

表6 ストレス抵抗性試験のクラスター分析で分かれたクラスターの詳細

ストレス クラスター	臨床由来株の割合 (臨床由来株/総株数)	酸 (SEM)	低浸透圧 (SEM)	凍結 (SEM)	熱 (SEM)
1	41% (15/37)	0.87 (0.03)	0.83 (0.03)	0.69 (0.06)	0.68 (0.06)
2	43% (19/44)	0.86 (0.03)	0.17 (0.03)	0.54 (0.05)	0.96 (0.02)
3	38% (6/16)	0.90 (0.04)	0.021 (0.02)	0.35 (0.07)	0.19 (0.05)
4	14% (5/36)	0.088 (0.02)	0.25 (0.05)	0.47 (0.06)	0.28 (0.04)
5	41% (13/32)	0.16 (0.04)	0.80 (0.03)	0.80 (0.04)	0.94 (0.02)
6	11% (4/35)	0.067 (0.03)	0.13 (0.03)	0.59 (0.06)	0.98 (0.01)

表7 ストレス耐性関連遺伝子の保有割合

機関 番号	採取場所・ 産地	検体種・分離状況	分離時期	血清型	酸	低浸 透圧	凍結	熱	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>oppA</i>	<i>oppB</i>	<i>escC</i>	<i>mglc</i>
3	新潟	海水	2010.6		0.0	0.0	0.3	1.0	-	-	+	+	-	+
9	新潟	まな板	1997	O3:K6	0.7	0.3	1.0	1.0	-	-	±	-	-	-
15	秋田	ボイルホタテ	1997	O3:K6	0.7	0.7	1.0	0.0	-	-	+	-	+	-
21	新潟	食中毒患者	1998		1.0	0.7	0.7	0.0	+	-	+	+	+	-
22	新潟	食中毒患者	1998	O4:K68	1.0	0.0	0.7	0.0	+	-	±	-	+	-
31	静岡	ムラサキイガイ	2010.7		0.0	0.3	0.7	1.0	-	-	-	-	-	-
32	静岡	海水	2010.7		0.0	0.2	1.0	1.0	-	-	-	+	-	-
37	静岡	海水	2010.7		1.0	0.0	0.3	1.0	-	-	-	-	-	-
38	静岡	海水	2010.7		0.0	1.0	0.7	1.0	-	-	-	-	-	-
42	北海道	巻貝	2010.8		0.3	0.0	0.7	0.7	-	-	+	+	+	-
44	北海道	イワガキ	2010.8		0.0	0.0	0.7	1.0	-	-	+	+	-	-
51	神奈川	ムラサキイガイ	2010.8		0.0	0.0	0.7	0.8	-	-	-	+	-	-
52	神奈川	巻貝	2010.8		0.3	0.0	0.3	0.3	-	-	+	+	-	-
53	神奈川	巻貝	2010.8		1.0	0.0	1.0	0.7	-	-	+	+	-	-
61	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		0.0	0.0	0.7	1.0	-	-	+	+	-	-
103	タイ	ザルガイ	2010.8		0.0	0.7	1.0	0.8	-	-	+	-	-	-
104	タイ	ハマグリ	2010.8		0.0	0.7	1.0	1.0	-	-	-	-	+	-
109	タイ	ザルガイ	2010.8		0.0	0.0	0.8	1.0	-	-	±	-	-	-
122	タイ	ムラサキイガイ	2010.7		1.0	0.0	0.7	1.0	-	-	+	+	+	-
123	タイ	ザルガイ	2010.7		0.3	0.0	0.0	1.0	-	-	+	+	-	-
124	タイ	ザルガイ	2010.7		0.0	0.3	1.0	1.0	-	-	+	+	+	-
126	タイ	タイセイヨウサバ	2010.7		0.0	0.0	1.0	1.0	-	-	+	+	-	-
127	タイ	タイセイヨウサバ	2010.7		0.0	0.7	0.7	0.7	-	-	+	+	-	-

envZ, *yscO*, *murQ*, *fadB*, *cspA*, *cadA*はいずれの株も保有したため表には記載していない

表8 PFGE解析で分かれたグループの詳細

グループ	<i>tdh</i> 保有株の割合(株数/総数)	患者由来
1	0%(0/12)	-
2	67%(12/18)	42%
3	15%(4/27)	50%
4	18%(3/17)	100%
5	38%(9/24)	89%
6	8%(1/13)	100%
7	50%(3/6)	100%
8	0(0/18)	-

表9 バイオフィェノタイプアレイ解析で分かれたクラスターの詳細

バイオフィェノタイプ クラスター	臨床由来株の割合 (臨床由来株/総株数)	酸 (SEM)	低浸透圧 (SEM)	凍結 (SEM)	熱 (SEM)
1	29% (4/14)	0.48 (0.12)	0.17 (0.07)	0.38 (0.09)	0.60 (0.11)
2	0% (0/12)	0.33 (0.10)	0.26 (0.10)	0.49 (0.10)	0.62 (0.12)
3	27% (6/22)	0.53 (0.10)	0.32 (0.06)	0.62 (0.07)	0.77 (0.08)

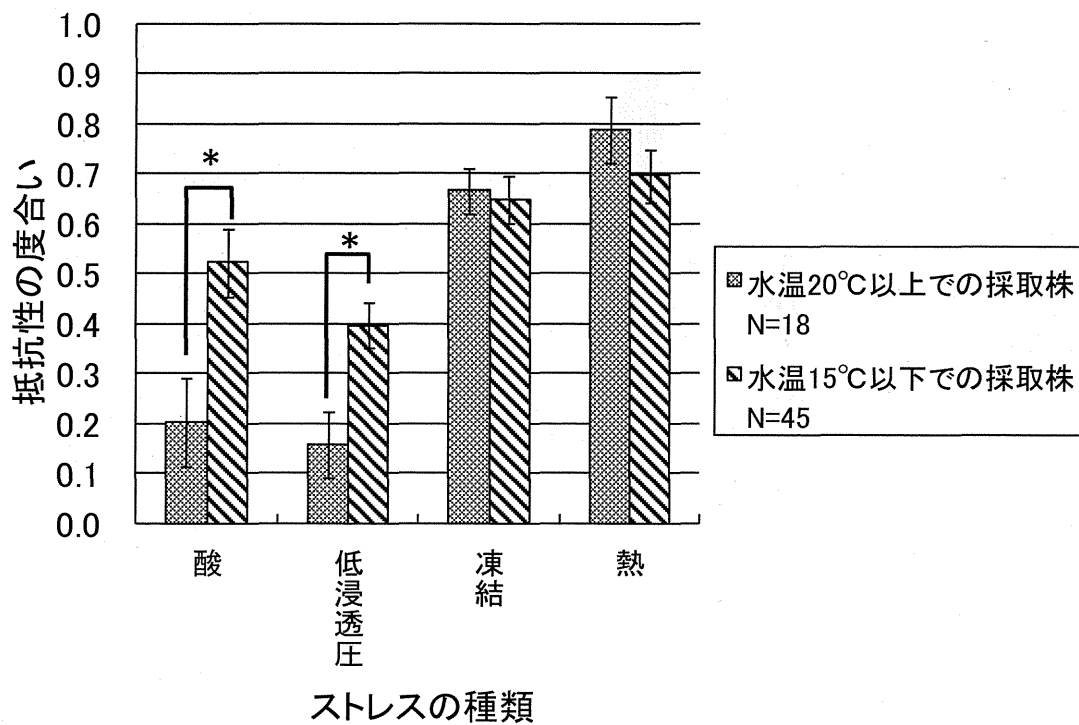


図1 採取水温の違いによるストレス抵抗性の比較 (* $p < 0.05$)

