

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

非メジャー血清群腸管出血性大腸菌の重症化因子の同定及び新たな
分離検出法確立のための研究

令和 4～6 年度

総合研究報告書

研究代表者 窪村 亜希子

国立感染症研究所 細菌第一部

令和 7 (2025) 年 5 月

別紙2

目次

I. 総合研究報告

非メジャー血清群腸管出血性大腸菌の重症化因子の同定 及び新たな分離検出法確立のための研究-----	1
窪村 亜希子	

II. 分担研究報告書

非メジャー血清群腸管出血性大腸菌のゲノム解析-----	42
李 謙一	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 65

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総合研究報告書

非メジャー血清群腸管出血性大腸菌の重症化因子の同定及び
新たな分離検出法確立のための研究

研究代表者 窪村 亜希子（国立感染症研究所 細菌第一部）
研究分担者 李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）に関する研究は主要 7 血清群を中心に行われてきたが、主要ではない血清群（以下、非メジャー血清群）についても重症例や死亡例が国内外で報告されていることから、着目していく必要がある。本研究では非メジャー血清群 EHEC について、病原性遺伝子領域 LEE を保有しない血清群（LEE(-)血清群）と、LEE を保有する主要ではない血清群（LEE(+)マイナー血清群）の EHEC に分類し、ゲノム解析および培養細胞を使用した解析により重症化因子特定を試みる。さらに既存培地による分離検出の有用性について評価を行った。

LEE(-)血清群 EHEC については、全ゲノム解析により重症例由来株から *cdiAB*, *gad*, *katN*, *rgdR*, *stx2* が高率に検出された。さらに、HUS 症例由来株については完全長ゲノム配列の取得と解析を行ったことで、いずれも巨大プラスミドを保有していることが確認された。全株の培養細胞への感染試験結果から、細胞への付着率や付着形態は LEE を保有する主要な血清群の EHEC とは異なることが明らかとなった。さらに、死亡例由来 LEE(-)血清群 EHEC 株の培養細胞への付着性は本菌の外膜タンパクが担っていることも明らかとなった。

LEE(+)マイナー血清群 EHEC については 11 株の HUS 症例由来株から共通して *stx2* が検出され、非メジャー血清群 EHEC においても *stx2* が重症化に寄与している可能性が示唆された。さらに、HUS 発症と関連している 7 種類の O 血清群全株を対象としてゲノム解析を行うことで、重症例由来株から *katP* 等の遺伝子が高率に検出されることを特定した。

katP および *katN* の遺伝子保有率の調査により、いずれも重症率の高い O 血清群または血清型において保有が確認されたことから、抗酸化に関与する因子は特定の血清型の非メジャー血清群 EHEC において重症化に寄与している可能性が示唆された。さらに、非メジャー血清群 EHEC の半数以上が CT 含有培地において発育が困難であることが確認され、食中毒等の事例発生時において食品等検体から EHEC の分離を行う場合は、CT 不含培地の確認も併せて行うことが重要であると考えられた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) は食中毒や腸管感染症の原因微生物の 1 つであり、ヒトに下痢等の消化器症状を発症させる。国内では年間約 3000 名程度の感染例報告があり、同菌による重症例では血便や溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症し、死者も報告されることから公衆衛生上重要な微生物である。

分離される EHEC の 90%以上は、主要 7 血清群 (O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165) であることから、EHEC に関する研究はそれら血清群を中心に行われてきた。しかし、主要ではない血清群 (以下、非メジャー血清群) についても重症例や死亡例が国内外で報告されていることから、非メジャー血清群の EHEC についても着目していく必要性がある。

主要な血清群の EHEC はいずれも病原性遺伝子領域 *locus of enterocyte effacement* (LEE) を保有し、LEE 領域内に存在する細胞付着関連遺伝子により宿主細胞に強固に付着することで感染が成立すると考えられており、実際、培養細胞を用いた試験において細胞への付着性と EHEC 感染症の重症化には関連性が示されている。一方で、非メジャー血清群 EHEC には LEE を保有しない血清群も含まれ、それら血清群の重症化因子や細胞付着性等について未だ不明瞭な部分が多い。

本研究では、非メジャー血清群 EHEC の重症化因子の特定のため、過去 15 年間に国内で分離された非メジャー血清群 EHEC のうち HUS 症例由来株が含まれる O 血清群を中心に LEE を保有しない

