

图 1. O 抗原合成遗传子领域

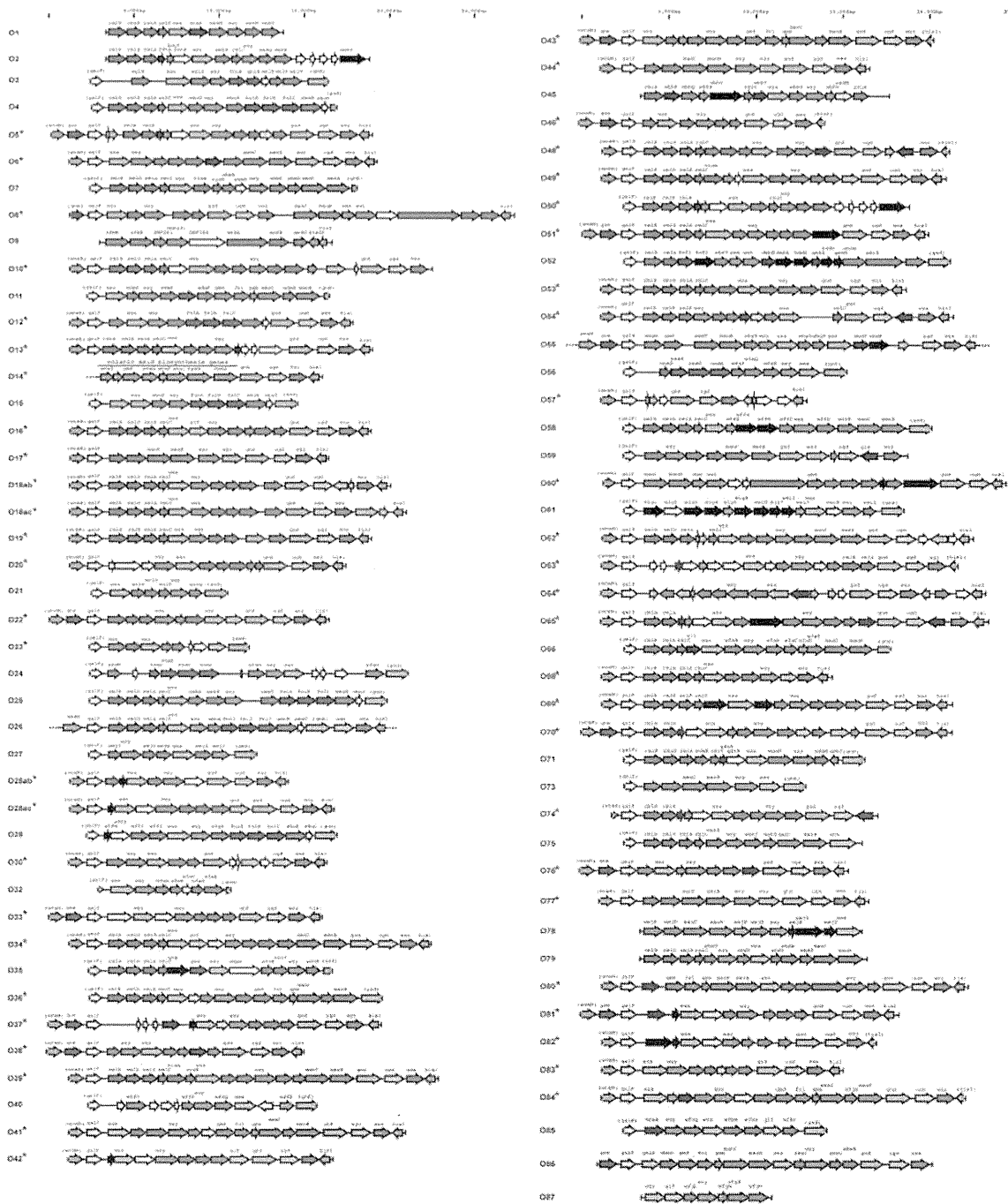


図 1. 0 抗原合成遺伝子領域 (続き)



図 1. O 抗原合成遺伝子領域 (続き)



