

考えるべきポイントをまとめた (表 6)。菌株情報あるいは患者情報を参考にしながら、使用する分離培地や増菌培地を選択すべきである。また増菌培養では培養温度によってバックブランドの菌が抑えられる場合もある。遺伝子検査としてリアルタイム PCR 法で VT 遺伝子をスクリーニングする方法や免疫磁気ビーズ法を用いた対象菌の濃縮も非常に有効である。

#### D. 考察

2014 年に東京都内で分離された 358 株のうち血清群 0157 は 268 株 (74.9%)、026 は 37 株 (10.3%) で、この 2 血清群で分離株の 85% を占めていた。東京都では毎年 0157 の占める割合が高い傾向であるが、2014 年は例年と比較して低かった。0157、026、0111 以外の血清群菌は 44 株 (12.3%) であった。44 株は 10 種類の血清群および OUT に型別された。

0157、026、0111 以外の血清型について、付着因子等の病原遺伝子保有状況をみると、有症者からの分離が多い血清群 05、0103、0121 は全ての株で *eae*、*hlyA* を保有していた。0128 と 0153 は *subA* を保有し、OUT 株 8 株中 6 株で *eae* を保有していた。

食品から検出された 4 株は、VT2 産生株であったが、全てこれらの病原関連遺伝子を保有していなかった。食品や環境から分離される EHEC の病原因子については、今後も継続して調べていく予定である。

非典型的 EHEC の食中毒・感染症が発生した場合、迅速な検査に対応するためには、日ごろから検査体制を整えておく必要がある。患者からすでに菌が検出されている場合には、菌株に関する情報があれば、検査が非常に迅速・効率的となるため、それらの検査に必要な情報についてまとめた。これらの情報が少しでも集まれば、検査時間の短縮・効果的な検査に繋がるものと考えている。

#### E. 結論

2014 年に東京都内で分離された 358 株の

うち、血清群 0157、026 および 0111 以外の株は 44 株 (12.3%) で、2012 年と比較して割合が高くなっていた。44 株の血清群は、0103 (13 株, 3.6%)、0121 (11 株, 3.1%)、0145 および 091 が各 3 株 (0.8%)、OUT が 8 株 (2.2%) であった。重症化 (HUS 発症) が確認されたのは、0157 の 10 名のみであった。

付着因子等の病原遺伝子保有状況を調べた結果、有症者からの分離が多い血清群 0103、0121、0145 は全ての株で *eae*、*hlyA* を保有していたが、食品由来株 4 株 (VT2 産生) はこれらの病原遺伝子陰性であった。

非典型的 EHEC による食中毒・感染症の発生時の迅速な検査対応には、菌株に関する情報が、その後の検査に非常に重要である。検査に有用となる情報、非典型的 EHEC 検査のポイントについてまとめた。

#### F. 健康危険情報

非定型的 EHEC と重症化因子について早急に調べる必要がある。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
準備中

2. 学会発表

1) 小西典子, 齊木大, 石塚理恵, 赤瀬悟, 横山敬子, 門間千枝, 河村真保, 尾畑浩魅, 高橋正樹, 貞升健志, 甲斐明美: 2013 年に東京都で発生した腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症の特徴, 第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2017 年 7 月, 京都.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

表1. ヒトから分離された腸管出血性大腸菌  
(2014年, 東京都)

血清群	菌株数 (%)	産生毒素		
		VT1	VT2	VT1+VT2
O157	268 (74.9)	5	69	194
O26	37 (10.3)	29	8	
O103	13 (3.6)	12		1
O121	11 (3.1)		11	
O111	9 (2.5)	2		7
O91	3 (0.8)	3		
O145	3 (0.8)	1	2	
O5	1 (0.3)	1		
O8	1 (0.3)		1	
O109	1 (0.3)		1	
O128	1 (0.3)			1
O146	1 (0.3)	1		
O153	1 (0.3)		1	
OUT	8 (2.2)	1	6	1
合計	358	55	99	204

表2. O157, O26, O111以外の血清群別  
発症状況(2014年, 東京都)

血清群	供試数	症状		
		有	無	不明
O5	1	1		
O8	1		1	
O91	3		1	2
O103	13	10		3
O109	1		1	
O121	11	7		4
O128	1	1		
O145	3	1		2
O146	1	1		
O153	1			1
OUT	8		2	6
合計	44	21	5	18

表3. ヒト由来腸管出血性大腸菌の血清群別遺伝子保有状況  
(2014年, 東京都)

血清群	供試菌株数	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	<i>subA</i>	<i>aggR</i>
O103	13	13	0	13	0	0
O121	10	10	0	10	0	0
O91	3	0	0	2	0	0
O145	3	3	0	3	0	0
O5	1	1	0	1	0	0
O8	1	0	0	0	0	0
O109	1	1	0	0	0	0
O128	1	0	0	1	1	0
O146	1	0	0	0	1	0
O153	1	1	0	1	0	0
OUT	8	6	0	0	0	0
合計	43	35	0	31	2	0

表4. 食品由来株の病原因子保有状況

No.	由来	血清群	毒素型	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	<i>subA</i>	<i>aggR</i>
1	豚ハツ	O74:HUT	VT2	-	-	-	-	-
2	牛ツラミ刺し	O119:H16	VT2	-	-	-	-	-
3	豚タン	O142:NM	VT2	-	-	-	-	-
4	牛小腸	OUT:H4/17	VT2	-	-	-	-	-

表5. 検査に有用となる情報

---

<p>分離株の性状について</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・血清型 (O血清群)</li> <li>・毒素型</li> <li>・CTに対する感受性           <ul style="list-style-type: none"> <li>→ CT-SMAC寒天培地やクロモアガーSTEC培地に発育する菌か否か</li> </ul> </li> <li>・糖の分解性           <ul style="list-style-type: none"> <li>(ソルビトール, ラムノース, ソルボース, 乳糖, 白糖, その他)</li> </ul> </li> </ul>
---

---

<p>糞便検体提出者に関する情報</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・属性 (患者, 調理従事者, 家族, 同時喫食者等)</li> <li>・症状の有無</li> <li>・発症者であれば → 何病日の検体か → 抗菌薬投与の有無</li> </ul>
---

---

表6. 非典型的EHEC検査のポイント

---

<p>分離平板</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・CT-SMAC寒天, CT-RMAC寒天, CT-ソルボースMAC寒天等CTを含む培地</li> <li>・クロモアガーSTEC等の酵素基質培地</li> <li>・DHL寒天, マッコンキー寒天, XM-G寒天等選択性の弱い培地</li> <li>・エンテロヘモリジン培地</li> </ul>
<p>増菌培地</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・mEC培地, ノボビオシン加mEC培地, CT-TSB, TSB, EC培地 Rapidcalt, UPB等</li> </ul>
<p>増菌培養温度</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・37°C, 42°C</li> </ul>
<p>遺伝子検査によるスクリーニング試験</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・対象遺伝子: VT遺伝子, O抗原遺伝子</li> <li>・対象検体: 分離平板 (Colony-sweep法), 増菌培養液</li> </ul>
<p>菌の分離</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・リアルタイムPCR法によるVT遺伝子のスクリーニング試験           <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ct値の低い検体から菌の分離を行う</li> </ul> </li> <li>・免疫磁気ビーズ法による対象菌の濃縮 (診断用血清を用いて自家調整することも可能)</li> <li>・できるだけ多くの集落を検査する</li> </ul>