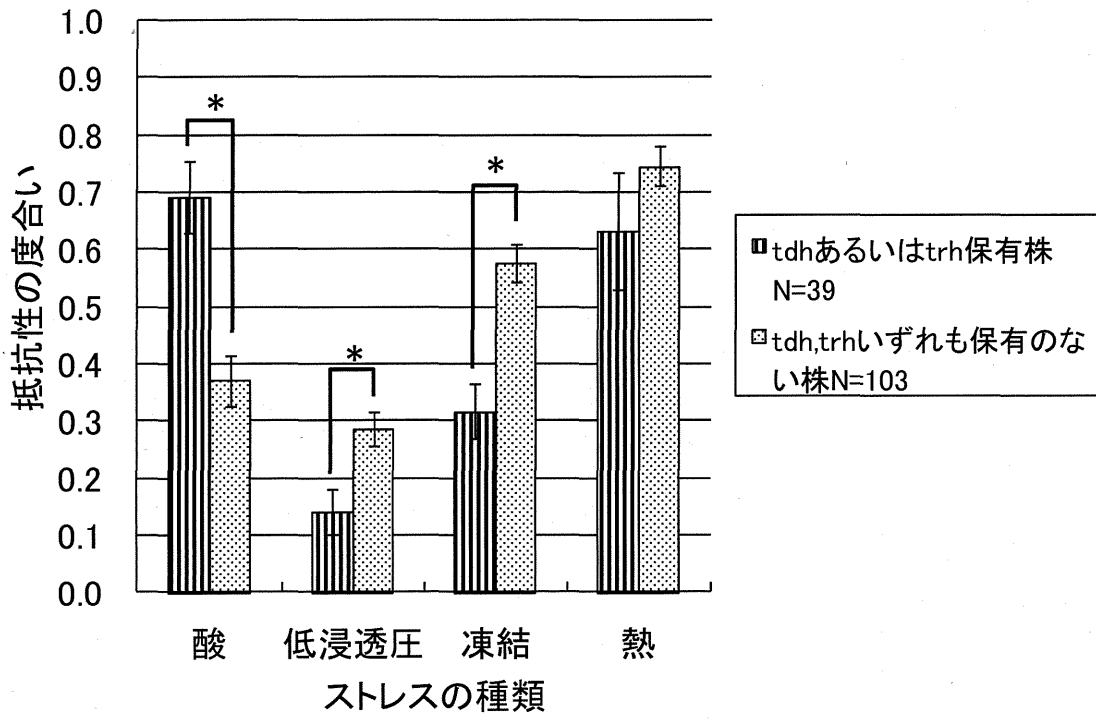


図2 病原性関連遺伝子の保有によるストレス抵抗性の比較 (* $p < 0.05$)

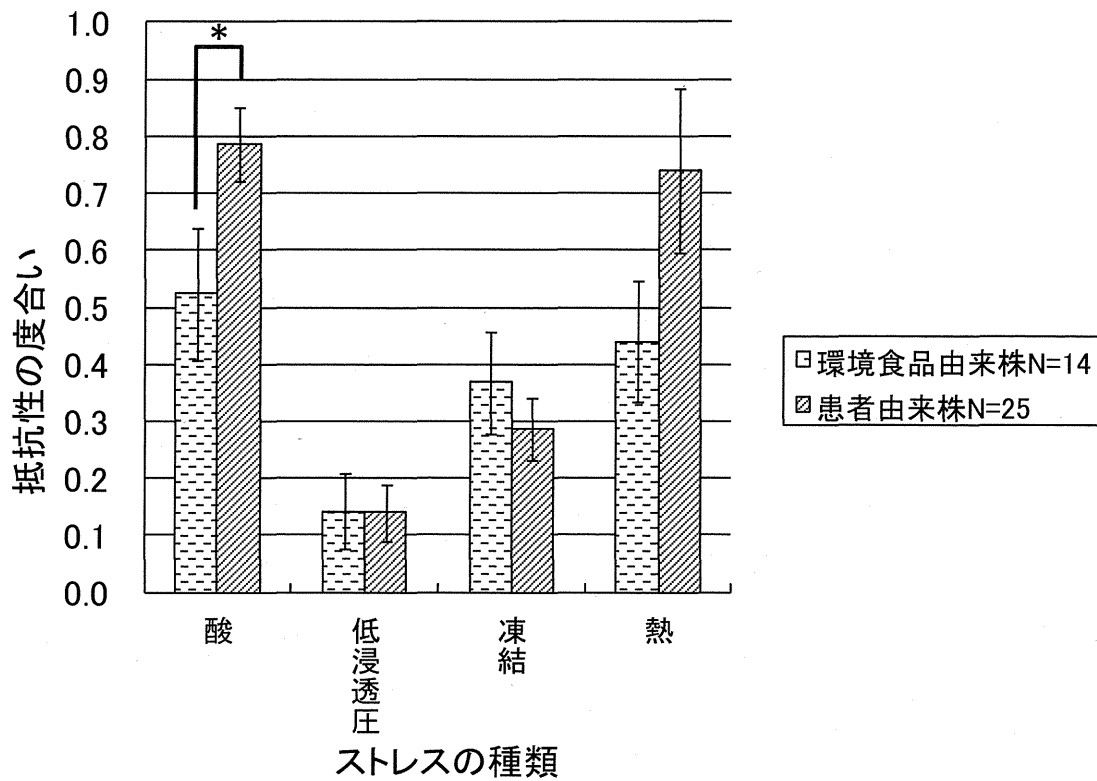


図3 *tdh*あるいは*trh*保有株の由来の違いによるストレス抵抗性の比較 (* $p < 0.05$)