図2. 相同または類似性の高いO抗原合成遺伝子領域

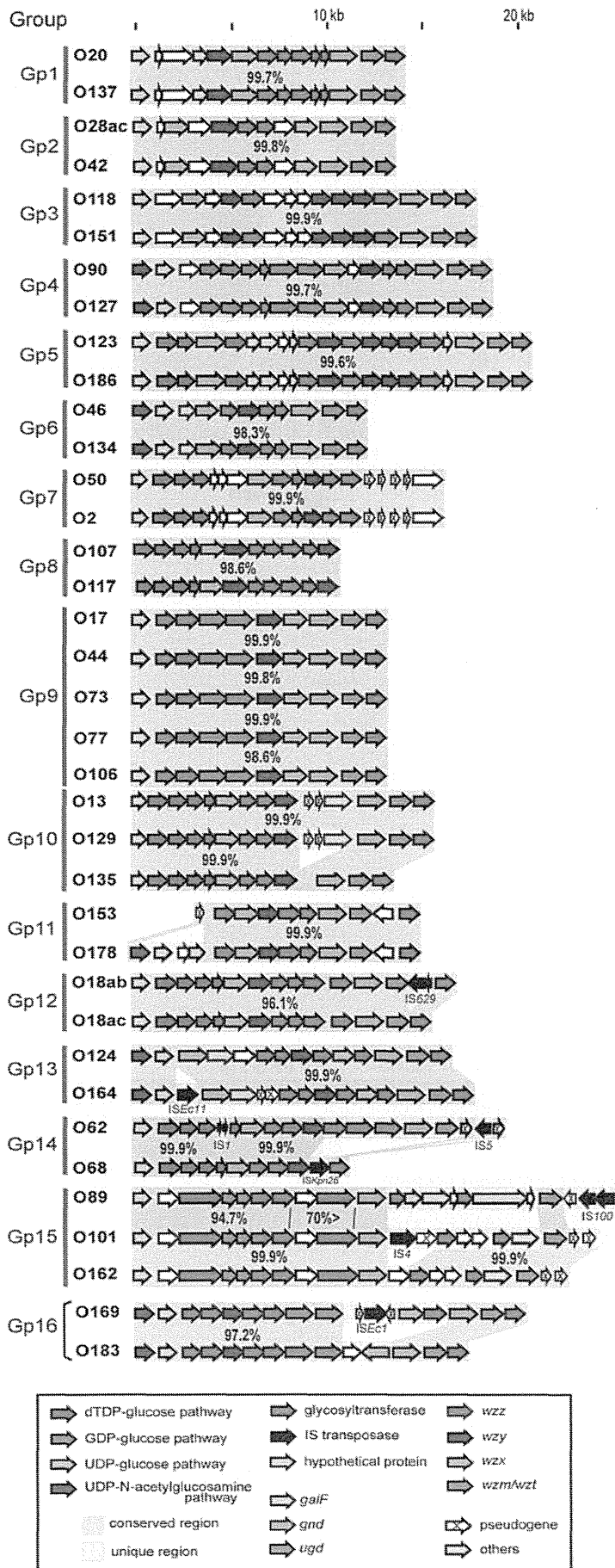
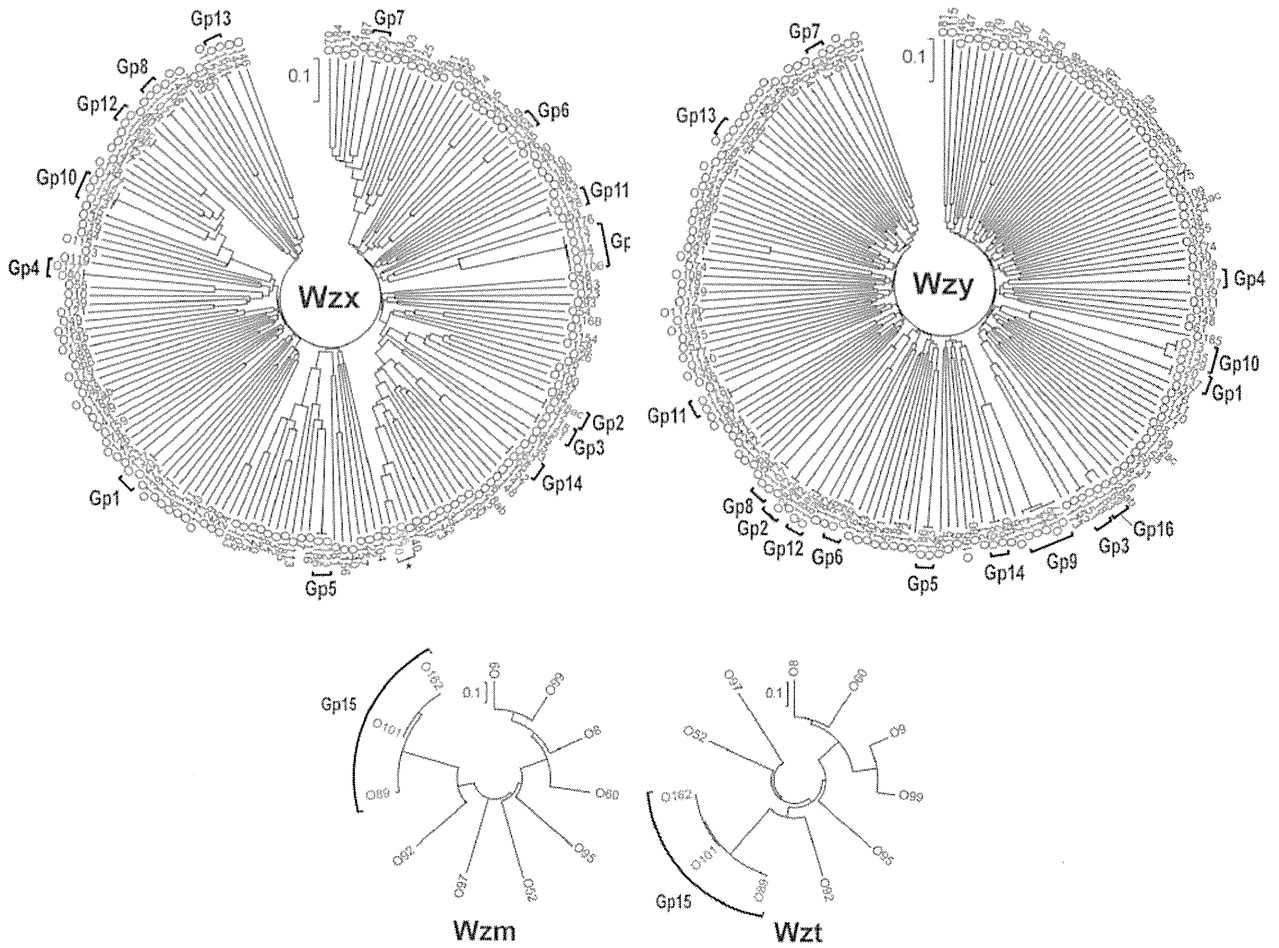