---

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究  
分担課題 大腸菌 O 血清群の核酸検出法に関する研究

研究分担者 井口 純（宮崎大学 農学部 畜産草地科学科・准教授）

## 研究要旨

大腸菌の血清学的な分類は、分離菌株間の系統的関連性やその系統集団に関連した病原因子を予測する上で重要な手掛かりとなる。特に事例発生時の初動調査において、分離菌株間の O 血清群同一性の確認は原因菌の感染範囲や感染経路を特定する上で有用な情報となる。我々はこれまでに大腸菌の血清学的判定に対応した安価で迅速な核酸検出法の開発を目指した。まず大腸菌 O 抗原合成遺伝子領域の網羅的な塩基配列情報を基に、各 O 血清群（またはグループ）を特異的に判定できる 162 種類の PCR プライマーセットをデザインした。さらに、それら全プライマーセットを用いて 20 種類のマルチプレックス PCR キットからなる大腸菌 O 血清群-PCR 検査系（*E. coli* O-genotyping PCR 法）を開発し、全 184 種類の大腸菌 O 血清群参考株を用いて特異性の確認を行った。本年度は野生株 690 株（O 血清群が判定できた 579 株に加え、判定できなかった 111 株を含む）を用いて本法の妥当性および有効性を評価した。本研究で開発した手法は、分離菌株の O 血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有用であると考えられた。

## A. 研究目的

大腸菌の血清学的な分類は、分離菌株間の系統的関連性やその系統集団に関連した病原因子を予測する上で重要な手掛かりとなる。特に事例発生時の初動調査において、分離菌株間の O 血清群同一性の確認は、原因細菌の感染範囲や感染経路を特定する上で有用な情報となり、重要な検査項目の一つとなっている。大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所（Statens Serum Institut: SSI）（兼 WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*）により現在のところ O1 から O187 までが定められており、3 種類の亜型（O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac）と 6 種類の欠番（O31、O47、O67、O72、O94、O122）があるために 184 種類の O 血清群が認められている。ヒト患者から分離される腸管出血性大腸菌（EHEC）の O 血清群は O157、O26、O111、O103、O145、O121、O165 などが大半を占めるが、稀な O 血清群に属する EHEC の分離も報告されている。国立感染症研究所の調べによると 2007 年から 2011 年の間に少なく

とも 90 種類の O 血清群が確認されており、血便や溶血性尿毒症症候群を呈した重症患者から稀な O 血清群が分離される事例も複数報告されている。また 2011 年にはドイツを中心に、過去に事例報告例がほとんど無い EHEC O104 による大規模な集団事例が発生した。このような状況において、検査現場では稀な O 血清群にも対応した検査法を備え、事例発生時に早期対応できる態勢を整えておくことが望まれる。しかし、SSI から販売されている O 血清群完全判定用抗血清試薬のセットは高価であるために地方衛生研究所などの検査現場で揃えることは経済的に難しい。国内メーカーからも抗血清試薬は販売されているが主要な 50 種類に限られている。また血清学的な凝集反応試験は、菌株によって交差反応や非特異的凝集、不凝集などが起こることも知られており、その不鮮明さや煩雑性の解消が課題となっている。

O 抗原の合成に関わる遺伝子（10 から 20 個程度）は染色体上の特定遺伝子座にクラスター（O 抗原合成遺伝子領域）を形成している。この領域における比較解析から、O 血清群の違い

により糖転移や糖鎖輸送に関わる遺伝子の相同性がオーソログ間で大きく異なることが知られている。近年ではこれら塩基配列の多様性を利用した、それぞれのO血清群を特異的に判定できる遺伝学的手法（PCR法、リアルタイムPCR法、ハイブリダイゼーション法など）が開発されている。しかしそれら手法の多くは病原大腸菌に関連性の高い一部のO血清群のみを標的としたものであり、現在のところ稀なO血清群をカバーした網羅的な判定手法は存在しない。本研究では大腸菌のO血清群を網羅的に判定できる遺伝学的な検査法の開発および実用化を目指した。前年度までの研究で①大腸菌全血清群からのO抗原合成遺伝子領域塩基配列情報の収集と比較解析、②特異的PCRプライマーのデザイン、③マルチプレックスPCR-検査系（*E. coli* O-genotyping PCR：Og-typing PCR）の構築、④参考株を用いた開発手法の特異性評価、を行った。本年度は、野生株を用いてOg-typing PCRを行い、O血清群とOg-type間に見られる対応の評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 大腸菌野生株

ヒトや家畜から分離された野生株690株を使用した（表2）。551株は国内分離株を使用し、139株はSSI由来大腸菌コレクションを使用した。O血清群の判定にはオートクレーブ処理した菌体を抗原として用い、マイクロタイプレート上で抗血清との凝集を観察した。SSIが販売する*E. coli* Oプール抗血清（AA～XX、計23種類）でスクリーニングを行い、凝集が確認されたものはそのプールに含まれる個別抗血清〔*E. coli* O個別抗血清（O1～O187、計184種類）〕を用いてO血清群を判定した。全プール抗血清で凝集が確認されなかったもの、個別抗血清で凝集がなかったものおよび個別抗血清で2種類以上にほぼ同等の力価で凝集したものはO血清群判定不能（OUT）とした。

PCRに供したDNAはWizard Genomic DNA purification kitで精製し、10ng/μlに調整して用いた。

国内分離株は以下の機関より分与されたものを使用した：大阪府立公衆衛生研究所、沖縄県衛生環境研究所、神奈川県衛生研究所、北九州市環境科学研究所、さいたま市健康科学センター、愛媛県立衛生環境研究所、横浜市衛生研究所、岡崎市保健所、岡山県環境保健センター、岩手県環境保健研究センター、岐阜県保健環境研究所、宮崎県衛生環境研究所、宮城県

保健環境センター、熊本県保健環境科学研究所、熊本市環境総合センター、広島県立総合技術研究所保健環境センター、香川県環境保健研究センター、佐賀県衛生薬業センター、埼玉県衛生研究所、三重県保健環境研究所、山口県環境保健センター、滋賀県衛生科学センター、鹿児島県環境保健センター、新潟県保健環境科学研究所、新潟市衛生環境研究所、神戸市環境保健研究所、青森県環境保健センター、静岡県環境衛生科学研究所、静岡市環境保健研究所、石川県保健環境センター、仙台市衛生研究所、千葉県衛生研究所、千葉市環境保健研究所、川崎市健康安全研究所、相模原市衛生試験所、大阪市立環境科学研究所、大分県衛生環境研究センター、長崎県環境保健研究センター、長野県環境保全研究所、島根県保健環境科学研究所、東大阪市環境衛生検査センター、徳島県立保健製薬環境センター、奈良県保健研究センター、姫路市環境衛生研究所、富山県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、福島県衛生研究所、北海道立衛生研究所、和歌山県環境衛生研究センター、大阪市立大学、宮崎大学医学部附属病院、川崎市立井田病院、日本微生物研究所、以上55機関。