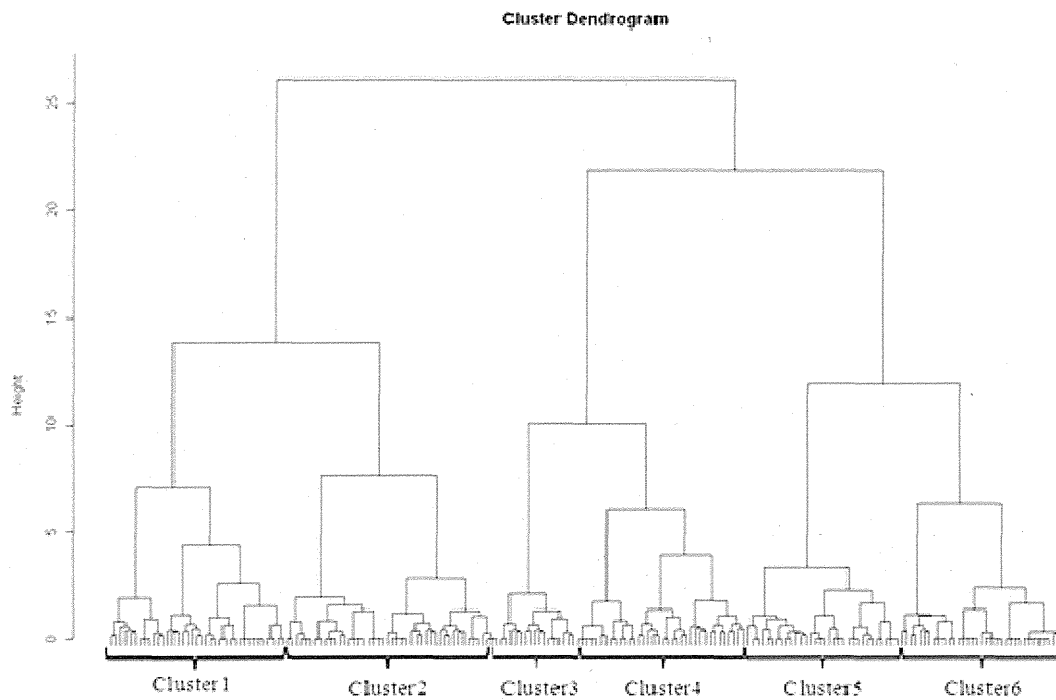


図4 ストレス抵抗性を指標としたクラスター分析の結果

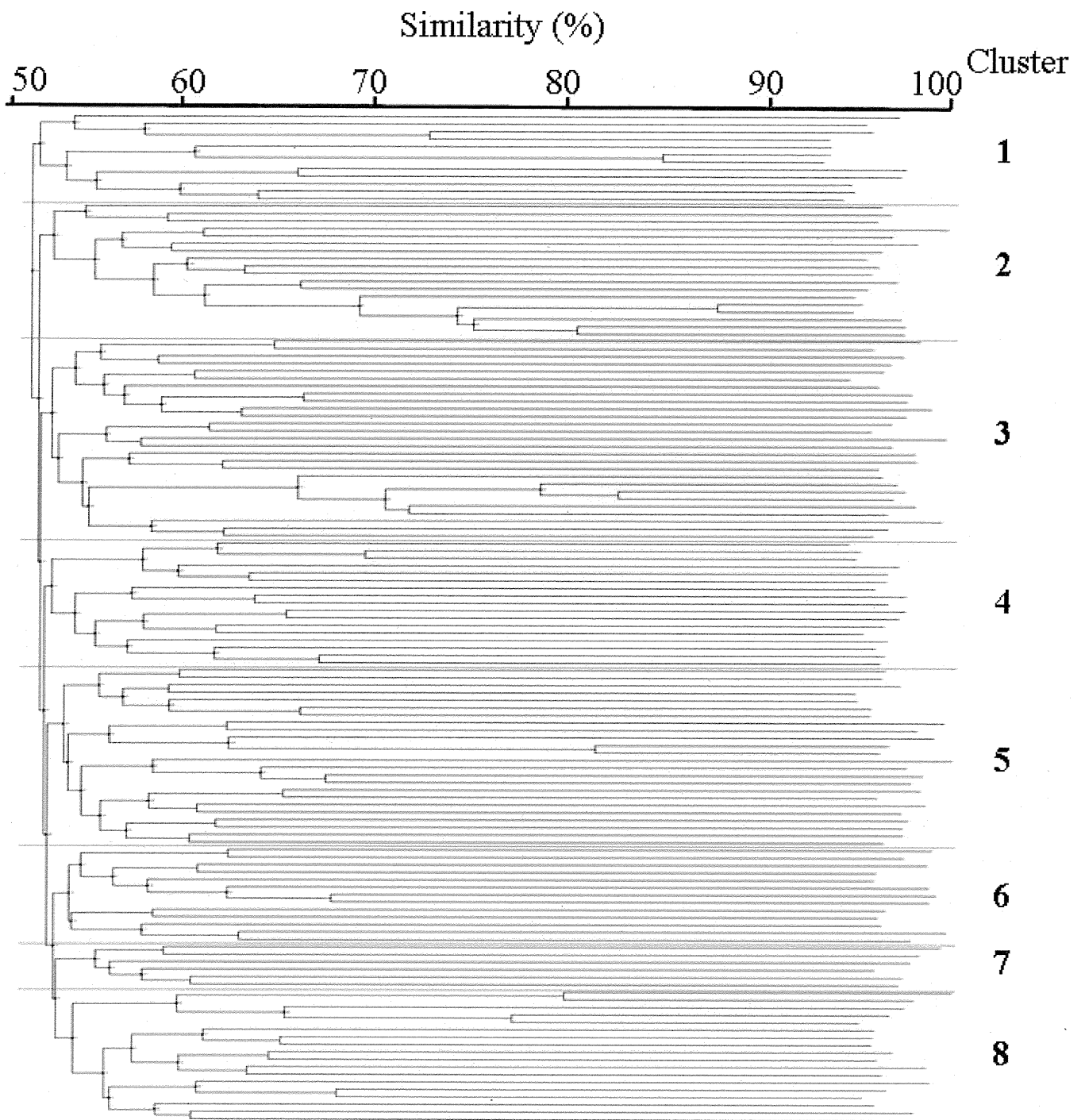


図5 PFGE解析の結果 (系統図の上よりグループ番号1～8に設定)