図 3. Wzx/Wzy と Wzm/Wzt の系統解析



近隣配列との DNA 相同性が 97%以上は赤色、70%~97%は青色、70%以下は黒色で示す。
 O96 と O170 の *wzx* (青色) の DNA 相同性は 86%

図 4. 162 種類のプライマーセットにより得られた PCR 産物のゲル泳動像

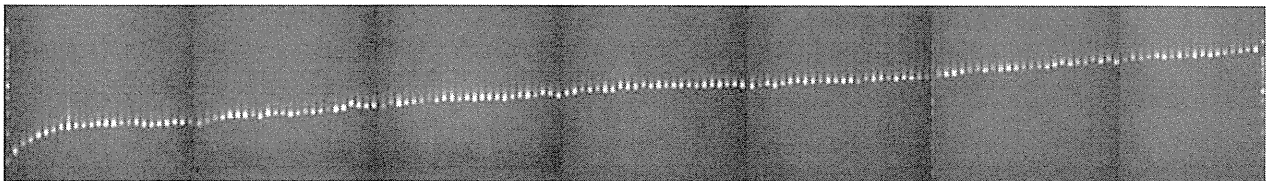


図5. 各マルチプレックスPCRにより得られたPCR産物のゲル泳動画像

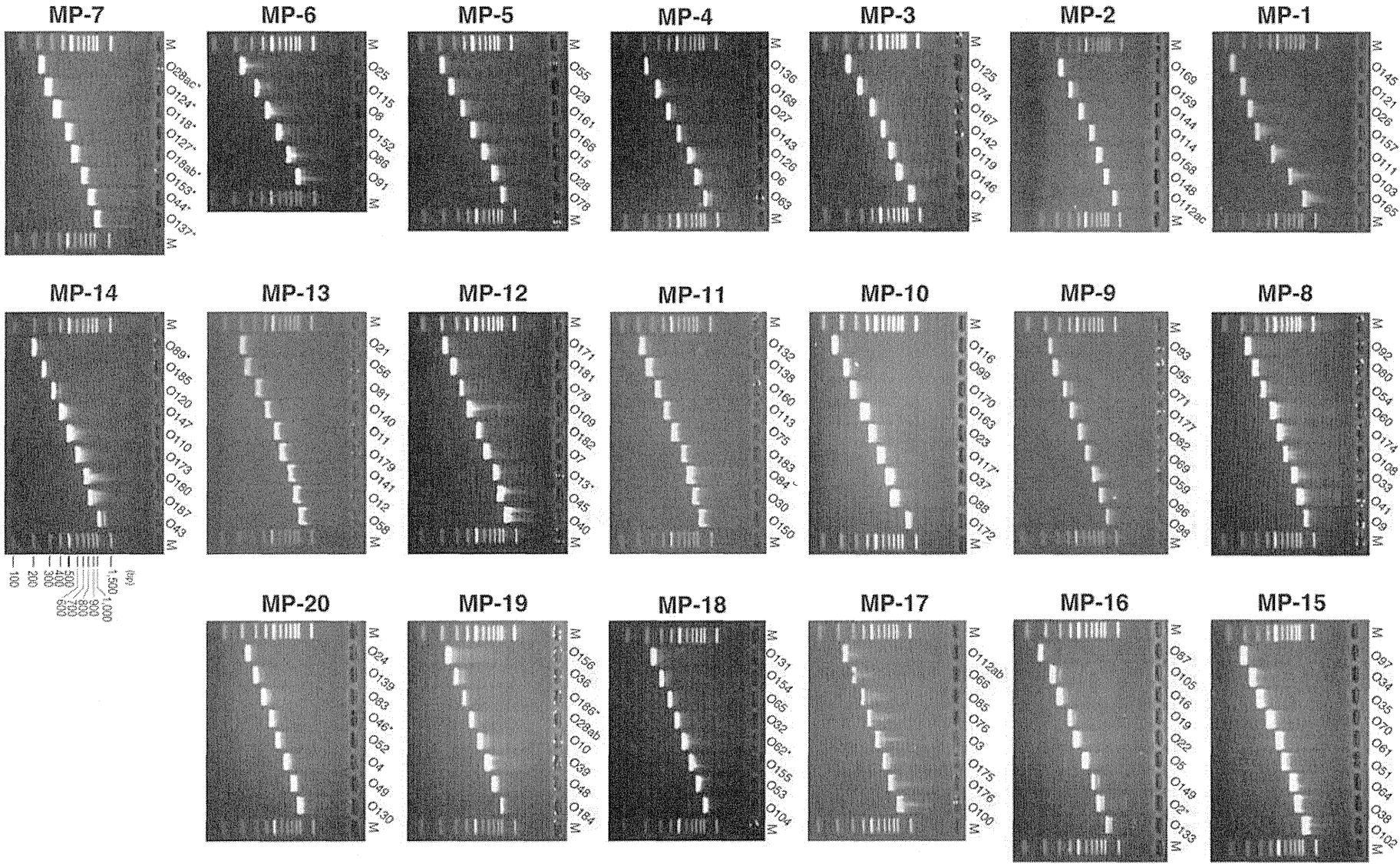


表 9. O 血清群と O-genotype が一致しなかった菌株のリスト

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 ^a	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 ^b	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 10. 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 ^a & Og9	O9 (-)
NBK#517	O101	OgGp15 ^a & 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 11. O-genotype が判定できなかつた菌株の O 血清群分布

株数	O 血清群
5	O141
4	O172
3	O1, O39, O79, O153
2	O14 ^a , O19, O57 ^a
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.