### 2. Og-typing PCR

昨年度までの研究で、個別のO血清群が判定出来る147種類のプライマーセットと、35種類のO血清群からなるO抗原合成遺伝子領域が相同な（または酷似している）15グループを判定できる15種類のプライマーセットを開発した。Og-typing PCRは、これら計162種類のプライマーセットを含む20のマルチプレックスPCR反応系で構成されている。それぞれのマルチプレックスPCRには6から9種類のプライマーセットが含まれており、各反応系内のPCR増幅産物サイズが明らかに異なることから、電気泳動後のゲル上でそのタイプ（O-genotype：Og-type）が判定できる。プライマーの配列や反応条件などの詳細については本研究の「H24～H26総合報告書」を参考にされたい。

Og-typing PCR法を用いて、供試菌株のOg-typeを決定し、O血清群判定結果との対応を確認した。全20種類のマルチプレックスPCRによってもPCR産物が得られないものはOgUT（O-genotype untypeable）と判定した。

倫理面への配慮 該当しない

## C. 研究結果

### 1. O血清群との対応評価

O17、O18ab、O20、O32、O46、O60、O90、O97、O170を除く全てのO血清群に分布する野生株579株およびOUTと判定された111株を用いて全マルチプレックスPCRによりOg-typeを判定した。(表1)。579株のうち523株でO血清群とOg-typeの判定結果が一致した。一方で9種類のO血清群に属する13株ではO血清群とOg-typeの結果が一致しなかった(表2)。4種類のO血清群に属する5株では各株から2種類のOg-typeが確認された(表3)。さらに20種類のO血清群に属する38株ではOgUTと判定された(表4)。

O血清群とOg-typeの結果が一致しなかった13株について、Og-typeの結果に対応した個別抗血清で凝集性を確認したところ、10株で凝集が確認された(表9)。2種類のOg-typeが確認された5株では、一方のOg-typeがO血清群と一致したのに対し、もう一方のOg-typeに対応した個別抗血清では凝集性が確認されなかった(表3)。

### 2. OUT株のOg-type判定

OUTと判定された111株のうち、77株では37種類のOg-typeに判定され、1株では2種類のOg-type(Og23/OgGp10)が確認された(表5)。残る33株では何れのOg-typeにも判定されなかった。Og-typeが特定されたOUT株の一部を用いた詳細な凝集試験では、Og115と判定された菌株ではO109とO115、Og133と判定された菌株ではO19とO133、Og182と判定された菌株ではO109とO182など、2種類の抗血清がほぼ同等に凝集して判定不能となるケースがあった。また単一のOgGp内に含まれる関連O血清群〔O18abとO18ac(OgGp12)、O46とO134(OgGp6)など〕でもほぼ同等に凝集して血清学的な判定が困難であることがわかった(データ省略)。

## D. 考察

本研究で開発したOg-typing PCRは野生株を用いた評価により高い実用性も確認された。一方で、一部の菌株(13/579)ではO血清群とOg-typeの結果が不一致となった。不一致となった菌株の多くはOg-typeに対応した抗血清でも凝集することから、Og-typeに対応したO抗原を発現しているが、それ以外の表層抗原がOg-typeと対応しない抗血清とより強く凝集した結果、不一致になったと予想された。

2種類のクラスターが直列してO抗原合成遺

伝子領域の遺伝子座に存在するケースが08参考株で確認されている(Iguchi A et al. DNA Res in press)。また、他の遺伝子座に挿入する莢膜合成遺伝子クラスターにはwzx/wzyまたはwzm/wztのホモログが含まれている(Corbett D and Roberts IS Adv Appl Microbiol 2008)。このように第二の糖鎖合成遺伝子クラスターの存在が、2種類のOg-typeが確認された原因となっているかもしれない。

本研究ではいずれのOg-typeにも判定できない菌株が確認された(38/579)。ETEC 362株のゲノム情報とwzx/wzyおよびwzm/wztの配列セットを用いた*in silico*でのOg-typing解析により、wzx/wzyとwzm/wztは同一O血清群内では高度に保存されていることが示されている(von Mentzer A et al. Nat Genet 2014)。一方で、同一O血清群であっても全く異なる(たまた配列的に多様化した)O抗原合成遺伝子領域を保有するケースも報告されており(Plainvert C et al. J Bacteriol 2007)、配列的な多様性がOg-typing PCRでの判定不能に影響している可能性が示唆された。今後の更なるゲノム解析により、Og-typeが不能であった原因が明らかになると考えられた。

実験室内での継代などの操作中にO抗原合成遺伝子領域上に変異が加わり、O抗原の発現が失われることがある。また本研究でも見られたように、抗血清による交差反応がO血清群の判定を困難にするケースもある。Og-typing PCRはそのような血清学的判定に伴う見落としや誤判定のリスクに影響されないことから、分離菌株の細分類において有効な手法であると考えられた。

上記ETECの研究では、少なくとも10種類の新規Og-typeが確認されている。さらに、まだ規定されていない新規O血清群の存在も予想される。本研究で収集したO1からO187までのO抗原合成遺伝子領域のゲノム情報は、新規Og-typeの規定やそれらの検出法開発においても重要な基盤になると考えられた。

## E. 結論

本研究で開発したO-typing PCRは、ほぼ全ての大腸菌O血清群を遺伝学的に判定できる手法である。大腸菌全O血清群参考株を用いた特異性の評価に加え、野生株を用いた評価においてもその実用性が示された。本手法は、分離菌株のO血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有

用であると考えられた。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. DNA Research 22:101-107 (2015)
- 2) von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling Å, Dougan G. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) clades with long-term global distribution. Nature Genetics 46:1321-1326 (2014)
- 3) Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N. Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. Journal of Food Protection 77:1269-1274 (2014)

2. 学会発表

- 1) 井口 純、細菌ゲノム研究のフロンティア、第7回日本暖地畜産学会 2014. 10. 26 (宮崎市-宮崎観光ホテル)
- 2) 井口 純、秋吉 充子、吉崎 美和、EHEC 検出・分類マルチプレックス PCR キットの開発と評価、第35回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市-大阪府立大学)
- 3) 秋吉 充子、加藤 結子、中村 寛海、井口 純、O血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第35回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市-大阪府立大学)
- 4) 加藤 結子、大島 律子、河合 央博、西本 清仁、佐々木 麻里、成松 浩志、秋吉 充子、中嶋 洋、緒方 喜久代、伊豫田 淳、石原 朋子、大西 真、井口 純、

ウシ由来 STEC の O-genotype を含めた遺伝学的特徴解析、第35回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市-大阪府立大学)

- 5) 井口 純、中村 寛海、O血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2014. 7. 15-16 (京都市-同志社大学)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願特許

発明の名称：PCR法を用いた大腸菌の広域 O 血清群判定方法、出願日：2014年3月28日、出願番号：PCT/JP2014/059097、発明者：井口純、出願人：国立大学法人宮崎大学