(LEE(-)) 血清群、および保有するが主要ではない (LEE(+)) マイナー血清群に分類し、全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) 解析や培養細胞を用いた解析を行った。さらに既存培地による分離検出の有用性について評価も行った。

B. 研究方法

1. LEE(-) 血清群 EHEC の解析

1-1. WGS 解析

2007-2021 年に国内で分離された LEE(-) 血清群 EHEC のうち、HUS を起こした O 血清群を中心とした 9 種類の O 血清群 (O74, O113, O115, O163, O166, O174, O183, OX18, OUT) に属する 328 株を解析対象株とした。328 株のうち WGS 解析が未実施である 209 株について、HiSeqX (illumina) を用いて WGS 解読を行い、得られたシークエンスデータを使用して網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行うことで確実に LEE(-) 血清群 EHEC 研究対象株の選定を行った。遺伝子検出方法は、アセンブル後のドラフトゲノムを用いて Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>)、および The Virulence Factor Database (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) で検出されている病原性関連遺伝子を中心とした独自のデータベース上の遺伝子を対象に BLASTn にてアライメント長 60%以上、類似性 90%以上の遺伝子が検出された場合を保有と判定した。さらに検出された病原性関連遺伝子のうち細胞付着関連遺伝子に着目し、保有状況の確認を行った。また、HUS 症例由来株 9 株のうち 4 株については PacBio Sequel IIe による解

読を行い（表 1）、得られたロングリードシーケンスおよびショートリードシーケンスを Trycycler および Unicycler を用いたハイブリッドアセンブリで完全長ゲノム配列の決定を行った。取得した完全長ゲノム配列から保有するプラスミドのサイズやプラスミド上にコードされる主な病原性関連遺伝子等の確認を行った。

1-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

1-1 で取得した WGS データを使用して Multilocus sequence typing (MLST) による ST の特定、および抽出した SNP による系統樹の作製を行った（表 2）。さらに、重症化に関与する可能性にある遺伝子を検出するため、HUS 症例由来株と同じ血清型（O74:H20, O113:H21, O183:H18, OX18:H2, OX18:H19, OX21:H19, OgN13:H19）であることが確認された 92 株（表 3）を対象に WGS 解析による網羅的な病原性関連遺伝子の検出による遺伝子保有状況を確認した後、92 株を重症例から分離された 13 株（重症株）とそれ以外の 79 株（非重症株）に区分して遺伝子保有状況の比較解析を行い、カイ二乗検定により重症例から有意に高率に検出される遺伝子の特定を行った。抽出された各遺伝子について、解析対象である 92 株の血清型別保有率の確認も行った。

1-3. *katN* の表現型の解析および保有状況調査と検出系の開発

1-2 により重症例から高率に検出された遺伝子のうち *katN* に着目して解析を行った。初めに表現型確認のため、マクロファージ細胞（RAW264.7）を用いた解析

を行った。方法は HUS 症例由来 *katN* 陽性 EHEC OX18:H19（JNE181771 株）、および λ Red-recombination システムにより同株の *katN* 破壊した株（JNE181771 Δ *katN*）について一晩培養させた菌液を RAW264.7 細胞に接種し貪食させ、30 分後に PBS で洗浄を行った後、細胞外の菌を殺菌するため 50 μ g/ml ゲンタマイシン加培地を分注し、1 時間後（貪食菌数）および 5 時間後（生存菌数）に測定した細胞内菌数から細胞内生存率を比較した。菌数測定は 1% Triton X を加え細胞溶解液を作製し、LB 寒天平板に塗抹した。試験は 5 回実施し、1 回につき各サンプルを 2 重に試験した。*katN* 保有状況調査は所内に保管される non-EHEC を含む大腸菌 4522 株（287 血清型）を対象にゲノム解析により行った。また PCR 法による *katN* の検出系開発のため、*katN* の保有が既に報告されている EHEC O157:H7 EDL933 株と所内 *katN* 保有大腸菌 5 株の遺伝子配列から検出プライマーの設計を行った。設計したプライマーを用いて *katN* 保有状況が判明している大腸菌 54 株を対象に PCR を実施することで適切に検出が可能であるか確認も行った。