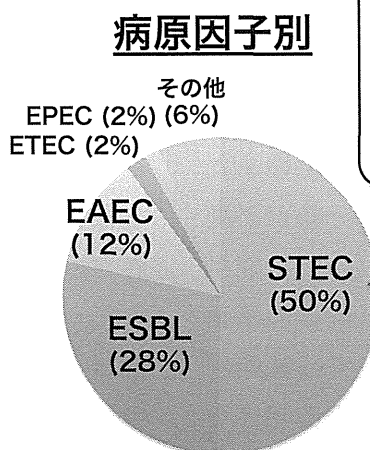
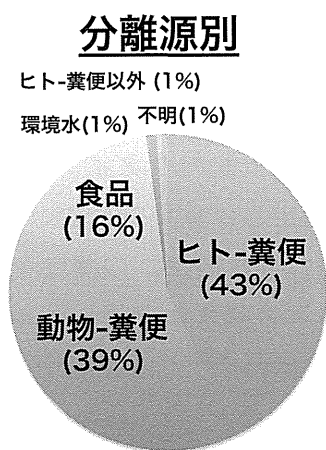
表 12. OUT 株における O-genotype の分布

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

図 6. 試験的タイピングネットワーク

寄せられた菌株数：381株（14機関）



研究所など 国立感染症研究所
 国立医薬品食品衛生研究所
 大阪府立公衆衛生研究所
 福岡県保健環境研究所
 大阪市立環境科学研究所
 宮崎県衛生環境研究所
 岡崎市保健所
 実験動物中央研究所
 大学 宮崎大学・農学部
 鹿児島大学・医学部
 大阪市立大学・生活科学部
 日本大学・生物資源科学部
 企業 栄研化学株式会社
 病院 国立病院機構・大阪南医療センター

STECに見られたO-genotype

Og174	20	Og146	4	OgGp12	1
Og113	20	Og23	3	Og8	1
Og157	11	Og160	3	Og7	1
Og182	9	Og136	3	Og55	1
Og5	8	Og130	3	Og177	1
Og109	8	Og168	2	Og163	1
Og6	6	Og140	2	Og150	1
Og84	5	Og116	2	Og141	1
Og85	5	Og91	1	OgUT	21

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）感染症が疑われる症例について、溶血性尿毒症症候群（HUS）患者を中心に O157 以外（non-O157）の抗原に対する抗体価測定のさかのぼり調査を実施し、O157 だけでなく、O165、O111、O121、O26 によると考えられる HUS 症例が明らかになった。特に O165 が最も多く、小児の HUS 患者 5 症例で O165 抗体陽性と判定された。EHEC O165 は選択性の高い分離培地には発育しないことから、便の培養検査では見逃されることが多く、症例数が低く見積もられている可能性がある。

また、主な EHEC 保菌動物であるウシについて直腸便の培養検査を実施したところ、2013 年は 72.5%、2014 年は 82%の検体から EHEC が分離された。2013 年には STEC autoagglutinating adhesin 遺伝子（*saa*）および Subtilase toxin 遺伝子（*subA*）陽性の O113:H21 が分離され、ヒトへの感染と重症化への関与が危惧される結果であった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の確定診断は、便からのベロ毒素（VT）産生性または VT 遺伝子を保有する大腸菌の分離が必要であるが、溶血性尿毒症症候群（HUS）症例に限っては、血清中の O 抗原凝集抗体の検出での届出が可能である。当研究所では試験管凝集反応法（試験管法）による抗体価測定を実施しており、HUS の起因菌として最も多い O157 に加えて、保育園での集団事例が多い O26 や O111 を対象抗原としてきた。国立感染症研究所の集計では、上記に加えて 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。そこで、これまでの抗体価測定成績をまとめるとともに、保存血清を中心に上記の 7 タイプの抗原に対する抗体価を測定し、重症例における O157 以外（non-O157）の EHEC の関与を調査した。また、ラテックス凝集法を用いた迅速な O157 抗体検出試薬について、試験管法の判定と比較した。

主要な EHEC 保菌動物であるウシについて、O157 および O26 の分離報告は多いもののそれ以外の O 抗原型について精査されているとは言いがたい。そこで、大阪府内で採取されたウシ糞便から下痢原性大腸菌を網羅的にスクリーニングし、分離された EHEC の O 抗原

型や保有遺伝子を精査して、ヒトに重篤な症状をもたらす可能性を検討した。

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および本研究期間中に依頼された血清を使用した。症例の内訳は、疑い例を含む HUS 患者 105 症例、腸炎症状患者 143 症例、その他の症状または症状不明 69 症例、無症状 12 症例であった（表 1）。