表 1. 本研究で使用した野生株の O 血清群別リスト

株数	O 血清群 <sup>a</sup>
1	O9, O11, O22, O24, O28ab, O29, O30 <sup>d</sup> , O34, O37, O41 <sup>c</sup> , O43, O52, O53, O61, O62, O65, O66, O68, O70 <sup>c</sup> , O71, O81, O82, O85, O105, O108, O112ab, O112ac, O123, O129, O135, O139, O152, O167, O171, O179, O182, O185
2	O3, O10, O12, O13 <sup>b</sup> , O14 <sup>c</sup> , O23 <sup>c</sup> , O25, O27, O33, O35, O42, O45, O48, O50 <sup>b</sup> , O54, O56, O57 <sup>c</sup> , O58, O59, O63, O69, O77, O78, O80, O83, O84, O88, O89, O93, O95, O96, O98, O99, O110, O114, O116, O117, O132, O133, O134, O137, O138, O140 <sup>c</sup> , O142, O143, O144, O147, O148, O149, O151, O154, O155 <sup>d</sup> , O158, O162, O164, O166, O169, O173 <sup>b</sup> , O177, O180, O181
3	O4, O7, O15, O21, O38, O40 <sup>c</sup> , O64 <sup>c</sup> , O74 <sup>d</sup> , O76, O79 <sup>c</sup> , O87 <sup>c</sup> , O100, O106, O120, O124 <sup>b</sup> , O125, O127, O130, O136, O159, O161, O163, O168, O187 <sup>c</sup>
4	O1 <sup>c</sup> , O6, O18ac, O16, O19 <sup>b,c</sup> , O44, O49, O73, O75, O102, O104 <sup>c</sup> , O107, O119, O131, O150, O153 <sup>b,c</sup> , O160, O178, O184 <sup>c</sup>
5	O5, O28ac, O51, O55, O109 <sup>b</sup> , O115, O118, O126, O146, O172 <sup>c</sup> , O176, O186
6	O36 <sup>b,c</sup> , O39 <sup>c</sup> , O92, O174, O175
7	O2 <sup>c</sup> , O128
8	O8, O26, O86, O101 <sup>d</sup> , O156
9	O113, O141 <sup>b,c</sup>
≥ 10 <sup>e</sup>	O91(13), O103(24), O111(16), O121(10), O145(10), O157(14), O165(11), O183(12), OUT(111)

a: 9 種類の O 血清群 (O17, O18ab, O20, O32, O46, O60, O90, O97, O170) を除く全 O 血清群に分布

b: O 血清群と O-type が一致しなかった 9 種類の O 血清群に属する 13 株 (詳細は表 2 参照)

c: 何れの O-type にも判定されなかった 20 種類の O 血清群に属する 38 株 (詳細は表 3 参照)

d: 2 種類の O-type が確認された 4 種類の O 血清群に属する 5 株 (詳細は表 4 参照)

e: ()内は供試菌株数を示す

表 2. O 血清群と O-genotype が一致しなかった菌株のリスト

株名	O 血清群	O-genotype	個別抗血清による凝集試験の結果
1002-44	O13	OgGp9 <sup>a</sup>	O17 (-), O44 (-), O73 (-), O77 (-), O106 (-)
120784	O19	Og69	O69 (+)
NBK#1760	O36	Og43	O43 (+)
081050	O36	Og43	O43 (+)
081051	O36	Og43	O43 (+)
C831-10	O50	OgGp10 <sup>b</sup>	O13 (+), O129 (-), O135 (-)
OC-32	O109	Og182	O182 (+)
OC-35	O109	Og182	O182 (+)
NBK#1660	O124	Og8	O8 (-)
NBK#527	O141	Og8	O8 (+)
130518	O141	Og8	O8 (+)
NBK#63	O153	Og91	O91 (-)
C610-08	O173	Og152	O152 (+)

a: OgGp9 は O17, O44, O73, O77, O106 の O 血清群に関連

b: OgGp10 は O13, O129, O135 の O 血清群に関連

(+); 凝集有り, (-); 凝集なし

表 3. 2 種類の O-genotype が確認された菌株のリスト

株名	O 血清群	O-genotypes	個別抗血清による凝集試験の結果
NBK#512	O74	Og74 & Og24	O24 (-)
C189-92	O155	Og155 & Og8	O8 (-)
C344-11	O30	Og30 & Og9	O9 (-)
NBK#31	O101	OgGp15 <sup>a</sup> & Og9	O9 (-)
NBK#517	O101	OgGp15 <sup>a</sup> & Og9	O9 (-)

a: OgGp15 は O89, O101, O162 の O 血清群に関連

(+); 凝集有り, (-); 凝集なし

表 4. O-genotype が判定できなかった菌株の O 血清群分布

株数	O 血清群
5	O141
4	O172
3	O1, O39, O79, O153
2	O14 <sup>a</sup> , O19, O57 <sup>a</sup>
1	O2, O23, O36, O40, O64, O70, O87, O104, O140, O184, O187

a: 特異的な PCR プライマーなし.

表 5. OUT 株における O-genotype の分布

株数	O-genotype
1	Og1, Og3, Og8, Og9, Og11, Og23, Og25, Og66, Og69, Og76, Og103, Og108, Og111, Og113, Og130, Og133, Og150, Og157, OgGp7, OgGp8, OgGp9, OgGp12, OgGp15, Og23/OgGp10
2	Og109, Og112ab, Og115, Og128, Og161, Og171, Og177
3	Og24, OgGp14
4	OgGp6
6	Og91
7	Og182
8	Og84
9	OgGp10
33	OgUT

OgGp6 は O46 と O134 の O 血清群に関連

OgGp7 は O2 と O50 の O 血清群に関連

OgGp8 は O107 と O117 の O 血清群に関連

OgGp9 は O17, O44, O73, O77, O106 の O 血清群に関連

OgGp10 は O13, O129, O135 の O 血清群に関連

OgGp12 は O18ab と O18ac の O 血清群に関連

OgGp14 は O62 と O68 の O 血清群に関連

OgGp15 は O89, O101, O162 の O 血清群に関連

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究  
分担課題 抗大腸菌抗体検出系の開発に関する研究

研究分担者 勢戸 和子 （大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）  
研究協力者 田口 真澄 （大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）  
原田 哲也 （大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）の感染が疑われる溶血性尿毒症症候群（HUS）患者などの血清について、重症患者からの分離が多いとされている 7 タイプの O 抗原（O157、O26、O111、O103、O121、O145 および O165）に対する抗体価を測定した。17 症例中 15 症例は O157 抗体陽性、1 症例は O111 抗体陽性で、陽性と判定された抗原以外に疑陽性を示した検体もあったが、非特異反応であると推察された。また、ウシ直腸便の下痢原性大腸菌保有調査から、ウシの EHEC 保菌率は高く、分離株を精査してヒトへの病原性を評価する必要があると考えられた。

A. 研究目的

国立感染症研究所の集計によると、腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症において、最も分離株数の多い O157 に加えて、O26 や O111、O103、O121、O145、O165 についても血便や溶血性尿毒症症候群（HUS）を呈した重症患者からの分離が多いとされている。昨年度の本研究で、上記の 7 タイプの抗原に対する抗体価測定のさかのぼり調査を実施したところ、HUS 患者で O121 または O165 に対する抗体陽性の症例が明らかになった。また、すでに O157 抗体陽性と診断された症例で、O157 以外の抗原に対しても抗体陽性と判定された症例が見られた。そこで、さらに症例数を増やして、重症患者の O157 以外の抗原に対する抗体価を測定した。