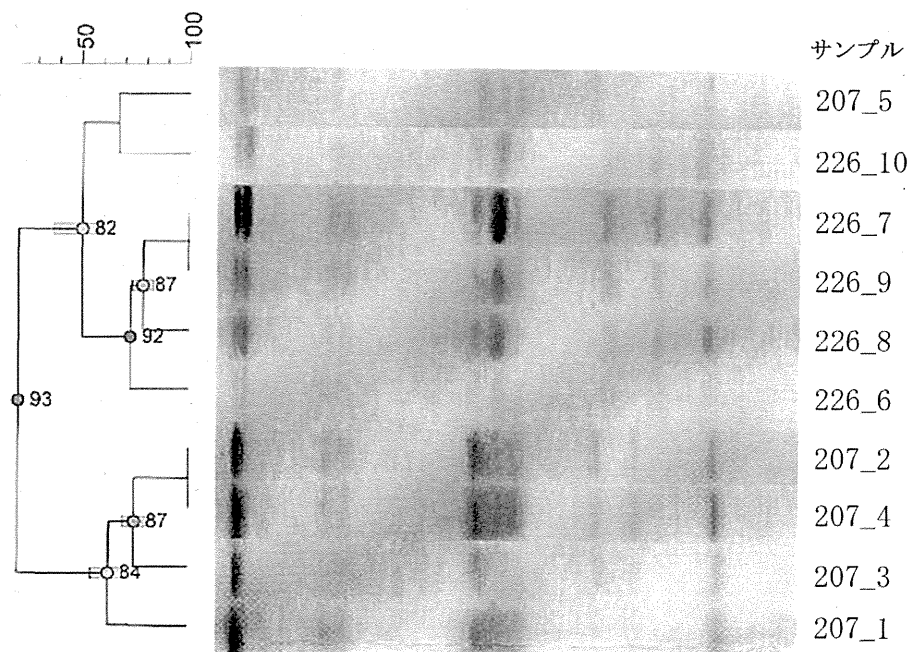


図6 腸炎ビブリオ株2株について条件を変えた際のPFGE解析の結果

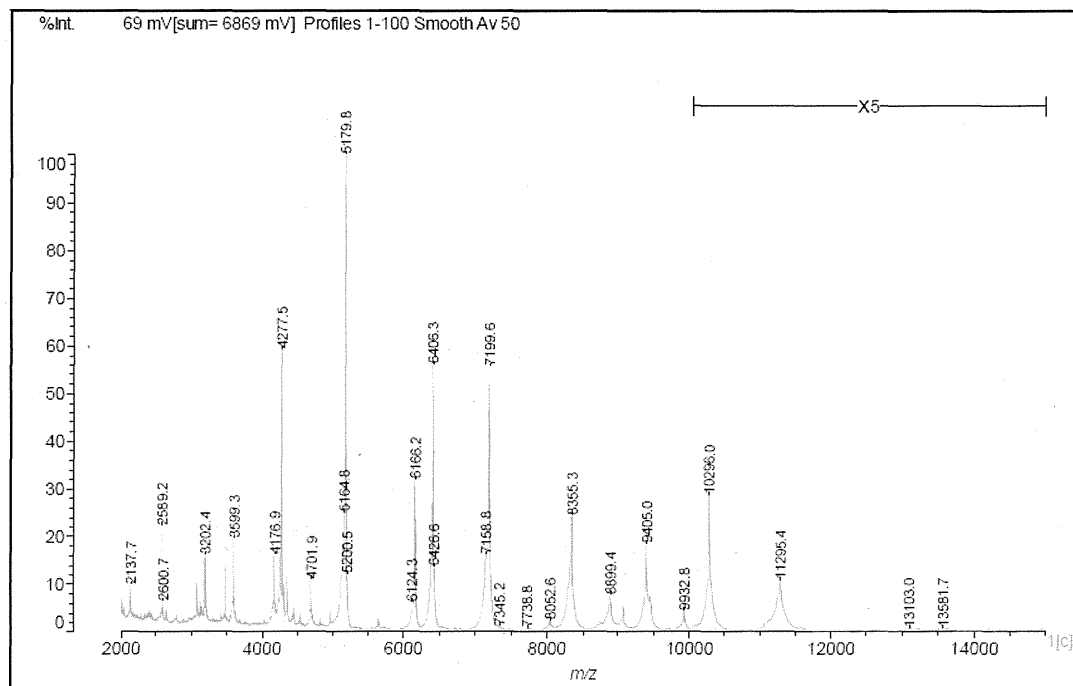


図7 腸炎ビブリオ (機関番号3) のマススペクトル例

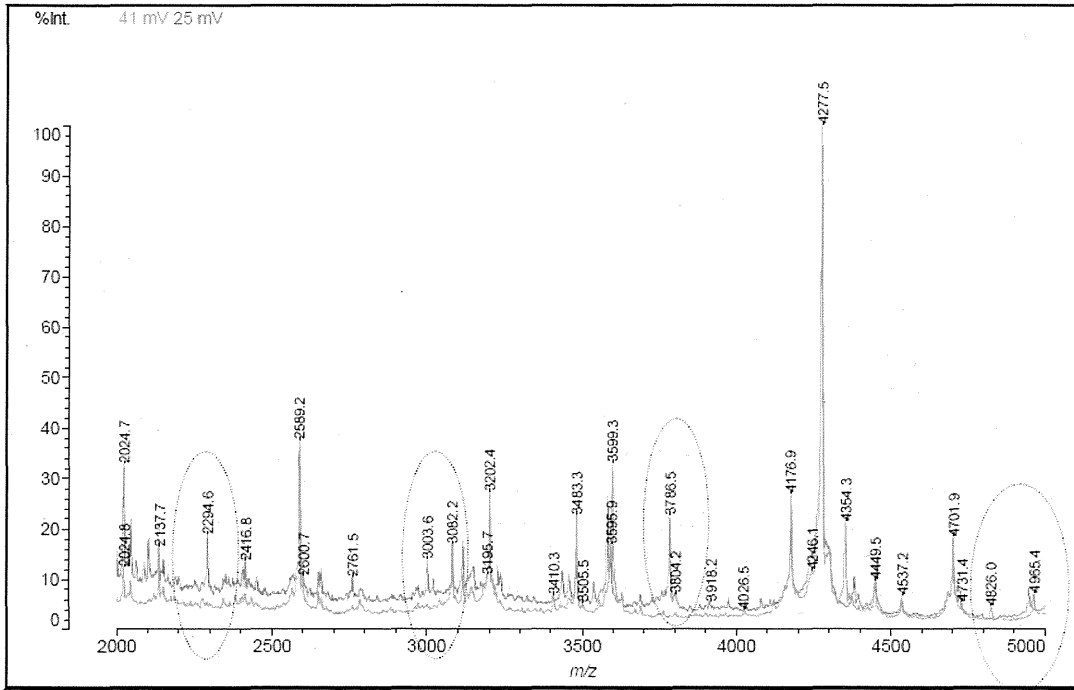


図8 ビブリオ・アルギノリティカス（機関番号5：黒色）と腸炎ビブリオ（機関番号3：灰色）の比較（ m/z 2000-5000）

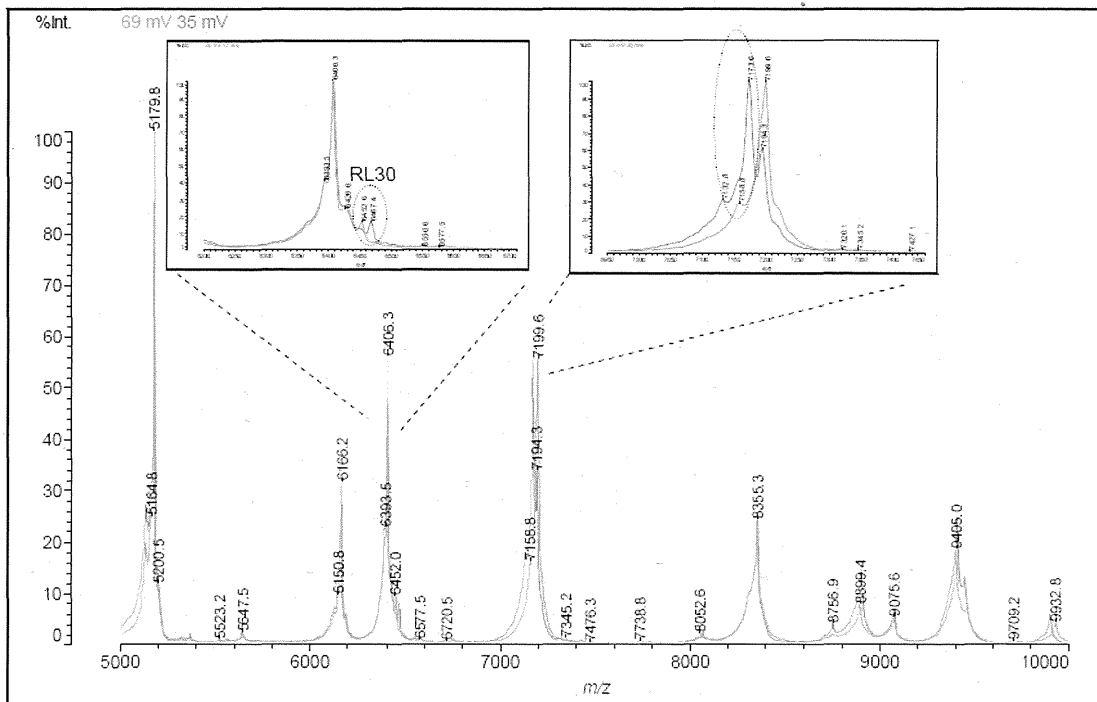


図9 ビブリオ・アルギノリティカス（機関番号5：黒色）と腸炎ビブリオ（機関番号3：灰色）の比較（ m/z 5000-10000）

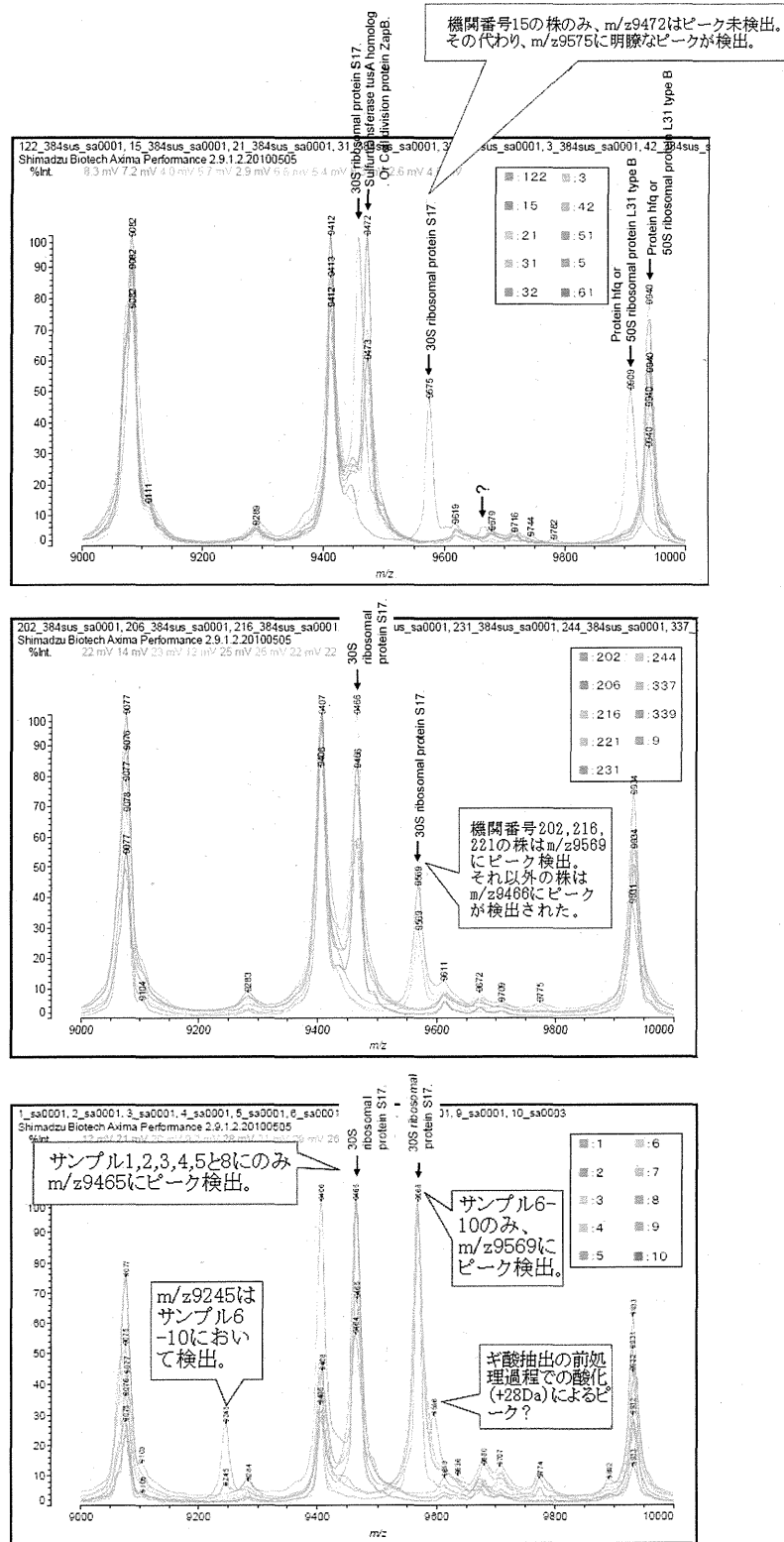


図10 ビブリオ株のMALDI-TOF/MSマスペクトル比較 (m/z 9000-10000) (違いがあった範囲を抜粋)