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。PBS で 2 倍階段希釈した非働化血清と抗原液を、試験管法では各 0.2 mL、マイクロプレート法では各 25 μ L 混合し、試験管法は 50 $^{\circ}$ C で一夜反応させた後、マイクロプレート法では 50 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、室温で 2 時間から一夜静置して判定した。陽性対照として病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を、陰性対照として PBS を抗原液と等量混合した。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. ラテックス凝集法

O157 チェック「LPS 抗体」（LSI メディエンス）を添付の説明書にしたがって使用した。すなわち、血清 20 μ L を検体希釈液 400 μ L に加えて攪拌後、100 μ L をスライド板上に滴下してラテックス試薬 1 滴とよく混合し、3 分後に凝集の有無を判定した。判定は強陽性、陽性、弱陽性、陰性の 4 段階で行った。

4. ウシの下痢原性大腸菌保有調査

検査材料には、シードスワブで採取した直腸便を使用した。

平成 25 年 5 月に採取した 40 検体については、分離培養に XM-G 寒天培地（XM-G, 日水製薬）を使用し、一部の検体では 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）も併用した。平成 26 年 11 月に採取した 50 検体については、直接分離培養に加え Universal Preenrichment Broth（BD）を用いた 42 $^{\circ}$ C 20 時間の増菌培養を実施し、分離培地には直接培養に XM-G および CT-RMAC を、増菌後の分離培養に XM-G および CT-ソルビトール・マッコンキー寒天培地（CT-SMAC）を使用した。

下痢原性大腸菌のスクリーニングは、志賀毒素遺伝子（*stx1* および *stx2*）、インチミン遺伝子（*eae*）、凝集性繊毛遺伝子群の発現調節遺伝子（*aggR*）、腸管毒素原生大腸菌のエンテロトキシン（LT, STh, STp）遺伝子、細胞膨化致死毒素遺伝子（*cdt*）を検出対象とし、分離培地の濃厚発育部位をかき取って調整したテンプレートを用いて、既報（川津ら、微生物の簡易同定法，2013）の Multiplex PCR（sweep PCR）を実施した。陽性平板から大腸菌が疑われるコロニーを画線培養し、PCR を繰り返して遺伝子陽性株を選択後、生化学的性状を確認した。

5. ウシ由来 EHEC の精査

分離した EHEC の血清型別は、市販血清（デンカ生研および SSI）または自家血清を用いて型別した。O 抗原については Iguchi らの方法（本報告書参照）を用いた遺伝子型別、H 抗原については Machado らの方法（Res. Microbiol., 2000）に準じた *fliC* 遺伝子型別も

実施した。

2013 年の分離株については、STEC autoagglutinating adhesin 遺伝子 (*saa*) および Subtilase toxin 遺伝子 (*subA*) についても調べた。

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. O157 に対する抗体価測定

これまでに、329 症例 700 検体について O157 に対する抗体価を測定し、165 症例で陽性と判定された。このうち病日の明らかな 92 症例 234 検体について、病日ごとの抗体価の平均値をグラフにしたところ、発症から第 4 病日までは陰性または疑陽性域にとどまっていたが、第 5 病日に陽性域に達し、5 週間程度継続していた (図 1)。

EHEC O157 が分離された症例では、HUS 患者 11 症例、腸炎症状患者 37 症例中 36 症例、症状不明 3 症例と無症状 4 症例の各 1 症例で抗体陽性を示した (表 2)。O157 が分離されなかった症例では、HUS 患者で 94 症例中 71 症例、腸炎症状患者 106 症例中 40 症例で抗体陽性と判定された。

2. non-O157 抗原に対する抗体価の測定

283 症例 601 検体では O157 に加えて O26 および O111 の 3 タイプに対する抗体価を、HUS 患者を中心に 40 症例 88 検体は O103、O121、O145、O165 を加えた 7 タイプについて測定した。11 症例で non-O157 抗原に対す

る抗体が陽性となり、その内訳は O165 抗体陽性が 5 症例、O111 抗体陽性が 3 症例、O26 抗体陽性が 2 症例、O121 抗体陽性が 1 症例であった (表 3)。O165 抗体、O111 抗体および O26 抗体陽性のうち各 1 症例は、O157 抗体も陽性と判定され、症例 33 と症例 323 では EHEC O157 が、症例 233 では EHEC O165 が分離されていた。

20 症例 41 検体については、試験管法とマイクロプレート法を比較した。試験管法で陽性と判定された抗原に対する抗体価は、マイクロプレート法でも 160 倍以上を示し、マイクロプレート法で 80 倍の反応は、試験管法で陰性と判定された。

3. 試験管法とラテックス法の比較

ラテックス法を実施した 69 症例 112 検体のうち、強陽性または陽性と判定された検体は 65 検体、弱陽性は 7 検体で、いずれも O157 抗体価は 160 倍以上を示していた (表 4)。しかしながら、抗体価 160 倍あるいは 320 倍で陰性と判定された検体も 10 検体みられた。抗体価 80 倍以下の 30 検体は、いずれもラテックス法陰性であった。