また、主要な EHEC 保菌動物であるウシについて、下痢原性大腸菌の保有状況を調査した。

B. 研究方法

1. 血清

診断のため O 抗原凝集抗体価測定を依頼され、その後匿名化して保存していた血清を使用した。

2. O 抗原凝集抗体価測定法

抗原液は、当所保存の EHEC O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165 を用い、「EHEC 検査・診断マニュアル」（国立感染症研究所ホームページ）の方法で作製した。非働化した血清を PBS で 2 倍階段希釈して抗原液と等量

(0.2ml) 混合し、50°Cで一夜反応させた後、凝集の有無を確認した。抗体価は凝集を示した血清の最高希釈倍数で示し、160 倍以上を陽性、40～80 倍を疑陽性、20 倍以下を陰性と判定した。

### 3. ウシの下痢原性大腸菌保有調査

シードスワブで採取したウシ直腸便を XM-G 寒天培地 (XM-G, 日水製薬) および Cefixime Tellurite supplement (CT, OXOID) を加えたラムノース・マッコンキー寒天培地 (CT-RMAC) に塗抹し、37°Cで一夜培養した。増菌培養には、Universal Preenrichment Broth (UPB, BD) を使用し、42°Cで 20 時間培養後 10 $\mu$ L ずつ XM-G および CT-ソルビトール・マッコンキー寒天培地 (CT-SMAC) に塗抹した。

分離培地の濃厚発育部位をかき取ってテンプレートを作製し、既報 (川津ら, 微生物の簡易迅速検査法, 2013) の Multiplex PCR で下痢原性大腸菌の主な病原性関連遺伝子を検出した (sweep PCR)。EHEC の分離は、志賀毒素遺伝子 (*stx*) 陽性の平板から大腸菌と考えられるコロニーを最大 32 コロニー画線培養し、PCR を繰り返して *stx* 陽性株を選択後、TSI 寒天培地 (栄研化学)、LIM 培地 (栄研化学) および CLIG 培地 (極東製薬) で性状を確認して EHEC と同定した。

### 倫理面への配慮

保存血清は、採血時に診断以外の目的で使用することについて同意を得ていないが、新しい診断法が開発された場合の評価や新規の病原体が報告された際の「さかのぼり調査」に使用するため保存することを、当所倫理審査委員会に申請し承認されている。

## C. 研究結果

### 1. O 抗原凝集抗体価の測定

保存血清と 2014 年に測定依頼のあった患者の計 17 症例 42 検体について、抗体価を測定した。いずれの症例も便の培養検査で EHEC は分離されなかった。HUS 患者 15 症例は、全症例で O157 抗体価が 160～2560 倍以上を示し、陽性と判定された (表 1)。病日の明らかな 14 症例 37 検体の抗体価の平均値をグラフにしたところ、第 5 病日から第 12 病日の血清で 160 倍以上を示していた (図 1)。O157 以外の抗原については、6 症例で疑陽性を示した抗原があり、このうち 4 タイプの抗原に対して疑陽性を示した症例は、第 4、第 5 病日の血清では O157 抗体のみが陽性、それ以外の抗原に対しては 20 倍以下であったが、第 6 病日の血清では O157 抗体価が 2560 倍、O111、O103、O121 および O165 に対して 40～80 倍を示した (表 2)。HUS 非発症患者については、1 症例は O111 抗体陽性 (抗体価 1280 倍) で、O157 および O103 抗体が疑陽性であったが、もう 1 症例はすべての抗原液に対して 20 倍以下であった。

### 2. ウシ糞便からの EHEC 分離

ウシ糞便 50 検体の sweep PCR の結果、*stx1* または *stx2* が陽性を示した検体は、直接培養の CT-RMAC で 20 検体、XM-G で 35 検体、増菌培養の CT-SMAC で 26 検体、XM-G で 44 検体であった。*eae*、*cdt*、STp 遺伝子陽性検体もあったが、*aggR*、LT 遺伝子、STh 遺伝子は陰性であった。

精査の結果 EHEC が分離された検体は、合計 41 検体 (82%) であった。O 抗原型や毒素遺伝子のサブタイプは決定できていないが、少なくとも 18 検体で毒素型や性状の異なる複数の EHEC が分離された。

#### D. 考察

昨年度に引き続き抗体価のさかのぼり調査を実施したが、保存期間の比較的短い血清を対象にしたところ、依頼時に O157 抗体陽性と判定された症例が中心になった。HUS 患者 15 症例については、O157 以外の抗原に陽性となった検体はみられず、疑陽性域を示した検体では、O157 抗体価が高いことから、大腸菌の共通抗原に対する非特異的な反応であると推察され、O111 抗体陽性患者の疑陽性判定についても同様であると考えられた。また、O157 抗体価の推移については、第 5 病日以降に陽性域に上昇することが確認された。

HUS 非発症患者でいずれの抗原に対しても陰性であった症例は、発熱、下痢、嘔吐、血尿、腎機能低下を呈した 9 歳男児で、第 6 病日の血清で抗体価の上昇がみられなかった。測定した 7 タイプ以外の抗原に範囲を広げて測定する必要があるが、腹痛がなく、EHEC 以外の原因である可能性も考えられた。

現在抗体価測定の対象にしている 7 タイプのほかに、ヒトへの感染リスクをもつ EHEC の保菌状況を調べるため、昨年に引き続きウシ直腸便の培養検査を実施した。検体採取時期が 11 月と EHEC 感染症の流行期を過ぎていたが、82%と高い保菌率を示していた。CT-RMAC/SMAC あるいは XM-G のどちらかのみで分離された株も多く、ウシの保有する EHEC を調査するには、選択性の異なる培地を併用することが必要である。分離株の血清型や毒死遺伝子のサブタイプ、付着関連遺伝子などを精査し、ヒトへの病原性についてリスク評価を行いたい。

#### E. 結論

EHEC 感染が疑われる 17 症例について、7 タイプの O 抗原に対する抗体価を測定し、15

症例で O157 抗体、1 症例で O111 抗体が陽性と判定された。陽性と判定された抗原以外に疑陽性を示した症例もあったが、大腸菌の共通抗原に対する非特異反応であると推察された。

ウシ直腸便の EHEC 保菌率は高く、分離株についてヒトへの病原性について精査する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Iyoda S, Manning SD, Seto K, Kimata K, Isobe J, Etoh Y, Ichihara S, Migita Y, Ogata K, Honda M, Kubota T, Kawano K, Matsumoto K, Kudaka J, Asai N, Yabata J, Tominaga K, Terajima J, Morita-Ishihara T, Izumiya H, Ogura Y, Saitoh T, Iguchi A, Kobayashi H, Hara-Kudo Y, Ohnishi M, EHEC working group in Japan: Phylogenetic clades 6 and 8 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with particular *stx* subtypes are more frequently found in isolates from hemolytic uremic syndrome patients than from asymptomatic carriers. Open Forum Infectious Disease 2014, 1.