※ “→” は、菌株特異的なピーク (一部) を示す。TagIdent等で推定できたものは、蛋白名を記載。

最下図の1~10は表4のサンプル番号に対応。

機関番号15,21,31,32,5,61の株は、
m/z10424(10426)にピーク検出。

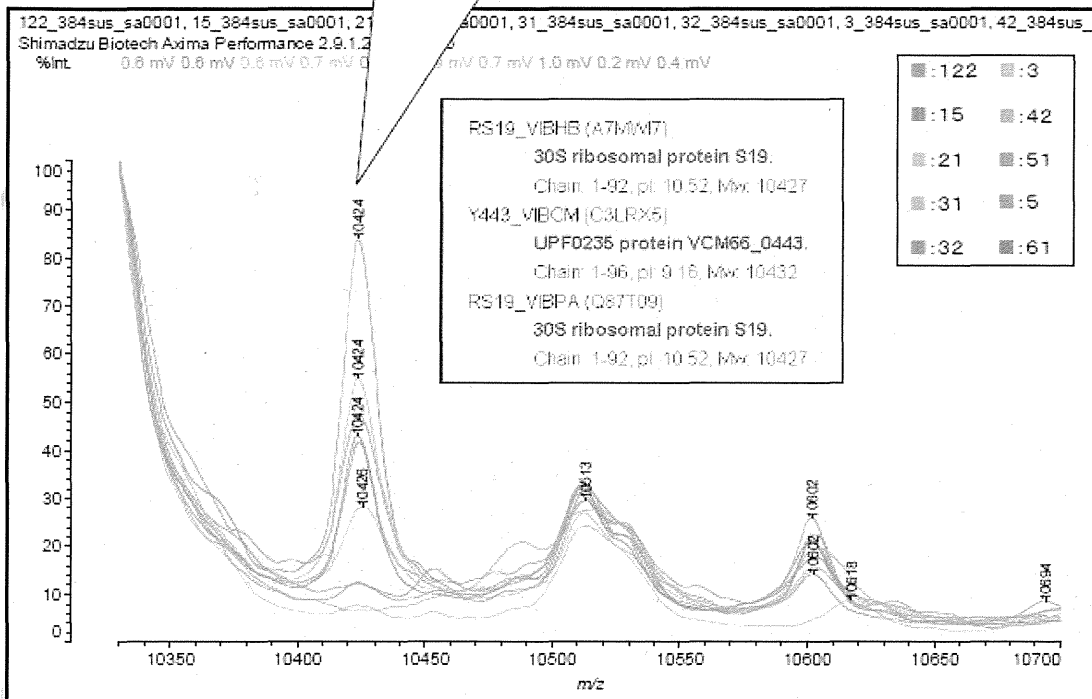


図 1 1 機関番号3, 5, 15, 21, 31, 32, 42, 51, 61, 122の株を対象としたMALDI-TOF/MSマススペクトル比較 (m/z 10431付近拡大)

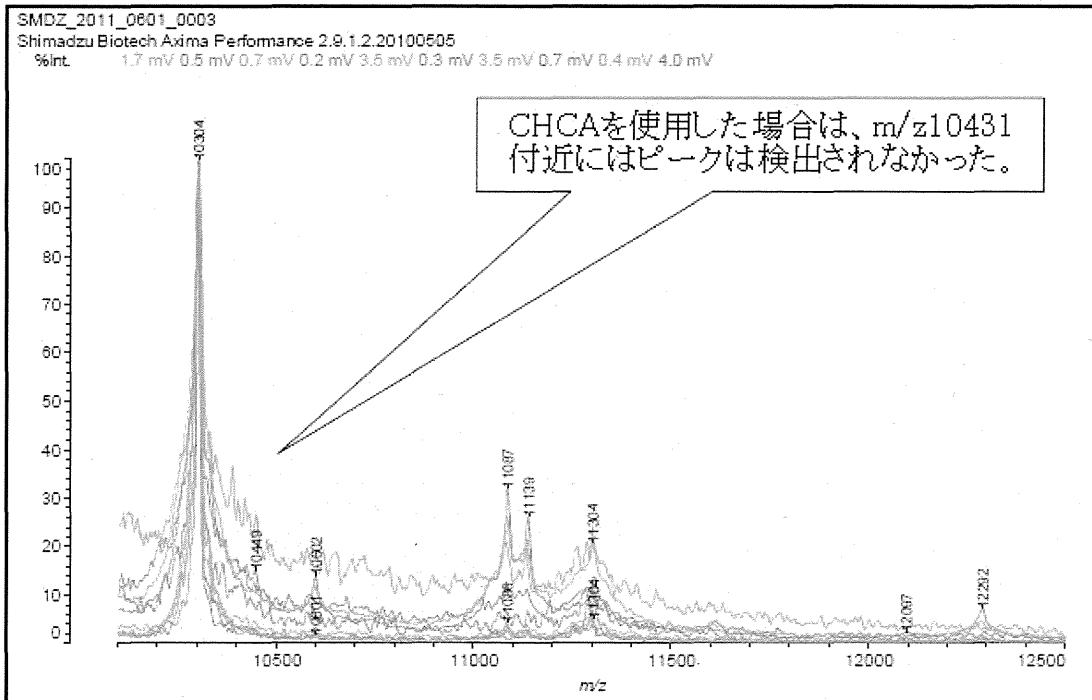


図 1 2 CHCAを用いた際のMALDI-TOF/MSマススペクトルの変化 (m/z10431付近拡大)

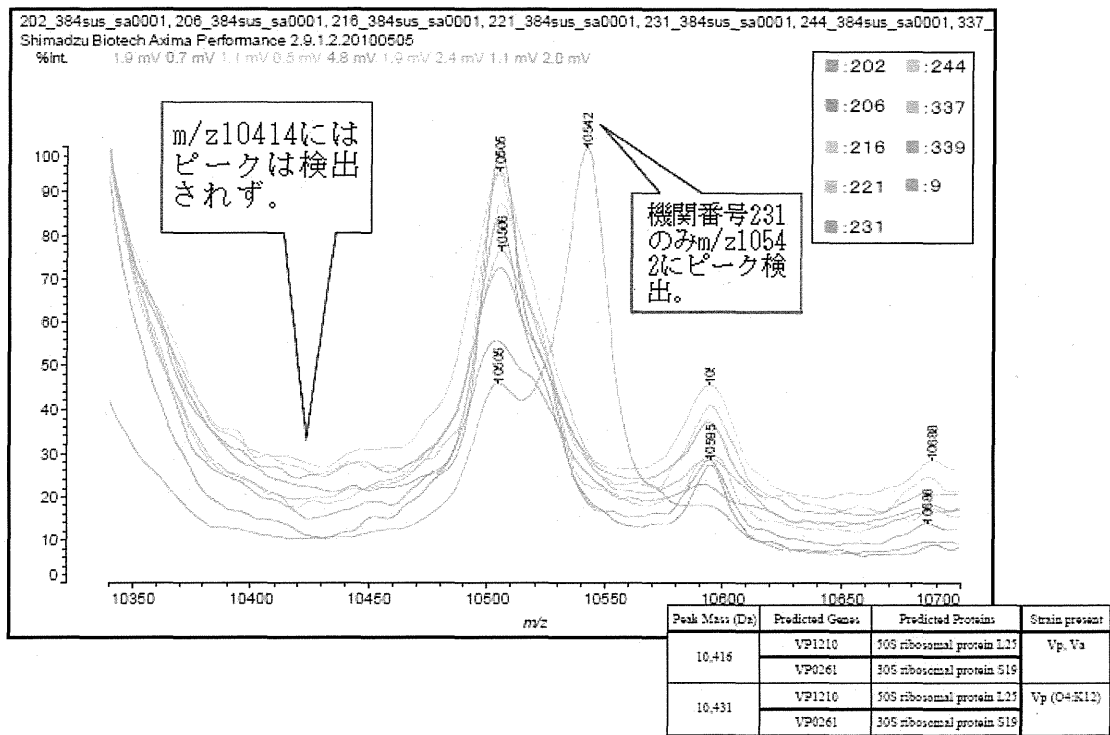


図 1 3 機関番号202, 206, 216, 221, 231, 244, 337, 339, 9の株を対象としたMALDI-TOF/MSマスペクトル比較 (m/z10431付近拡大)

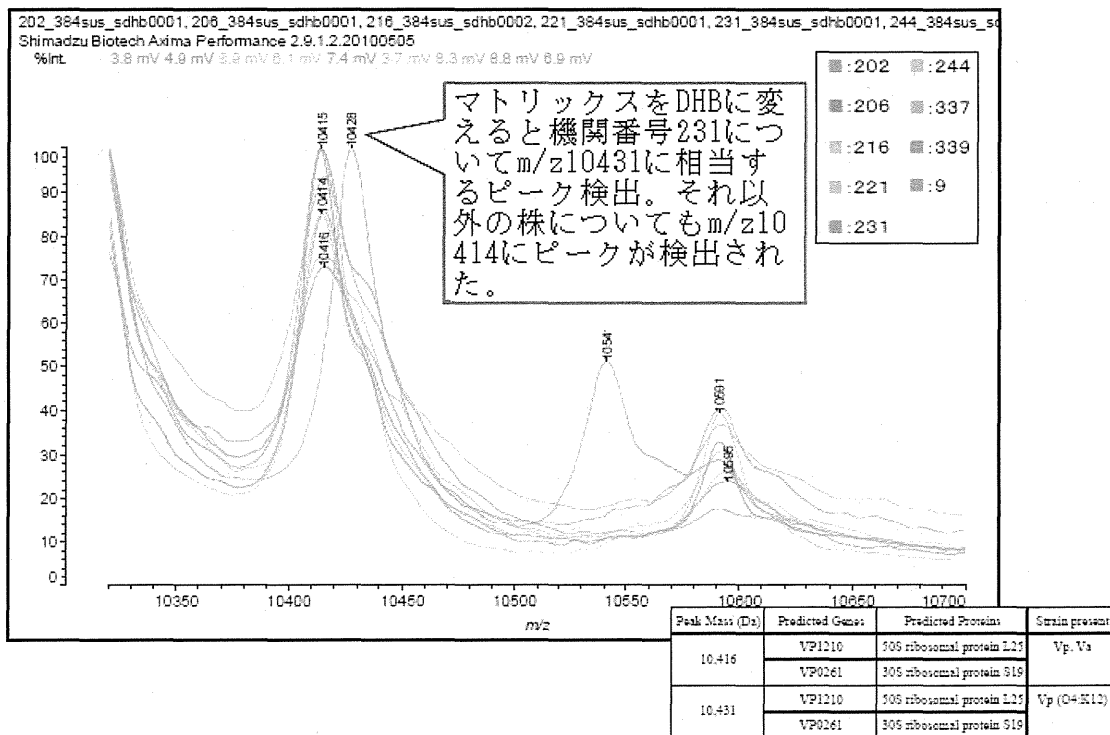


図 1 4 DHBを用いた際のMALDI-TOF/MSマスペクトルの変化 (m/z10431付近拡大)