4. ウシの下痢原性大腸菌保有状況

ウシ直腸便を塗抹した分離平板の sweep PCR の結果、2013 年と 2014 年のどちらの調査でも、高い *stx2* 陽性率を示し、XM-G では *cdt* も高率であった (表 5)。*stx1*、*eae*、STp 遺伝子陽性検体もみられたが、*aggR*、LT 遺伝子、STh 遺伝子はすべて陰性であった。2014 年の調査では、直接培養、増菌培養ともに CT を加えた選択培地でコロニーが発育しない検体があった。

精査の結果、2013 年の調査では 29 検体 (72.5%) から 21 種類 43 株の EHEC が分離され、10 検体では複数の EHEC を保菌してい

た。2 検体以上から分離された EHEC は O157:H7 のほか、O113:H21、O174:H21、O171:HNM[H2]で、このうち O113:H21 は、*saa* および *subA* 陽性であった。2014 年の調査では、直接培養と増菌培養あわせて 41 検体 (82%) から EHEC が分離され、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

これまで診断のために抗体価測定を実施した症例の中には、EHEC 感染が疑われるにもかかわらず O157 抗体陰性と判定された症例があった。本研究のさかのぼり調査で、O157 抗体価 40 倍以下の HUS 患者 20 症例のうち 8 症例で、また O157 抗体陽性の 3 症例で、non-O157 抗体陽性と判定された。中でも O165 が最も多く、小児の HUS 患者 5 症例で O165 抗体陽性と判定された。大阪府で分離される non-O157 EHEC は O26 が最も多いが、重症例の割合は O165 で高く、抗体価測定結果もこれを裏付けるものであった。EHEC O165 は選択性の高い分離培地には発育しないことから、便の培養検査では見逃されることが多く、症例数が低く見積もられている可能性がある。保存血清の量が少なく、O103、O121、O145、O165 に対する抗体価が測定できていない検体もあり、マイクロプレート法の有用性が確認できたことから、今後全症例について測定する予定である。

2 タイプの抗原に対して抗体陽性となった 3 症例のうち症例番号 33 と 323 については、複数の EHEC に感染していたと推察され、便培養検査では O157 を主眼にしていたため O111 や O26 を見逃したと考えられる。症例番号 323 については、透析を繰り返した第 14 病日以降に O157 抗体価が上昇しており、非特異反応も否定できない。

腹痛や血便など腸炎症状のみの患者では 143 症例中 76 症例で O157 抗体陽性と判定され、EHEC 分離陰性症例でも O157 感染が強く疑われた。HUS 非発症例は血清診断に基づく届出ができないが、抗体価測定によって感染の有無を推定し、家族や接触者の検便を促すなど行政対応の一助となると考えられた。

抗体価測定は特別な試薬を必要とせず、定量性に優れているが、判定が翌日になることが難点である。ラテックス凝集法は迅速性に優れているが、試験管法に比べて検出感度が低いことが判明した。non-O157 による感染の可能性もあり、疑わしい症例では試験管法の併用や、採血日の異なる検体での再試験が必要である。

ウシ直腸便の培養検査からは、季節にかかわらず高率に EHEC を保菌していることが明らかになった。XM-G のみで、あるいは CT-RMAC/SMAC 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。HUS 発症のリスク因子は *stx2* と *eae* であるとの報告は多いが、2013 年の調査では、*saa* および *subA* 陽性の O113:H21 が分離された。オーストラリアでは O113:H21 による HUS 症例が多いと報告されており、大阪府でも 2012 年に血栓性血小板減少性紫斑病を発症した患者から *saa* および *subA* 陽性の O113:HNM が分離されている。感染源は不明であったが、発症前に焼肉店を利用しており、日本でも *saa* 陽性 EHEC による重症例に注意が必要であると考えられた。

E. 結論

EHEC 感染が疑われた患者血清について 7 タイプの大腸菌 O 抗原に対する抗体価を測定し、O157 だけでなく、O165、O111、O26、O121 によると考えられる HUS 症例が明らか

になった。O157 以外では、O165 抗体陽性症例が最も多く、EHEC O165 は便の培養検査では見逃され、症例数が低く見積もられている可能性がある。

non-O157 EHEC による感染症が増加しており、HUS 患者の血清診断にあたっては、O157 だけでなく重症者から高頻度に分離される O 抗原型について測定する必要がある。

少ないながら 2 タイプの抗原に対して抗体陽性を示す症例があり、複数の EHEC に感染していたと推察された。

ラテックス凝集法による O157 抗体検出は、迅速性および簡便性に優れるが、試験管法に比べて検出感度が低いため陰性と誤判定される場合がある。

ウシ直腸便の EHEC 保菌率は高く、*saa* および *subA* 陽性の O113:H21 などヒトへの感染と重症化への関与が危惧される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 勢戸和子: O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性. FFI ジャーナル, 2012, 217:67-75.
- 2) 勢戸和子, 伊豫田淳, 寺嶋淳: 腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断. 小児科臨床, 2012, 65: 2583-2587.
- 3) 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

- 1) 勢戸和子, 田口真澄, 原田哲也. 大阪府における STEC 感染症への抗菌薬治療の現状. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2012 年 7 月, 秋田)
- 2) 伊豫田淳, 石原朋子, 勢戸和子, 泉谷秀昌, 小西典子, 甲斐明美, 中嶋洋, 木全恵子, 磯部順子, 大西真. 重症者由来 LEE 非保有型 EHEC の病原性因子の解析. 第 86 回日本細菌学会 (2013 年 3 月, 千葉)
- 3) 勢戸和子, 田口真澄. 腸管出血性大腸菌感染症における抗体価測定の意義とラテックス凝集法の評価. 第 56 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 (2013 年 11 月, 大阪)
- 4) 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 血清の内訳