##### 2. 学会発表

勢戸和子, 田口真澄: 腸管出血性大腸菌感染症における non-O157 抗体価のさかのぼり調査. 第 88 回日本細菌学会総会 (2015 年 3 月, 岐阜)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 大腸菌 O 抗原凝集抗体の判定結果

HUS	症例数	抗体陽性(疑陽性)症例数						
		O157	O26	O111	O103	O121	O145	O165
発症	15	15	0 (1)	0 (4) <sup>a</sup>	0 (1)	0 (1)	0	0 (2)
非発症	2	0 (1)	0	1	0 (1)	0	0	0

a 1症例はO111, O103, O121, O165抗体疑陽性(表2)

表 2 4タイプ抗原に疑陽性を示した症例の抗体価測定結果

病日	抗体価						
	O157	O26	O111	O103	O121	O145	O165
4	640	<20	<20	<20	<20	<20	<20
5	1280	<20	<20	<20	<20	<20	<20
6	2560	<20	40	40	40	<20	80

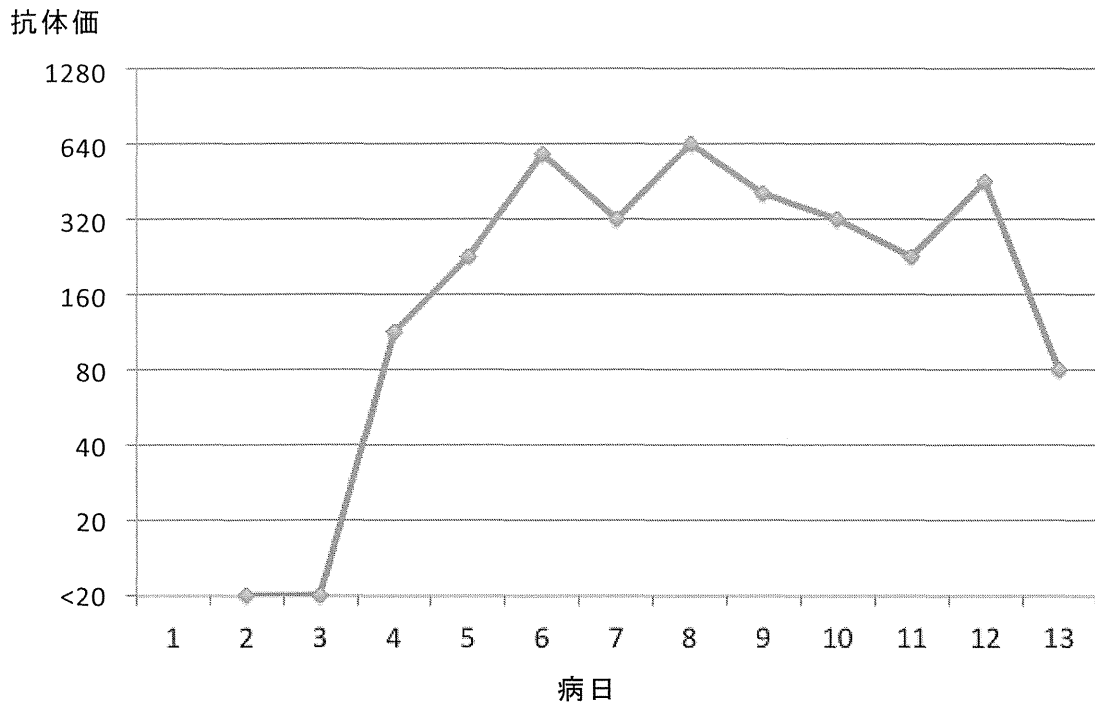


図 1 病日ごとの O157 抗体価の推移

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究  
分担課題 non-O157 EHEC のゲノム配列決定

研究分担者 林 哲也 （宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授）  
研究協力者 小椋 義俊 （宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教）  
研究協力者 大岡 唯祐 （宮崎大学・医学部・助教）

## 研究要旨

代表的な腸管出血性大腸菌（EHEC）は O157 であるが、EHEC には O157 以外にも様々な血清型を有する菌株（non-O157 EHEC）が存在する。これらは、基本的には O157 EHEC と同様の病原性を有すると考えられ、行政的にも O157 と同様に扱われるが、基礎的研究や分子疫学解析などの幅広い研究を推進するために必要な全ゲノム情報の整備が遅れている。本研究では、まだ全ゲノム情報が整備されていない non-O157 EHEC の全ゲノム配列を決定し、そのゲノム情報基盤を整備することを目標とする。Shiga toxin（Stx）産生株が存在することが最近明らかになった *Escherichia albertii* も解析対象に含める。本年度は、昨年度までに全長ゲノム配列を決定した 3 種類の non-O157 EHEC（O121:H19, O145:HUT, O165:H-）のアノテーションを終了した。また、各血清型の国内分離株・欧州分離株を追加収集するとともに（61, 42, 41 株）、そのドラフトゲノム配列を取得し、Stx2 産生量の測定を行った。さらに、O115:H10/H-の国内分離株 21 株のドラフトゲノム配列を取得した。一方、初年度の解析でヒトでの集団感染を起こしうる腸管病原体であることが明らかとなった *E. albertii* に関しては、昨年度までに取得した 4 株（1 株は Stx2f 産生株）の完全長配列と 25 株（Stx2f 産生株を 1 株含む）のドラフトゲノム配列に関して、菌種内ゲノム比較解析及び全ゲノム配列が決定されている大腸菌及び *Escherichia fergusonii* との属内での菌種間ゲノム比較解析を行った（昨年度からの継続）。その結果、本菌種のコアゲノム、遺伝的特性、大腸菌との相違点や本菌が保有する病原遺伝子群等に加え、*Escherichia* 属 3 種（*E. albertii*, 大腸菌, *E. fergusonii*）のコアゲノムが明らかになった。また、比較ゲノム解析情報を基に、本菌を特異的に検出できる nested PCR 系を作成した。

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 以下 EHEC）としては O157 の血清型をもつ菌株が代表的であり、患者から分離される頻度が最も高い。しかし、EHEC には O157 以外にも様々な血清型を有する菌株（non-O157 EHEC）が存在する。それらは、基本的には O157 EHEC と同

様の病原性を有すると考えられ、我が国の感染症法でも O157 EHEC と区別無く扱われている（3 類感染症）。2011 年に富山県を中心に発生した O111 EHEC による集団感染や、ほぼ同時期にドイツを中心に発生した O104 による大規模な集団感染の発生により、non-O157 EHEC の危険性、さらにはこれらの菌株に対する基礎研究の推進や



種々の対策の必要性が再認識されることとなった。

non-O157 EHEC に関して、病原性の分子機構などに関する基礎的研究から分子疫学解析などに至るまで、様々な角度から幅広い研究を進めていくためには、non-O157 EHEC の遺伝学的特性を十分に理解することが必要である。そのためには、全ゲノム配列の決定と配列解析を行うことにより全ゲノム情報を整備し、種々に解析のための情報基盤を確立しなければならない。

O157 EHEC に関しては、2001年に我々のグループにより O157:H7 Sakai 株の全ゲノム配列が決定された。また同年に米国のグループにより一部不完全ではあるが O157:H7 EDL933 株のゲノム配列も決定された。これらは、その後の O157 EHEC 研究の重要な情報基盤となり、様々な研究の推進に貢献している。また、最近になって、米国の‘Spinach Outbreak’ 関連株 2 株などの全ゲノム配列も決定されている。