1-4. 培養細胞を使用した表現型の解析

培養細胞を使用した細胞付着性試験および細胞毒性試験により細胞への表現型について確認を行った。細胞付着性試験の対象株は WGS 解析により選定された LEE(-)血清群 EHEC 全株とし、細胞毒性試験は HUS 症例由来株を中心に実施した。細胞付着性試験の方法は一晩培養菌液を MOI が 100 となるよう HEp-2 細胞に接種

し 1%マンノースを加えた FBS-free DMEM で 1 時間培養を行った。その後 PBS にて 3 回洗浄し、再度 1%マンノースを加えた FBS-free DMEM で 3 時間培養を行った。再度 PBS にて 3 回洗浄し、メタノール固定とギムザ染色を行った後、顕微鏡観察により細胞への付着の有無および付着形態の確認を行った。さらに HUS 症例由来株のうち細胞付着関連遺伝子 *saa* が検出された 8 株のうち、細胞付着性試験により細胞付着性が確認された株について λ Red recombination システムにより *saa* 破壊株を作製し、再度細胞付着性試験を実施した。また、HUS 症例由来株のうち *saa* 等既知の細胞付着因子不検出であった JNE140672 株 (O115:H10) については、HEp-2 細胞への付着性の解析を、PBS での洗浄を菌液接種 1 時間後と細胞固定前の 2 回に分けて行う方法 (UTH 法)、および細胞固定前にのみ行う方法 (CVD 法) の 2 条件で実施した。細胞毒性試験については HUS 症例由来株から検出された主な病原性遺伝子である *cdt* と *sub* の細胞への影響について評価を行うため、各遺伝子を保有する同じ O 血清群の健康者由来株の解析結果と比較を行った。ただし、OgN13 については健康者由来株がなかったため HUS 症例由来株のみとした (表 4)。試験方法は被検菌を LB または BHI で振とう培養を行った菌液について、超音波破碎を行った後、0.45 μ m フィルターにより作製した抽出液を CHO 細胞に添加し細胞伸長や細胞傷害性について解析を行った。CHO 細胞の細胞伸長の評価は顕微鏡による形態観察および Countess3 による平均細胞サイズ測定、細胞傷害性

は Cell Counting Kit-8 (Dojindo) による生細胞数の測定を行い、菌液を接種しないウェルの細胞を 100%として算出した。

1-5. HUS 症例由来 EHEC のプラスミドの解析

細胞付着性が検出された HUS 症例由来株のうち、死亡例由来株である OX18:H2 株 (JNE170426) を対象に、細胞付着因子がプラスミド上に存在するか確認を行った。方法は、完全長ゲノム配列の解析により確認された JNE170426 が保有する 158kb (pJNE170426-1) および 86kb (pJNE170426-2) のプラスミドについて、 λ Red recombination システムによりカナマイシン (Km) 耐性を各プラスミドに付与した株を作製後、各株からプラスミドの抽出を行った。抽出したプラスミドをエレクトロポレーションにより DH10B 株に導入を行ったのち、Km 添加 LB 培地で培養することでプラスミド導入株の選定を行った。作製したプラスミド導入株、および、陽性対照として各プラスミドに Km 耐性を付与した JNE170426 株についても HEp-2 細胞を使用した細胞付着性の解析を行った。

1-6. HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の細胞付着因子の特定

HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の細胞付着因子を特定するため、JNE170426 株を対象に Tn-seq 解析を行った。方法は JNE170426 株についてトランスポゾン (Tn5) 挿入によるランダムな遺伝子破壊株ライブラリーを作製し、作製したライブラリーを HEp-2 細胞に接種、3 時間感

染実験を行った後、非付着株を除去するため PBS で 3 回洗浄、1% Triton-X100 添加により取得した細胞溶解液を Km 添加 LB 培地にて 37°C で 18 時間培養し、取得した菌体から DNA の抽出を行った。HEp-2 細胞接種前のライブラリーから抽出した DNA サンプル (input)、および付着性試験後に回収した菌体から抽出した DNA サンプル (output) について Tn-seq 解析を実施しシーケンスデータを取得した。取得した input および output サンプルのシーケンスデータを JNE170426 の染色体上ゲノムにマッピングを行い、Tn-seq Explorer を用いて染色体上の各遺伝子にマッピングされたカウント数を検出した。各遺伝子のカウント数の output/input 比から細胞付着性に寄与している可能性の高い遺伝子を選定した。選定した各遺伝子は λ Red-recombination システムにより破壊した株の作製、当該遺伝子をクローニングしたプラスミドにより相補した株、および細胞非付着株 (DH10B) に導入した株を作製し、HEp-2 細胞への付着性を解析した。

2. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の解析

2-1. WGS 解析

2007-2021 年に国内で分離された主要 7 血清群以外の O 血清群に属する LEE(+)血清群 EHEC で HUS を起こした O 血清群である 7 種類の O 血清群 (O51, O70, O76, O80, O109, O172, O177) に属する 103 株を解析対象株とし、HiSeqX (illumina) を用いて WGS 解読を行った。取得した WGS を用いたゲノム解析により病原性関連遺伝子を 1-1 と同様の方法により検出した。

さらに、HUS 症例由来株である 11 株については EHEC の主な毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *cdt*, *sub*) の保有状況の確認も行った。

2-2. 系統解析と保有遺伝子比較解析

HUS 発症由来株を含む 7 種類の O 血清群に属する 95 株 (表 5) の WGS を使用し、MLST による ST の特定、および SNP 抽出による系統解析を行った。2-1 により特定された供試株の血清型および *eae* 保有状況、各菌株の疫学情報 (発症の有無等) と併せて系統樹のメタデータとして使用した。また、2-1 の解析により *eae* が検出された株を LEE 保有株として重症化に関与する遺伝子特定も行った。方法は 1-2 と同様の方法で行った。特定された遺伝子については O 血清群別の保有率も算出した。

2-3. 培養細胞を使用した表現型の解析

LEE(+)マイナー血清群 EHEC の解析対象である全 103 株について HEp-2 細胞を用いた細胞付着性試験を 1-2 と同様の方法により実施した。さらに同一 O 血清群の細胞付着株について、重症例由来株と健康者由来株の細胞付着効率の比較を行い、細胞付着性が重症化に寄与している可能性についても評価を行った。また、103 株のうち HUS 症例由来株である 11 株については CHO 細胞を用いた細胞傷害性の解析を行った。方法は LB で培養した HUS 症例由来菌液を使用し、1-4 と同様の手法で行った。

3. 非メジャー血清群 EHEC の既存培地への発育状況確認

本研究対象血清型のうち国内分離株数の多い8種類の血清型を各8株、合計64株を対象として既存平板培地を用いた分離検出の有用性を評価した。使用する平板培地は、EHECの分離に用いられる選択剤であるセフィキシム・亜テルル酸カリウム（CT）を含有する4種類のEHEC分離用の平板培地、およびCT不含の6種類の平板培地（合計10種類）とした。さらに規定量の半分のCTを添加したクロモアガーSTEC培地も作製し、全てのCT感受性株を対象に塗抹した。各平板培地は37℃で18-24時間培養後に各菌株の発育状況やコロニーの色調等の観察を行った。

C. 研究結果

1. LEE(-)血清群 EHEC の解析

1-1. WGS 解析

328株のWGSから網羅的に保有遺伝子の検出を行い、312株のLEE(-)血清群EHECの選定を行った。選定された株で症状が確認可能であった278株のうち76株（27.3%）が有症例、22株（7.9%）が血便等の重症例由来株であった（表6）。312株からは293種類の病原性関連遺伝子が検出され、そのうち53種類は細胞付着関連遺伝子であった。細胞に付着した株から検出された付着関連遺伝子は38種類あり、各付着関連遺伝子について付着株の検出数と全312株の検出数の比較（付着株検出数／全312株検出数×100）を行った結果（図1）では、*eibG*が最も高い値（50%）を示し、カイ二乗検定により有意差が示された（ $p < 0.01$ ）。次いで *saa*（7.7%）や *lpfA*（7.3%）が多く検出されたがいずれも有意差は示されなかった。HUS症例由来

株についてロングリードシーケンス解析を行い、4株の完全長ゲノム配列を決定した。さらに、既を取得済みの4株と合わせた合計8株のHUS症例由来株について、保有する染色体やプラスミドのサイズ等確認を行った結果、いずれの株も共通して巨大プラスミド（131～174kb）の保有が確認された（表7）。