症状	症例数	EHEC分離	症例数
HUS (疑い症例を含む)	105	O157	11
		O165	2
		陰性	92
腹痛・血便・ 下痢など	143	O157	37
		O103	1
		陰性	105
その他・不明	69	O157	3
		陰性	66
無症状	12	O157	4
		陰性	8

表 2 O157 抗体価の測定結果

症状	EHEC O157 分離	症例数	O157抗体価					
			<20	40	80	160	320	640 \leq
HUS (疑い症例を含む)	+	11				4	4	3
	-	94	18	2	3	7	27	37
腹痛・血便・ 下痢など	+	37	1			3	12	21
	-	106	53	5	8	8	17	15
その他・不明	+	3	2					1
	-	66	31	20	10	2	2	1
無症状	+	4	2	1		1		
	-	8	5	1	2			
合計		329	112	29	23	25	62	78

表 3 O157 以外の O 抗原に対する抗体陽性症例

症例番号	年	性別, 年齢	症状	抗原型(抗体価)		備考
11	1988	M, 3	HUS	O111 (320)		
33	1992	F, 不明	HUS	O111 (160)	O157 (160)	O157分離
233	1998	F, 2	HUS	O165 (320)	O157 (160)	O165分離
265	2000	F, 4	HUS	O165 (160)		
271	2001	F, 2	HUS	O26 (640)		
274	2001	F, 8	HUS	O121 (320)		
276	2001	F, 3	HUS	O165 (320)		O165分離
288	2003	M, 7	HUS	O165 (640)		
286	2004	F, 1	HUS	O165 (320)		
291	2004	F, 5	HUS疑い	O111 (1280)		
323	2006	F, 4	血便	O26 (160)	O157 (160)	O157分離

症例33; 急性期の血清でO111抗体陽性、回復期の血清でO157抗体陽性

症例233; 第6～14病日にO165抗体陽性、第14～17病日にO157抗体陽性

症例323; 第7病日にO26抗体、O157抗体ともに陽性

表 4 試験管法とラテックス凝集法の比較

ラテックス 凝集法	O157抗体価(試験管法)				
	≤40	80	160	320	640≤
強陽性			1	16	25
陽性			8	10	5
弱陽性			6	1	
陰性	21	9	7	3	

表 5 ウシ直腸便の下痢原性大腸菌保有状況—sweep PCR の結果

検出 遺伝子	直接 ^a		直接 ^b		増菌 ^b	
	XM-G n=40	CT-RMAC n=32	XM-G n=46	CT-SMAC n=39	XM-G n=50	
<i>stx1</i>	7 (17.5)	2 (6.3)	14 (30.4)	3 (7.7)	15 (30.0)	
<i>stx2</i>	30 (75.0)	19 (59.4)	34 (73.9)	24 (61.5)	40 (80.0)	
<i>cdt</i>	25 (62.5)	0	33 (71.7)	6 (15.4)	41 (82.0)	
<i>eae</i>	26 (65.0)	14 (43.8)	23 (50.0)	20 (51.3)	24 (48.0)	
<i>aggR</i>	0	0	0	0	0	
LT	0	0	0	0	0	
STh	0	0	0	0	0	
STp	14 (35.0)	2 (6.3)	9 (19.6)	5 (12.8)	14 (28.0)	