一方、non-O157 EHEC に関しては、2009年に我々のグループが non-O157 EHEC の中で最も分離頻度の高い O26:H11, O111:H-, O103:H2 の全ゲノム配列 (各 1 株) を決定している。しかし、海外では重要な non-O157 EHEC とされ、我が国でもその分離頻度が上記の 3 血清型に次いで上位にある O121 や O145 等については、未だにレファランスとなる全ゲノム情報が存在しないのが現状である (ただし、O145 については、昨年度末に米国株のゲノム配列が報告された)。その 1 つの要因としては、次世代シーケンサ (NGS) の登場によってゲノム配列のスピードやコストは大幅に向上しているものの、フィニッシング技術の進歩は遅れており、完全長配列の決定には多大な労力と経験・技術を要することが挙げられる。

本研究では、まだ全ゲノム情報が整備されていない non-O157 EHEC の全ゲノム配列を決定して、その基本的な配列解析 (遺伝子のアノテーション等) を行い、さらに数 10 株のドラフトゲノム配列を取得して比較ゲノム解析を行うことにより、各 non-O157 EHEC のゲノム情報基盤を整備することを

目標とする。一方、最近の我々の研究によって、大腸菌の近縁種で新興腸管病原菌である *Escherichia albertii* の中でも、EHEC の最も主要な病原因子である Shiga toxin (Stx) を産生する株が存在することが明らかになった。このことは、*E. albertii* も EHEC と同様な潜在的病原性をもつ可能性があることを示唆しており、*E. albertii* に対する行政的な対応を明確にしていく必要があることから、*E. albertii* のゲノム解析も合わせて実施する。

## B. 研究方法

① 解析対象：最初の解析対象として、3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) から 1 株ずつを選定した。O121:H19 は神奈川で分離された HUS 患者由来株 (*stx1*-/*stx2a*+), O145:HUT は宮崎で分離された血便患者由来株 (*stx1*+/*stx2a*+), O165:H- は山形で分離された HUS 患者由来株 (*stx1*-/*stx2a*+/*stx2c*+) である。また、比較解析のためのドラフト解析対象株として、O121:H19 は 61 株 (5 株はベルギー株)、O145:HUT は 55 株 (13 株はベルギー株)、O165:H- は 41 株 (3 株はベルギー株) を収集した (括弧内の数字は、昨年度までの収集分に今年度収集分を加えた数字である)。また、O115:H10/H- については、感染研・伊豫田博士より 21 株 (国内分離株) の分与を受けた。

*E. albertii* に関しては、先行研究で MLST 解析の結果から *E. albertii* であることが確認できている菌株 (国外株や動物由来株も含む) の中から、4 株 (2 株は下痢患者由来株、1 株はトリ由来株、1 株は下痢患者由来の Stx2f 産生株; 最初の下痢患者由来 2 株のうち 1 株はドイツ分離株で、他は国内分離菌株) を選定し、完全長ゲノム配列決定の対象とした。さらに、25 株 (1 株は Stx2f 産生株) についてはドラフトゲノム配列解析の対象とした。

② ドラフトゲノム解析：菌の培養と DNA の抽出は定法に従って行った。QIAGEN 社のカラムを用いて DNA 精製を行った後、DNA の断片化を行い、Illumina MiSeq 用の

ライブラリーを作成した。ライブラリー作成 (shotgun library と mate end library) およびNGSを用いたシーケンス作業は、Illuminaのプロトコールに従って行った。Illumina MiSeq からの配列データのアッセムブリに関しては、東京工業大の伊藤博士らと共に新たに開発した *platanus* を使用した。

完全長ゲノム配列決定の基本的パイプラインについては昨年度の報告書に記載したため、割愛する。

③ 配列解析：オートアノテーション等の基本的な配列解析には MiGAP および IMC-ge ソフトウェアを用いた。相同性解析には各種の *blast* プログラム、また *genome synteny* の解析や相同領域の可視化等には *GenomeMatcher* 等のプログラムを用いた。

④ STx2 の定量系：感染研・伊豫田博士らの確立した ELISA 法に準じた。

#### 倫理面への配慮

全ての実験について、「宮崎大学病原体等安全管理規定」および「宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に則り、宮崎大学病原体等安全管理委員会および宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を受けた後に実施した。

#### C. D. 研究結果と考察

##### ① non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の完全長ゲノム配列の決定と配列解析：

昨年度までに、O121:H19, O145:HUT, O165:H-の完全長ゲノム配列決定が終了している (K-12 株と O157, O26, O111, O103 EHEC に比較から見たゲノム特性は昨年度の報告書に記載)。今年度、アノテーションが終了し、プロフェージ、IS 種類やコピー数も確定した。その結果、いずれの菌株の染色体上にも、O157, O26, O111, O103 と同様に多数のプロフェージが存在し、これが大腸菌としては比較的サイズの大きな染色体をもつことに大きく寄与していることが最終的に確認された。

Stx フェージについては、昨年度に引き続いて、O157, O26, O111, O103 EHEC の Stx

フェージを含めた比較解析を進めた。その結果、最終的に以下の点が明らかになった。

(i) O145 の Stx1 フェージは O157, O26, O111, O103 EHEC のものと同様にプロトタイプラムダに近いラムダ様フェージである。

(ii) O145 の Stx2a フェージ、O165 の Stx2a フェージ、O165 の Stx2c フェージは上記の Stx1 フェージと同様に、プロトタイプラムダに近いラムダ様フェージである。

(iii) O121 の Stx2a フェージは O157 の Stx2a フェージと同様に short tail フェージである。

LEE 領域についても同様の解析を行い、(i) コア領域の保存性は非常に高いこと、(ii) いずれも比較的小さな accessory 領域をもつこと、(iii) O145 の LEE は *selC* tRNA 遺伝子に、O121 と O165 の LEE が *pheV* tRNA 遺伝子に挿入されていることを確認した。また、LEE がコードする 3 型分泌機構 (T3SS) によって分泌されるエフェクターに関しては、いずれの non-O157 EHEC 菌株においても (i) O157, O26, O111, O103 EHEC と同様に多数の non LEE エフェクターをもつこと、(ii) 多くの non-LEE エフェクターはラムダ様フェージにコードされていること、(iii) エフェクターのレパートリーも O157, O26, O111, O103 EHEC と良く似ていることを確認した。

プラスミドについては、(i) いずれの菌株にも大型の病原プラスミドが存在しており、O157, O26, O111, O103 の病原プラスミドと類似した病原遺伝子セットをコードしていること、(ii) O145 の病原プラスミドが O26 のものと極めて良く似ており、両血清型間で伝達されたと考えられることが明らかになった。

##### ② non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-, O115:H10/H-) のドラフトゲノム配列を用いた血清型内比較解析：

研究方法の項に記載したように、各血清型において、21~61 株の国内・海外分離株を収集し、ドラフト配列を取得した。これらのドラフト配列を用いて高精度系統解析を実施するとともに、Stx フェージの挿入部位の決定、各菌の Stx2 産生量の測定を行った。Stx フェージの挿入部位の決定は、まだ

解析中の段階にあるが、高精度系統解析からは、以下の所見が得られている（図1，図2，図3，図4参照）。

(i) O145 の Stx1 と Stx 2a フェージの分布は、O145 内での各亜系統の分離と相関する。また、挿入部位は亜系統によって異なり、フェージのタイプについてもバリエーションがある可能性が高い（解析中）。さらに、Stx2c のみを産生する菌株（1 株）の Stx 産生量が Stx2a レベルにあることを見出した。Stx2c の産生量は一般的に低いとされており、Stx2c 単独産生株は比較的リスクが低いという見方もあることから、本株については、フェージの構造等を含めて、さらに詳細な解析を行う必要がある。