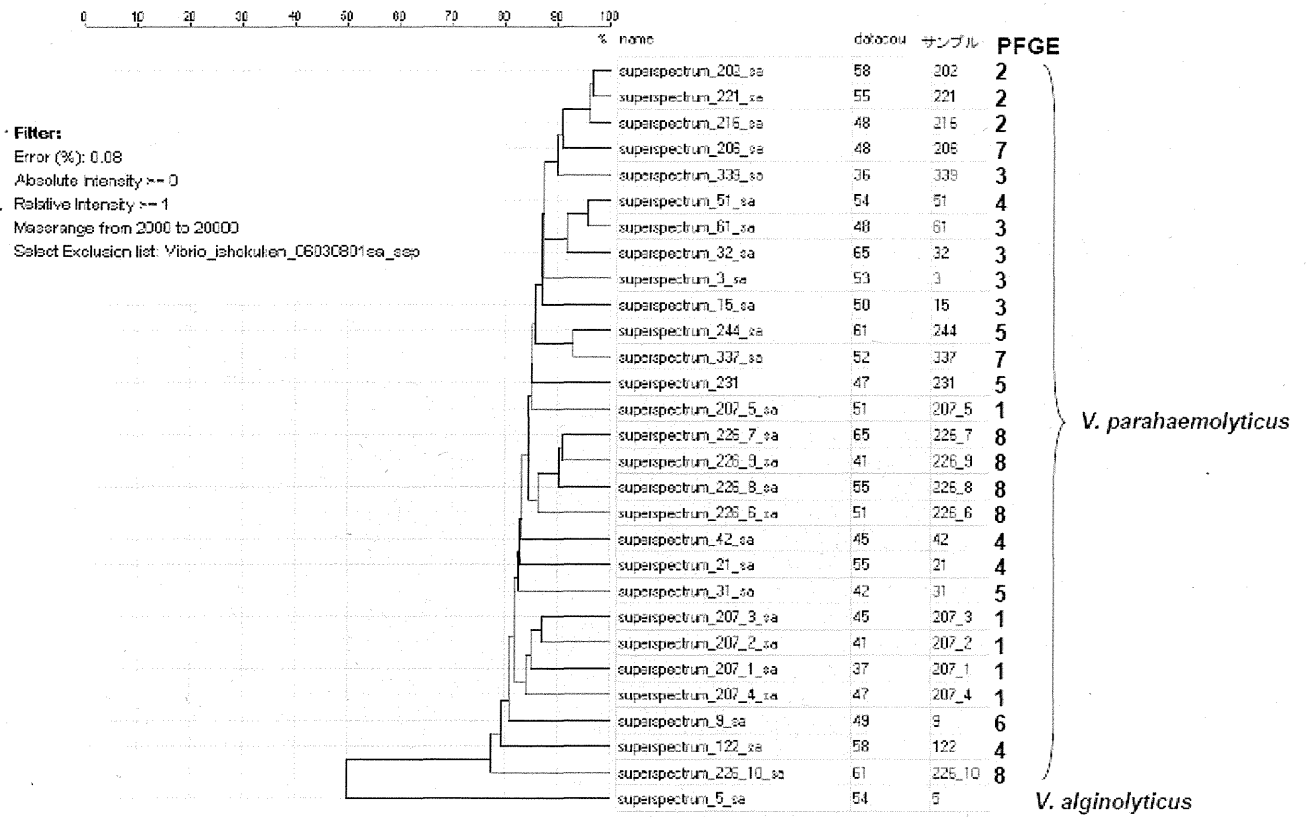


図 1 5 ビブリオ株21株を対象としたMALDI-TOF/MSマスペクトルのクラスター分析結果
 ※ 右端にPFGEクラスターもあわせて記載

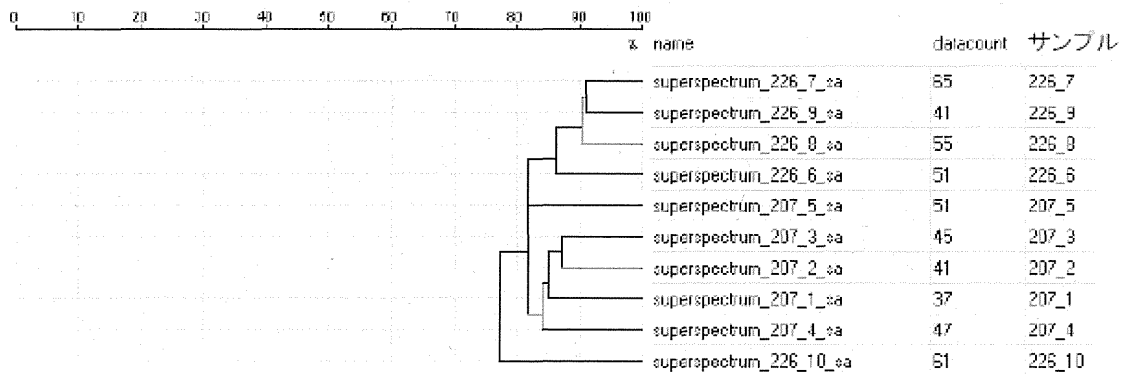


図 1 6 ビブリオ株2株について条件を変えた際のMALDI-TOF/MSマスペクトルのクラスター分析結果

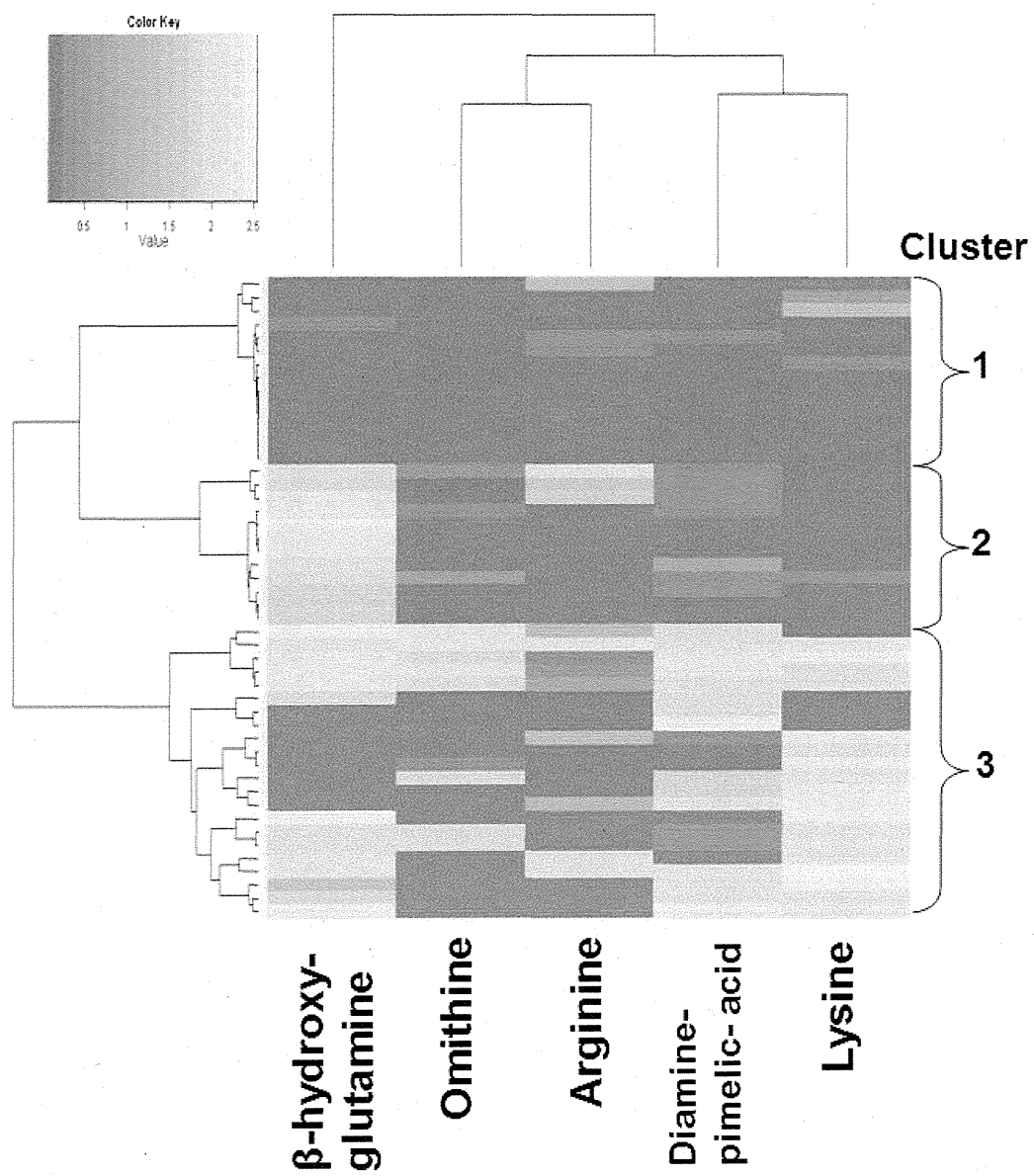


図17 バイオフェノタイプマイクロアレイ解析とクラスター分析を組み合わせた結果

※ 左上のValue値はOD595実測値である

厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進事業

食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築

総合報告書

分担研究報告書

病原性大腸菌の病原性マーカーの検索、食中毒原因食品からの
原因菌確保手法の確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

研究協力者	齊藤志保子	秋田県健康環境センター
	古川一郎	神奈川県衛生研究所
	河野智美、青木佳代	滋賀県衛生科学センター
	前田詠里子、江藤良樹、堀川和美	福岡県保健環境研究所
	李 謙一	東京大学大学院
	小林直樹、長尾清香、山崎朗子	国立医薬品食品衛生研究所

要旨

多様な血清群が存在する腸管出血性大腸菌において、高病原性の指標となる要因を解明するとともに、血清群による高病原性について明らかにするために、多数の株を用いて各種病原因子の遺伝子を検出し、その保有性を集団遺伝学的に解析した。その結果、病原性遺伝子の保有パターンと疫学情報をもとに判定した病原性の強さにより血清型を分類した seropathotype との間に相関が見られ、病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。特に *eae*、*espB*、*tir* はヒトに対する病原性の高い seropathotype において高頻度に検出され、高病原性の株を検出する指標として有用であることが示された。また *katP* および *stcE* は特に強い病原性を持つ腸管出血性大腸菌の指標となることが示唆された。さらに、これまでヒトでの感染症発生が比較的稀な血清群にも高病原性を有する可能性のある菌が存在することが示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の主な病原因子は志賀毒素 (STX) (またはベロ毒素、VT) であり、志賀毒素遺伝子 (*stx*) を保有する。病原性の違いに関わる要因として、*stx* のタイプが挙げられる。*stx* には二つのサブタイプ (*stx1* および *stx2*) が知られており、さらに各サブタイプはそれぞれ複数のバリエーションが存在する。疫学的に臨床症状と *stx* の型の関連が示唆されており、また各バリエーションの培養細胞への毒性の違いも示されている [1, 2]。

また、腸管上皮細胞等への付着因子であるインチミンも病原性に関わるといわれているが、その他の付着因子の存在も知られており、病原性との関連についての研究の進展が求められている。更に、病原細菌の保有する III 型分泌装置に関連する因子、ヘモリジン等毒素、各種酵素などの関連についても今後の解明が待たれており、病原性を決定する因子についての議論は尽きない。

本研究では、多様な血清群が存在する腸管出血性大腸菌において、高病原性の指標となる要因を解明するとともに、血清群による高病原性について明らかにするために、多数の株を用いて各種病原因子の遺伝子を検出し、その保有性を集団遺伝学的に解析した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

様々な検体から分離した STX 産生性大腸菌を本研究に供試した。ヒトから分離された 130 株、ウシなどの動物から分離された 135 株、食品から分離された 16 株、

由来不詳の 6 株を含む 54 血清群 287 株を用いた。これらの株を Karmali ら [3] の提唱する、疫学情報をもとに判定した病原性の強さによって血清型を分類した seropathotype に照らし合わせると、seropathotype A が 29 株、seropathotype B が 92 株、seropathotype C が 23 株、seropathotype が 143 株であった。

2. ゲノム DNA の抽出