1-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

系統解析では高病原性が示唆される系統は確認されなかった（図2）。しかし、各血清型の代表株および代表的な大腸菌株について系統解析を行った結果、同じO血清群であってもH抗原型が異なる場合は必ずしも近縁ではないことが確認され、病原性等の特徴も異なる可能性が考えられた（図3）。HUS症例由来株と同じ血清型に属していた株について網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行った結果、92株から228種類の遺伝子が検出された。さらに重症株と非重症株に区分して遺伝子保有状況を比較した結果、重症株から *cdiAB*, *gad*, *katN*, *rgdR*, *stx2* が有意に（ $p < 0.05$ ）高率に検出された（表8）。検出された遺伝子のうち *stx2* は全ての血清型から検出され、*cdiAB* と *katN* についてはそれぞれ O74:H20 と OX18:H19 の全株から検出された（図4）。

1-3. *katN* の表現型の解析および保有状況調査と検出系の開発

RAW264.7細胞を用いた *katN* の表現型の解析により、JNE181771野生株の5時間後の生存率は JNE181771 $\Delta katN$ に比べ有意に低い値となった（ $p = 0.017$ ）（図5）。

katN の保有状況調査では、287 の血清型のうち 21 の血清型（OUT および HUT 除く）から *katN* が検出された。このうち本研究対象としている血清型のうち比較的重症率が高い（45.8～57.1%）3 血清型（O172:H25, O177:H25, OX18:H19）において高率（88.2～100%）に検出されることが明らかとなった（表 9）。また、*katN* の PCR 検出用プライマーを設計し（*katN*-F: TATTGGTTCTCTTGGTGGTAT、*katN*-R: GTCAAAGTTTTTCATCACTGT）、当該プライマーを用いた PCR 法では *katN* 保有株にのみ目的のサイズ（409bp）の増幅バンドが確認された。

1-4. 培養細胞を使用した表現型の解析

選定された全 312 株について細胞付着性試験を行った結果、19 株で細胞への付着が確認され（表 10）、症状が確認可能であった 18 株のうち 3 株（16.6%）が重症者由来株であった。細胞に付着した 19 株のうち 5 株（O183:H18 が 4 株、O174:H2 が 1 株）は細胞付着関連遺伝子 *eibG* を保有していたが、顕微鏡による付着形態観察では EibG が示す特徴的な付着形態である Chain-like adherence（CLA）は O183:H18 の 4 株でのみ認められ、O174:H2 の株については CLA とは異なる付着形態であると判定した（図 6）。HUS 症例由来株の細胞付着性試験では *saa* を保有する 8 株のうち、2 株が HEp-2 細胞への付着性を示した。しかし、当該 2 株の *saa* を破壊した株について細胞付着性試験を行った結果、いずれも細胞への付着が確認された。*saa* 非保有であった JNE140672 株については、UTH 法では非付着性であった

が、CVD 法においては細胞付着性の検出が可能であった。細胞毒性試験では、*cdt* を保有する株はいずれも細胞伸長が確認され（図 7）、平均細胞サイズは HUS 症例由来株と健康者由来株で大きな差は認められなかった（図 8）。*sub* 保有株の CHO 細胞への影響の解析では、CHO 細胞の生細胞数について O 血清群ごとに比較を行ったが、健康者由来株に比べ HUS 症例由来株の方が有意に低い生細胞数を示す O 血清群は確認されなかった（図 9）。

1-5. HUS 症例由来 EHEC のプラスミドの解析

JNE170426 が保有するプラスミド pJNE170426-1 および pJNE170426-2 に Km 耐性を付与した株、および各プラスミドをそれぞれ DH10B に導入した株（DH10B/pJNE170426-1、DH10B/pJNE170426-2）について HEp-2 細胞による付着性の解析を行った結果、プラスミドに Km 耐性を付与した 2 株は野生株と同様の付着性を示したが、一方で DH10B にプラスミドを導入した 2 株についてはいずれも細胞非付着性であった（図 10）。

1-6. HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の細胞付着因子の特定

Tn-seq により取得した配列を JNE170426 の染色体上に存在する 4802 遺伝子にマッピングを行い、各遺伝子の input および output サンプルのカウント数比（output/input）を 0.2 以下等の条件を設定することで細胞付着性に関与している可能性の高い 30 遺伝子を抽出した（表 11）。これら 30 遺伝子を対象に順次破壊株の作

