ

本研究により、NGS を利用して SNPs を検出することで、0157 は従来用いられてきた方法より詳細な型別が可能であった。その一方で、SNPs を調査する際には、人工培地における培養の影響を排除する必要があったことから、今後 NGS を分子疫学的解析に使用する際には留意が必要であることが判明した。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1) Yokoyama E, Hirai S, Ishige T, Murakami S. Single-nucleotide polymorphisms in the whole-genome sequence data of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7/H- strains by cultivation. *Curr. Microbiol.* 査読有り 74 (2017) 425-430

[学会発表](計 9 件)

1) 横山栄二, 平井晋一郎, 石毛太一郎, 村上覚史 (2016) 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を用いた腸管出血性大腸菌 0157 の分子疫学的解析, 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2016 年 11 月 11 日, 富山県県民共生センター(富山市)

2) 横山栄二, 平井晋一郎, 石毛太一郎, 村上覚史 (2016) 次世代シーケンサーによる腸管出血性大腸菌 0157 の分子疫学的解析に及ぼす継代培養の影響, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 9 月 7 日, 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

3) 横山栄二, 平井晋一郎, 村上覚史 (2016) 次世代シーケンサーによる腸管出血性大腸菌 0157 の特定クローンの同定, 第 90 回日本感染症学会学術講演会, 2016 年 4 月 15 日, 仙台国際センター(仙台市)

4) 横山栄二, 平井晋一郎, 石毛太一郎, 村上覚史 (2015) 全ゲノム解析データに基づく腸管出血性大腸菌 0157 の進化系統グループの再定義, 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015 年 9 月 8 日, 北里大学獣医学部(青森県十和田市)

5) 横山栄二, 平井晋一郎, 石毛太一郎, 村上覚史 (2015) 全ゲノム解析データに基づく腸管出血性大腸菌 0157 の進化系統グ

ループの再定義，第 19 回腸管出血性大腸菌感染症研究会，2015 年 7 月 10 日，国立医薬品食品衛生研究所(東京都世田谷区)

6) 横山栄二，平井晋一郎，石毛太一郎，村上覚史 (2015) 次世代シーケンサーを用いた腸管出血性大腸菌 0157 の変異解析と分子疫学的解析への応用，第 27 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会，2015 年 2 月 10 日，川崎市産業振興会館(川崎市)

7) 横山栄二、平井晋一郎、村上覚史 (2015) 次世代シーケンサーによる出血性大腸菌 0157 の分子疫学的解析，第 89 回日本感染症学会学術講演会，2015 年 4 月 17 日，国立京都国際会館(京都市)

8) 横山栄二、平井晋一郎、村上覚史 (2015) わが国で分離頻度の高い腸管出血性大腸菌 0157 clade7 の系統学的解析，第 88 回日本細菌学会総会，2015 年 3 月 26-28 日，長良川国際会議場(岐阜市)

9) 横山栄二、平井晋一郎、石毛太一郎、村上覚史 (2014) 次世代シーケンサーによる腸管出血性大腸菌 0157 の進化系統グループの系統解析，第 157 回日本獣医学会学術集会，2014 年 9 月 9 日，北海道大学(札幌市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 栄二 (YOKOYAMA EIJI)  
千葉県衛生研究所細菌研究室長  
研究者番号：40370895

### (2) 研究分担者

村上 覚史 (MURAKAMI SATOSHI)  
東京農業大学畜産学科家畜衛生学研究室  
教授  
研究者番号：40385498