Trypticase soy broth を用いて 37°C にて 18 時間培養した菌液から DNA を熱抽出法にて抽出した。保存は -20°C で行なった。

3. 病原遺伝子の検出

stx バリエーションから 6 遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) 染色体上に存在する病原遺伝子から 5 遺伝子 (*iha*, *espB*, *espD*, *tir*, *eae*) とプラスミド上に存在する 6 遺伝子 (*exhA*, *saa*, *espP*, *katP*, *stcE*, *subA*) を選択し、合計 17 遺伝子 [4-10] について PCR にて保有性を検出した。

4. 集団遺伝学的手法による解析

17 種の病原因子保有状況をデータ化し、3 種の集団遺伝学的手法 (1) rarefaction 解析、(2) pairwise fixation index (F_{ST}) による解析、(3) population structure 解析によって seropathotype 間および主要血清群間の遺伝子型を比較した。ただし、(1) および (2) については 128 株を供試した。

1) Rarefaction 解析

Seropathotype 間または主要血清群間の遺伝的多様性の差を検討するために rarefaction 解析を ANALYTIC RAREFACTION version 1.3 (<http://www.uga.edu/strata/software/>) を用いて行

なった。本解析は、異なるサンプルサイズの集団間の遺伝的多様性を比較するために用いられる [11]。作成される rarefaction 曲線では、より急な傾きを示す集団が、遺伝的多様性が高いことを示す。

2) pairwise fixation index (F_{ST}) による解析

Rarefaction 解析で認められた遺伝的多様性の差を定量的に検討するために、seropathotype 間または主要血清群間での pairwise F_{ST} を ARLEQUIN version 3.5.1.2 [12] を用いて推定した。pairwise F_{ST} は遺伝的分化の差の指標として用いられ、次のような解釈がなされる： pairwise $F_{ST} = 0 \sim 0.05$ ：遺伝的分化の程度が小さい、 $0.05 \sim 0.15$ ：中程度、 $0.15 \sim 0.25$ ：大きい、 > 0.25 ：非常に大きい [13]。

3) Population structure 解析

供試菌株を 17 種の病原遺伝子保有パターンに基づきグループ分けするため、STRUCTURE version 2.3.4 [14] を用いてクラスター分析を行なった。病原遺伝子保有が検出された場合には 1、非保有には 0 のダミー変数を割り当て、17 種の病原遺伝子の保有パターンを 17桁の数字として表しデータとした。

本解析は、対象集団の遺伝子型がハーディー・ワインベルグ平衡となっていると仮定し、遺伝子型の情報から菌株を K 個のクラスターに分け、各株がそれぞれのグループに属する確率を算出する。マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) 解析のサンプリング回数としては、収束前の「burn-in」として 1,000,000 回、収束後

として 1,000,000 回を設定した。クラスター数を 2 から 10 まで、それぞれ 20 回の解析を行ない、得られた結果を CLUMPP [15] により集計してそれぞれのグループに属する確率 (Q 値) を算出した。Q 値を元に各菌株のグループ分けを行った。すなわち、各菌株において Q 値が最大となるクラスターに、各菌株を分類した。

C. 結果

1. 各 seropathotype 間での病原遺伝子保有率の比較

17 の標的病原遺伝子について seropathotype ごとに保有率を算出して比較した。*stx* のバリエーション 6 遺伝子のうち、*stx1* は seropathotype B で、*stx2* は seropathotype A で高い保有率を示した。そのほかの *stx* バリエーションはいずれの seropathotype でも低い保有率であった。*stx* 以外の病原遺伝子については、*eeae*、*espB*、*espD*、*tir* が seropathotype A および B で高い保有率を示し、seropathotype C および D・E では低い保有率であった。また、*katP* および *stcE* は seropathotype A で 100% の保有率を示したが、他の seropathotype では保有率が低かった。