製および培養細胞への付着性の解析を行った結果、細胞外膜タンパクに関連する遺伝子 (*nmpC*) を破壊した株 (JNE170426 Δ *nmpC*) において細胞付着性が消失した。そのため pMW119 に *nmpC* をクローニングし、相補株 (JNE170426 Δ *nmpC*/pMW119-*nmpC*) および DH10B への導入株 (DH10B/pMW119-*nmpC*) を作製し、当該 2 株についても細胞付着性の解析を行った結果、いずれも細胞付着性を示したことから、本菌の細胞付着因子として NmpC を特定した (図 11)。

2. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の解析

2-1. WGS 解析

HUS 症例由来の 11 株について病原性関連遺伝子を検出した結果、全ての株から *stx2* が検出され、*ehx* と *cdt* はそれぞれ 8 株および 3 株から検出されが、*sub* はいずれの株からも検出されなかった。

2-2. 系統解析と保有遺伝子比較解析

系統解析により LEE(+)マイナー血清群 EHEC においても、同じ O 血清群のうち H 抗原型が異なる場合は必ずしも近縁ではなく、ST も異なることが確認された (図 12)。さらに、O76 および O109 においては H 抗原型の違いにより *eae* 保有の有無が異なり、いずれも *eae* 保有系統からのみ HUS 発症例および重症例が確認された。

2-1 の解析により *eae* 不検出株等を除いた 63 株 (表 12) を対象に網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行った結果、63 株から 309 種類の遺伝子が検出された。さらに 63 株のうち 24 株を重症株、39 株を非重症株に区分して遺伝子保有状況を比較

した結果、重症株から *katP*, *IncFIB*, *tssF*, *espJ*, *upaG/ehaG* が有意に ($p < 0.05$) 高率に検出された (表 13)。O 血清群別の遺伝子保有率では、カタラーゼ-ペルオキシダーゼをコードする *katP* は比較的重症率の高い 3 種類の O 血清群 (O177, O172, O76) からのみ保有が確認された (図 13)。

2-3. 培養細胞を使用した表現型の解析

全 103 株について HEp-2 細胞による付着性試験を行った結果、15 株で細胞付着性が認められ (表 14)、付着形態はいずれも局在性付着であった (図 14A)。付着性が検出された 15 株は O80 が 2 株 (健康者 2 株)、O177 が 13 株 (重症者 5 株、その他有症者 3 株、健康者 4 株、不明 1 株) であった。さらに、O177 株について重症例由来株と健康者由来株を 4 株ずつ供試して細胞付着効率の測定を行った結果、重症例由来株の方が高い値となったが (図 14B)、*t* 検定による統計解析では有意差は認められなかった ($p = 0.12$)。HUS 症例由来株の細胞傷害性試験では、11 株のうち 5 株が非病原性株に比べ生細胞数が有意に低下した ($p < 0.05$)。生細胞数の低下が認められた 5 株のうち 3 株は *cdt* 保有株であり、鏡検により細胞の膨化が確認された (図 15)

3. 非メジャー血清群 EHEC の既存培地への発育状況確認

供試した 8 血清型のうち O177:H25 については 2 つの系統 (ST659 および ST342) が含まれ、系統により色調の異なるコロニーが確認されたが、残りの 7 血清型では血清型ごとに概ね同様の色調を示した

(表 15)。一方で、供試した全 64 株のうち O177:H25 の全 8 株と O76:H7 の 4 株を除いた 52 株 (81.3%) については、CT を含有する培地においてコロニー形成が確認されず、発育が困難であることが明らかとなった。これら 52 株については、半量の CT が添加された平板培地にも塗抹を行ったが、発育が確認されたのは 11 株 (21.2%) のみであった。

D. 考察

EHEC は LEE 保有の有無により病原性等が異なることが知られているため、本研究では非メジャー血清群 EHEC を LEE 保有の有無に分類し、それぞれの特徴や表現型検出に有用な方法や条件を用いて解析を行った。LEE を保有しない LEE(-) 血清群 EHEC は、国内においても分離数が少なく希少な株であるため、通常、菌株の確保が困難となるが、本研究では国内全域の過去 15 年分を対象とすることで多くの株を解析することができた。