a 2013年5月実施

b 2014年11月実施

抗体価

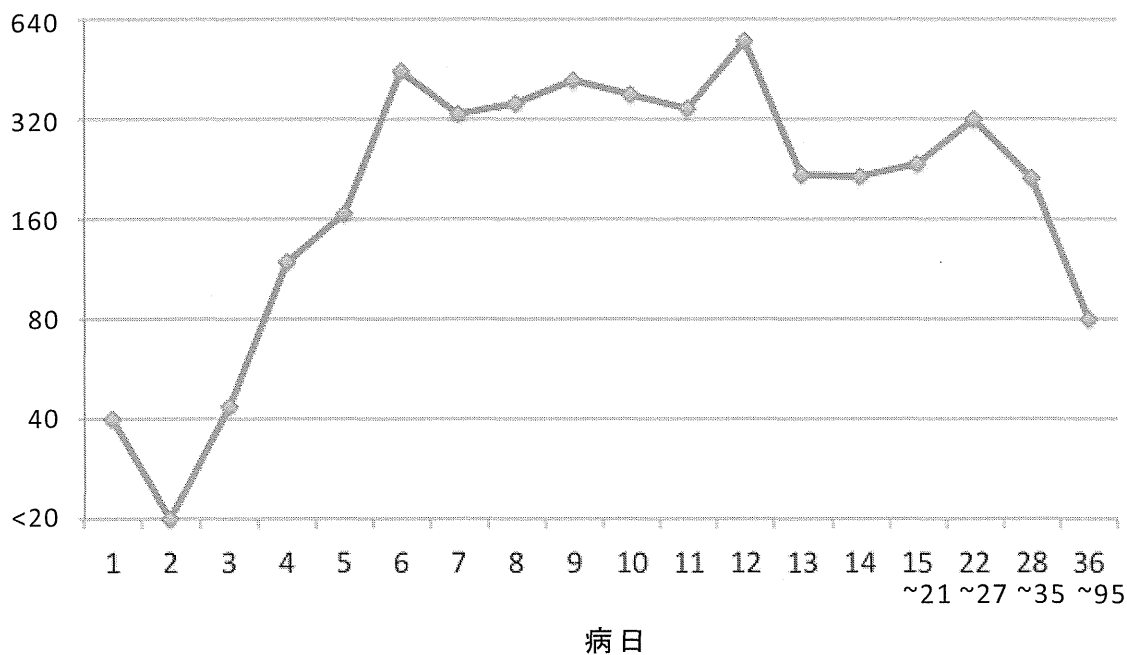


図 1 病日による O157 抗体価の推移

第 15 病日以降は 7 日間または 60 日間の成績をまとめた

別紙

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
平成 24-26 年度 分担研究報告書

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した。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* も解析対象に含めた。その結果、3 種類の non-O157 EHEC（O121:H19, O145:HUT, O165:H-）の完全長ゲノム配列を決定し、基本的な情報解析（アノテーション等）も終了した。また、O115:H10/H-を含めた 4 血清型の国内分離株・欧州分離株を収集し（それぞれ 21～61 株）、そのドラフトゲノム配列を取得し、各血清型の高精度系統解析を実施した。*E. albertii* に関しては、ヒトでの集団感染を起こしうる腸管病原体であることを明らかにするとともに、4 株（1 株は Stx2f 産生株）の全ゲノム配列決定し、25 株（Stx2f 産生株を 1 株含む）のドラフトゲノム配列を取得した。さらに、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。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した。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した。

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、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、ネブライザーを用いて DNA の断片化を行い、NGS (Roche 454 GS-FLX+ と 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 pair/paired end library) および NGS を用いたシーケンス作

業は、基本的には Roche 社および Illumina 社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センブリに関しては、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。また、必要に応じて、40 kb 前後の DNA を調整し、pCC1 ベクターを用いてフォスミドライブラリーを作成した。

完全長ゲノム配列決定の基本的パイプラインは、(i) ドラフト配列の取得、(ii) フィニッシング、(iii) 配列の高精度化の 3 つの行程からなる。(i) のについては、当初は Roche 454 を用いて shotgun library および 8 kb の mate pair library の配列決定（重複度は通常 x30 以上）を行い、得られた配列を Newbler でアセンブルすることにより、ドラフト配列を取得したが、途中から Illumina MiSeq による配列取得と *Platanus* を用いたアセンブリに変更した。(ii) の完全配列取得のためのフィニッシング作業は、短いギャップについては、まず *GenoFinisher* 等を用いた情報学的な gap closing を行った後、contig 末端に設計したプライマーを用いた PCR と PCR 産物の配列決定を行った。長いギャップについては、酷似した配列をもつ複数のプロファージの領域等、長い繰り返し配列に由来するため、long PCR 産物のキャピラリーシーケンサあるいは MiSeq による配列決定、さらにはフォスミドライブラリーの中から、ギャップあるいは contig 末端をカバーするクローンを PCR で検索し、選定したクローンの配列を MiSeq を用いて決定することにより gap closing を行った。(iii) については、MiSeq を用いて pair end sequence を取得し、*Bwa* と *samtools* を用いて MiSeq リード配列のマッピングと SNP の抽出（配列修正）を行い、ゲノム配列の高精度化（エラー修正）を行った。ただし、MiSeq を用いて取得したドラフトゲノム配列は配列精度が高いため、この作業は実施していない。

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 3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の解析：

研究方法に記載した 3 株の完全長ゲノム配列を決定した。表 1 に、K-12 株と O157, O26, O111, O103 EHEC と比較した 3 株のゲノム特性を示す。アノテーションも終了し、プロファージ、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ァージが存在し、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明らかになった。

Stx ファージについては、O157, O26, O111, O103 EHEC の Stx ファージを含めた比較解析を進め、以下の点が明らかになった（図 1 参照）。

(i) O145 の Stx1 ファージは 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ァージである。

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

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

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ァ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が明らかになった。

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 ファ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 ファ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た(図 2, 図 3, 図 4, 図 5 参照)。

(i) O145 の Stx1 と Stx 2a ファージの分布は、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、ファ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(現在解析が進行中)。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、ファ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 ファージが *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 ファ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 ファ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、それぞれのファ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、世界初となる集団感染事例を同定し、さらに、大分県および熊本県の地方公衆衛生研究所との共同で、第 2・第 3 の *E. albertii* によるヒト集団感染を同定した。

ゲノム解析に関しては、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た。

完全長配列を決定した 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、今回は以下の比較解析ではドラフト配列を使用)については、アノテーション等も終了した。この解析から明らかになった本菌のゲノム特性としては、以下の点が重要である。

(i) 3 株の染色体は、それぞれ 4.60 Mb、4.66 Mb、4.56 Mb であり、EHEC などの病原性大腸菌に比べるとやや小さい(Stx2f 産生株のみがプラスミドを保有する; 200 kb と 100 kb)。

(ii) 染色体構造(遺伝子のシンテニー)は 3 株間で非常によく保存されており、塩基配列の相同性も 98-99% という高い identity を示す。