2. 集団遺伝学的手法による解析

1) Rarefaction 解析

Seropathotype 間で rarefaction 曲線を比較したところ、seropathotype A が最も遺伝的多様性が低く、次いで seropathotype B の遺伝的多様性が低かった。Seropathotype C および seropathotype D・E の遺伝的多様性はほぼ同等であり、seropathotype A および B に比べて遺伝的により多様であった。主要血清群間で

rarefaction 曲線を比較したところ、0157 の遺伝的多様性が最も低く、次いで 026 が低かった。その他の主要血清群では、0157 および 026 よりも遺伝的多様性が高かったが、その他の血清群間の差はわずかであった。

2) Pairwise fixation index (F_{ST}) による解析

Seropathotype 間の pairwise F_{ST} は、seropathotype C および D・E 間を除いた全ての組み合わせで 0.30 以上であり、各 seropathotype 間での遺伝的分化が非常に大きいことが示された。主要血清群間の pairwise F_{ST} は、0157 および 026 は他の全ての血清群に対して、0.43 以上であり、02 および OUT では、他の全ての血清群に対して pairwise F_{ST} が 0.3 以上であった。0113、08、0153、0163 および 0116 間では、0113 および 0116 と他の血清群との pairwise F_{ST} が比較的 low かった。

3) Population structure 解析によるクラスタリング

17 病原遺伝子の保有パターンを指標にした population structure 解析結果をに示した。 $K=2, 3, 4, 6, 7$ において、各クラスタに属する確率 (Q 値) ごとにグループ分けが可能であった。しかし、 $K=5, 8, 9, 10$ では、最大となる Q 値が小さくなる株が多数検出され、適当なグループ分けができなかった。本研究では最も詳細なグループ分けが可能であった $K=7$ におけるクラスタリング結果をもとに考察を行った。 $K=7$ における population structure 解析結果を seropathotype ごとに並べ替えた。

Seropathotype A ではすべての株においてクラスタ 1 に属する確率が最も高くな

った。seropathotype B では 38 株 (41%) はクラスタ 2 に、49 株 (53%) はクラスタ 3 に対する Q 値が最も高くなった。Seropathotype C では 7 株 (30%) はクラスタ 4 に、12 株 (52%) はクラスタ 5 に対する Q 値が最も高かった。最後に seropathotype D・E は、クラスタ 4、5、6 に属する確率が最も高くなる株が全体の 9 割を占めた。

3. 各クラスタ間での病原遺伝子保有率の比較

Population structure 解析 ($K=7$) において Q 値が最大となるクラスタごとに供試菌株を分類し、各クラスタの病原遺伝子保有率を算出した。なお、クラスタ 7 に対する Q 値が最も高くなる株は検出されなかった。

stx バリエントのうち、*stx1* はクラスタ 2 および 5 で 95% 以上の高い保有率を示した。*stx2* はクラスタ 1 で最も高い保有率 (89%) を示し、次いでクラスタ 4 (73%) となった。そのほかの *stx* バリエントはいずれのクラスタにおいても高い保有率は示されなかった。

stx 以外の病原遺伝子については、*eae*、*espB*、*tir* はクラスタ 1、2、3 において、*katP* はクラスタ 1 と 2 で 95% 以上の保有率を示したが、その他のクラスタではほとんど検出されなかった。また、*stcE* はクラスタ 1 のみで高い保有が見られた。一方で、*iha* および *ehxA* はクラスタ 6 では保有率が低かった (それぞれ 28%、24%) が、その他のクラスタでは高い保有率を示した。

D. 考察

1. 各 seropathotype の病原遺伝子保有率の比較

本研究に供された 287 株の EHEC を seropathotype 別に分類し、病原遺伝子保有率を比較した。その結果、*stx* バリエーションの中では *stx1* が高い病原性を示す seropathotype A および B で共に保有率が高く、高病原性に関与する可能性が示唆された。

stx 以外の遺伝子については、病原性の高い seropathotype A および B でともに保有率が高く、その他の seropathotype で低い遺伝子として、*eae*、*espB*、*espD*、*tir* が検出され、これらは病原性を誘起する因子と考えられた。これらの遺伝子はいずれも、病原性遺伝子座 LEE に存在する。LEE には腸管上皮細胞への初期接着に関わる約 40 の遺伝子がコードされており、これらの遺伝子の高病原性への関与が示されたことで、高病原性に細胞接着が重要であることが強く示された。また、*stcE* は seropathotype A のみで高い保有が見られ、特に高い病原性を示す場合に必要の病原遺伝子である可能性が考えられた。

2. 集団遺伝学的手法による解析

1) Rarefaction 解析および pairwise F_{ST} による解析

Rarefaction 解析および pairwise F_{ST} から、STEC の遺伝的多様性は、seropathotype A で最も低く、次いで seropathotype B で低く、seropathotype C および D・E では比較的高いことが示された。主要血清群別に rarefaction 解析を行った際にも、seropathotype A および B に属する 0157 および 026 で遺伝的多様性

が低かったことから、これらの血清群は他の血清群に比べて、病原因子保有パターンの一貫性が高いことが示された。一方、seropathotype C および D・E 間の pairwise F_{ST} は比較的小さく、rarefaction 曲線も類似していた。これらの seropathotype に属する主要血清群の rarefaction 曲線も互いに類似していたことから、seropathotype C および D・E に属する血清群の STEC はいずれも遺伝的に比較的多様であることが明らかとなった。

2) Population structure 解析

(1) Seropathotype と病原遺伝子保有パターンの相関

287 供試菌株は病原遺伝子の保有パターンから 7 つのクラスターに分けることができ、seropathotype A の株はすべてクラスター 1 に分類され、seropathotype B の株のうち 88 株 (96%) はクラスター 2 もしくは 3 に、seropathotype C および D・E の株のうち 148 株 (89%) はクラスター 4、5、6 のいずれかに分類された。Seropathotype の分類と病原遺伝子の保有パターンは相関しており、病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。また、クラスター 1、2、3 に分類される病原遺伝子保有パターンは病原性を示す可能性が高く、特にクラスター 1 の保有パターンは最も強い病原性を示すと考えられた。

(2) 各クラスターの病原遺伝子保有率の比較

病原性を示す可能性の高い遺伝子保有パターンであるクラスター 1、2、3 において保有率が高く、その他のクラスター

一において保有率の低い遺伝子である *eae*, *espB*, *tir* は病原性の発揮に強く関与する可能性がある。さらに、*stcE* はクラスター 1 のみで保有率が高く、特に強い病原性を付与する因子として機能している可能性が考えられた。

また、中程度の病原性を示す seropathotype B は、主に二つのクラスター（クラスター 2 および 3）に分かれることが示され、何らかの性質の違いが存在する可能性が考えられた。クラスター 2 と 3 の間で保有率の大きく異なる遺伝子は *katP* であり、*KatP* はクラスター 1 でも高頻度に保有されることから、強い病原性に関わる可能性が考えられる。よって、seropathotype B の中でもクラスター 2 に属する株はクラスター 3 より病原性が高いと考えられた。血清群別にみると、026 の株の多くがクラスター 2 に属し、0103、0111、0121 の株の多くがクラスター 3 に属していた。血清群 026 は 0157 に次いで検出件数の多い血清型であり [16]、*katP* は感染症の発生頻度に関わっている可能性が考えられた。

3) 潜在的高病原性株の可能性

病原遺伝子保有パターンによるクラスター分けと seropathotype の相関が示された一方で、seropathotype C または D・E に分類される株の中に、病原性を発揮する可能性の高いクラスターに分類される株が存在した。特に、seropathotype C において、クラスター 1 に属する株が存在しており、全て血清群 0165 であった。0165 は、検出頻度は高くないものの HUS などの重症患者から分離された報告が多数ある [17, 18]。また、seropathotype D・

E に分類される株の中にクラスター 2 や 3 に分類される株が存在した。含まれる血清群は 014、016、045、063、074、119、128、OUT であったが、これらの株は中程度の病原性を示す可能性が考えられた。これまで病原性との関与が示されていない血清群においても高い病原性を有する菌が存在する可能性が示された。

E. 結論

疫学情報を基に病原性の強さにより血清群を分けた seropathotype の分類は病原遺伝子の保有パターンとよく相関しており、病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。ヒトに対する病原性が高い EHEC を検出する指標として *eae*, *espB*, *tir* が有用であり、また *katP* および *stcE* は特に強い病原性を持つ EHEC の指標となることが示唆された。さらに、これまでヒトでの感染症発生が比較的稀な血清群にも高病原性を有する可能性のある菌が存在することが示唆された。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Lee, K., French, N. P., Jones, G., Hara-Kudo, Y., Iyoda, S., Kobayashi, H., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S. Variation in stress-resistance patterns among *stx* genotypes and genetic lineages in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. Appl. Environ.