(ii) O121 株に関しては、ベルギー株と国内株が 2 つの亜系統に分かれた。しかし、全ての株で Stx2a フェージが *argW* 遺伝子に挿入されており、Stx2 の産生に関しては非常に良く保存されていると考えられる。この点に関しては、現在、各株の Stx2a フェージのゲノム配列を決定中であり、さらに詳細な情報が得られると期待される。

(iii) O165 においても、全ての株が Stx2a フェージを保有しているが、挿入部位の解析はまだ終了していない。また、Stx1 と Stx2c の分布は、O121 内での各亜系統の分離と相関し、それぞれのフェージについてもバリエーションが存在すると予想される。

(iv) 既知の定着因子が存在しない O115 については、国内で分離される O115 は、大きく系統の異なる 2 つのグループに分かれることが判明した。今後、それぞれのグループで、新規の定着因子の検索等を進める必要がある。なお、重症化率の高い O177 も解析対象とすることを予定していたがまだ解析に至っていない。感染症研究所からの菌株の提供を待って、ゲノム解析を開始する予定である。

### ③ *E. albertii* の解析：

本菌に関しては、昨年度までに、4 株を全ゲノム配列を取得し、25 株の高精度ドラフト配列を取得している。

また、完全長配列を取得した 4 株のうちの 3 株（論文化の都合上、Stx2f 産生株は別途

解析を行うことにしたため、今回は除外）については、遺伝子のアノテーション、フェージ領域や IS エlement 等の同定も終了している（ゲノムサイズ、プラスミド、フェージ等の一般的ゲノム特性については、昨年度の報告書に記載したため割愛）。今年度、昨年度に引き続いて、詳細な菌種内・菌種間でのゲノム配列解析を進めた。また、一部の遺伝子については発現解析を行った。その結果、*E. albertii* のコアゲノム情報（ほぼ全ての菌株に保存されている遺伝子セットなど）を同定し、さらに、コアゲノムの中から、大腸菌でも保存されている遺伝子セットと本菌種に特異的な（大腸菌にはほとんど存在しない）遺伝子セットを同定した。また、*Escherichia* 属 3 種（*E. albertii*, 大腸菌, *E. fergusonii*）のコアゲノム情報を同定した。遺伝子レパートリーから見た本菌の特徴としては、以下の知見が重要である。

(i) 鞭毛の生合成系遺伝子群が完全に保存されているにもかかわらず、走化性に係わる遺伝子群が完全に欠失している。本菌は運動性が無いとされていることから、運動性の確認と電顕での鞭毛観察を行ったがいずれも陰性であった。しかし、遺伝子の発現は RT-PCR で確認できたため、今後、鞭毛の生合成系遺伝子群の遺伝子産物の局在や機能を解析する必要がある。

(ii) 多くの株で、大腸菌で ETT2 と呼ばれる第 2 の T3SS をコードするゲノム領域（大腸菌ではほとんどの株で大きな欠損が生じている）が完全と思われる状態で存在する。また、遺伝子の発現は RT-PCR で確認できた。今後、本菌の病原性メカニズムを理解する上で、その機能を解析する必要がある。

(iii) LEE 領域の構造は良く保存（大腸菌の LEE との比較において）されているだけでなく、EHEC や EPEC と同様に多数の non-LEE がコードされており、エフェクターレパートリーも EHEC や EPEC のものと良く似ている。ただし、EHEC や EPEC と異なり、ラムダ様フェージ上に存在しないものが多い。

(iv) その他、昨年度までの解析で、Stx2f 産

生株のゲノム配列から、Stx2f ファージの全ゲノム配列が決定できており、EHEC の Stx ファージと同様にラムダ様 ファージであること、また細胞膨化致死毒素 (Cytotolethal distending toxin, CDT) 遺伝子もコードしていることも明らかになっている。

以上の知見に加えて、上述の「本菌種に特異的な (大腸菌にはほとんど存在しない) 遺伝子セットを同定」結果を基に、本菌を特異的に検出できる nested PCR 系を作成した。本 PCR は既に本菌による集団感染の特定にも利用されている。さらに、この PCR 系を用いて、本菌の産業動物での保菌状況の解析も進行中であり、ブタや野外飼育のニワトリでの保有が確認できており (一部のサンプルについては菌株の分離についても成功している)、人獣共通感染症としての本菌感染症の位置付けがより明白になったと言える。

#### E. 結論

3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の完全長ゲノム配列の決定とアノテーションが終了し、各菌株の Stx ファージや LEE がコードする T3SS、病原プラスミドの性状等が明らかとなった。また、O115:H10/H-を加えた、4 つの血清型において、21~61 株の国内・海外分離株を収集し、高精度ドラフト配列を取得した。また、*E. albertii* についても 4 株の完全長ゲノム配列の決定とアノテーション等の作業も終了した。さらに、25 株の高精度ドラフト配列を取得し、菌種内ゲノム比較解析及び全ゲノム配列が決定されている大腸菌及び *E. fergusonii* との属内での菌種間ゲノム比較解析を行った。その結果、本菌種のコアゲノム、遺伝的特性、大腸菌との相違点や本菌が保有する病原遺伝子群等に加え、*Escherichia* 属 3 種 (*E. albertii*, 大腸菌, *E. fergusonii*) のコアゲノムが明らかになった。また、比較ゲノム解析情報を基に、本菌を特異的に検出できる nested PCR 系を作成した。

#### F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) N. Sudo, A. Soma, A. Muto, S. Iyoda, M. Suh, N. Kurihara, H. Abe, T. Tobe, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, M. Ohnishi, Y. Sekine: A novel small regulatory RNA accelerates cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60: 44-50, 2014.
- 2) M. Kusumoto, D. Fukamizu, Y. Ogura, E. Yoshida, F. Yamamoto, T. Iwata, T. Ooka, M. Akiba, T. Hayashi: The lineage-specific distribution of IS-excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(4): 1394-1402, 2014.
- 3) A. Hinenoya, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Ooka, T. Hayashi, T. Ramamurthy, S. Faruque and S. Yamasaki: Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. *BMC Microbiology*, 14: 97, 2014.
- 4) R. Kajitani, K. Toshimoto, H. Noguchi, A. Toyoda, Y. Ogura, M. Okuno, M. Yabana, M. Harada, E. Nagayasu, H. Maruyama, Y. Kohara, A. Fujiyama, T. Hayashi, T. Itoh: Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.*, 24(8): 1384-1395, 2014.
- 5) A. Iguchi, S. Iyoda, T. Kikuchi, Y. Ogura, K. Katsura, M. Ohnishi, T. Hayashi, N. R. Thomson: A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.*, 22(1): 101-107, 2015.

##### 2. 学会発表

- 1) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 富永潔, 緒方喜久代, 木全恵子, 前田詠里子, 亀山光博, 成松浩志, 矢端順子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: 全ゲノム系統解析による Stx2 高産生性 O157 系統の同定. 第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/15-16, 2014, 京都.
- 2) Shakhinur Islam Mondal, Y. Ogura, T.