LEE(-)血清群 EHEC の HEp-2 細胞への付着株数は 19 株 (6.1%) のみであった。LEE を保有する主要な血清群の EHEC の細胞付着率は、研究対象により多少の差はあるが、74~81%程度であることから、LEE(-)血清群 EHEC の細胞付着率は LEE を保有する株の 10 分の 1 程度であることが本研究により明らかとなった。一方で、細胞付着株の重症者の割合は非付着株に比べ 2 倍以上高い値を示したことから、LEE(-)血清群 EHEC においても細胞への付着は病原性の発揮に関与している可能性もあると考えられる。

HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC 株の

解析の完全長ゲノム配列の解析により共通して巨大プラスミドの保有が確認された。しかし、本研究では、巨大プラスミド上に共通してコードされる *sub* と *saa*、さらに *cdt* についても病原性について解析を行ったが、今回解析を行った条件ではいずれも LEE(-)血清群 EHEC 感染症の重症化に関与している可能性は示唆されなかった。巨大プラスミド上には他にも共通する遺伝子が複数含まれているため他の因子についても検討を行っていくことで、重症化因子の特定につながる可能性はあると考えられるが、巨大プラスミドは HUS 症例由来株以外でも保有が確認されることから、症状別でのゲノム配列の比較や表現型の定量的な評価も行っていく必要があると考えられる。

LEE(-)血清群 EHEC の重症化に関与する因子は血清型により異なる可能性が示唆された。重症例から有意に高率に検出された遺伝子 (*cdiAB*, *gad*, *katN*, *rgdR*, *stx2*) のうち *cdiAB* および *katN* は特定の血清型において全株から検出された。さらに系統解析から一部で血清型により系統が異なっていたことも、血清型により重症化因子が異なる可能性を示唆している。しかし、本遺伝子が重症化に関与しているか評価するためには、各遺伝子の発現状況や表現型の確認など別の手法による解析が必要となる。一方で、*stx2* については全ての血清型から検出され、さらに LEE(+)マイナー血清群 EHEC の HUS 症例由来株においても全株から共通して検出されたことから、*stx2* は非メジャー血清群 EHEC においても重症化に寄与している可能性が示唆された。

LEE(-)血清群 EHEC 株の HEp-2 細胞付着株のうち 15 株 (78.9%) は細胞付着形態から付着因子を特定するのは困難であった。LEE を保有する EHEC の細胞への付着形態については、局在性付着であることが既に知られている。一方で LEE を保有しない株については細胞付着形態が多様であり、特徴的な細胞付着形態を示す EibG 以外については付着形態から細胞付着因子を特定することは困難であることが本研究により明らかとなった。さらに、死亡例を含む 3 株の HUS 症例由来株が共通して HEp-2 細胞に付着性を示したが、これら 3 株が同じ細胞付着因子により細胞付着性を示している可能性も考えられる。また、当該細胞付着性が LEE(-)血清群 EHEC 感染症の重症化に寄与している可能性もあると考えられ、本菌の細胞付着因子の特定は重要であると考ええる。

死亡例由来 LEE(-)血清群 EHEC から検出された細胞付着性は NmpC が担っていることが明らかとなった。*nmpC* に関する研究論文は乏しく、2011 年に耐熱性に関与することが報告されているが細胞付着性に関連する報告は確認されないことから EHEC の新規の細胞付着因子であると考えられる。また、培養細胞への付着性と EHEC 感染症の重症化には関連性があることが既に報告されていることや、*nmpC* が死亡例由来株から特定されたことから、本因子による細胞付着性も重症化に関与している可能性があると考えられる。一方で *nmpC* については、その分布状況や発現制御機構等不明な点が多く残されている。本因子について研究を続けることも EHEC 感染症による重症化の機序解明

に繋がると考えられる。

LEE(+)マイナー血清群 EHEC の重症化には細胞付着性以外の因子が寄与している可能性が示唆された。全 103 株を対象に実施した細胞付着性試験において付着性を示したのは 15 株のみであり、O177 株を用いた付着効率試験においても、重症者と健康者由来株の間に有意な差は認められなかった。一方で、細胞毒性試験においては HUS 症例由来株のうち 5 株が菌液接種により生細胞数が有意に低下することが確認された。そのうち 3 株は鏡検および *cdt* の検出により、CDT (細胞膨化致死毒素) が細胞数の低下に寄与している可能性が示唆されたが、残りの 2 株は *cdt* 不検出であり、細胞の形態的变化も検出されなかったことから、未特定の因子が生細胞数低下に関与している可能性も示唆された。

酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子は特定の血清型の非メジャー血清群 EHEC の重症化に寄与している可能性が示唆された。抗酸化に関与する遺伝子である *katP* および *katN* が LEE(+)マイナー血清群および LEE(-)血清群 EHEC の重症例からそれぞれ高率に検出され、またそれら遺伝子はいずれも比較的高い重症率の血清型または O 血清群から検出されることが明らかとなった。さらに HUS 症例由来 *katN* 保有 EHEC OX18:H19 株がその *katN* 破壊株に比べマクロファージ細胞内生存率が高いことも実際に確認され、抗酸化に関与する遺伝子が特定の血清型の EHEC において重症化と関連している可能性が示唆されたことから、引き続き *katN* および *katP* 保有株について解析を行

っていくことが重要であると考えられる。

国内での分離株数が多い 8 血清型の非メジャー血清群 EHEC のうち 7 血清型において CT 添加平板培地での発育が困難であることが確認された。CT は EHEC の分離培地に通常使用される選択剤である。そのため、食中毒等の事例発生時において食品等検体から CT 感受性の EHEC を含む多様な血清型の EHEC の分離を行うためには、CT 不含培地の確認も併せて行うことが重要である。一方で、非メジャー血清群を含む多様な血清型の EHEC の効率的な分離検出法を確立することは重要な課題であり、そのためには CT 以外の選択剤等に着目して有用性を評価していく必要があると考えられた。

E. 結論

非メジャー血清群 EHEC においても *stx2* が重症化に寄与している可能性が示唆された。*stx2* 以外では、酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子および NmpC が特定の血清型の EHEC 感染症の重症化に関与している可能性がある。また、食品等の検体から多様な血清型を含む EHEC を効率的に分離検出する方法を確立するためには、CT 以外の選択剤等に着目してその有用性を評価していく必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

Kubomura A, Lee K, Ohnishi M, Iyoda S,

Akeda Y, EHEC Working Group. Complete genome sequence of eight LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from patients with hemolytic-uremic syndrome. *Microbiol Resour Announc.* 2023 Dec 20:e0059123.

2) 学会発表

1. 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏 LEE非保有の腸管出血性大腸菌における細胞付着性の解析 第96回日本細菌学会総会（2023年3月16-18日）ポスター発表
2. 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏 LEE非保有の腸管出血性大腸菌の細胞付着性と全ゲノム配列解析 第166回日本獣医学会学術集会（2023年9月5-8日）
3. 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏 LEE非保有腸管出血性大腸菌感染症の重症化に関与する因子特定のための解析 第97回日本細菌学会総会（2024年8月8日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表1. HUS患者由来株のPacBio解析対象株と保有する主な病原性関連遺伝子

Strain ID	血清型	PacBio 解析株	主な病原性関連遺伝子		
			<i>saa</i>	<i>cdt</i>	<i>sub</i>
JNE082640	OX21:H19	●	+	-	+
JNE131328	O113:H21	●	+	+	+
JNE170426	OX18:H2	●	+	-	+
JNE181771	OX18:H19	●	+	-	+
JNE120393	O113:H21		+	+	+
JNE120442	O183:H18		+	-	+
JNE151685	O74:H20		+	-	+
JNE141411	OgN13:H19		+	-	+
JNE140672	O115:H10		-	-	-

表2. SNP抽出による系統樹作製を行った株

O血清群	株数
O74	10
O113	74
O115	115
O166	10
O174	51
O183	24
OX18	14
OX21	11
OUT	1

表3. ゲノム解析により病原性関連遺伝子の検出を行った株

血清型	株数	重症株数	重症率 (%)
O74:H20	7	2	28.6
O113:H21	41	2	4.9
O183:H18	23	1	4.3
OX18:H2	2	1	50
OX18:H19	7	4	57.1
OX21:H19	11	2	18.2
OgN13:H19	1	1	100
Total	92	13	14.1

表4. CHO細胞毒性試験に供試したHUS患者由来株と健康者由来株

O血清群	Strain ID	症状	保有する主な病原性関連遺伝子
O113	JNE131328	HUS	<i>sub, saa, cdt</i>
	JNE120393	HUS	<i>sub, saa, cdt</i>
	JNE130576	無し	<i>sub, saa, cdt</i>
	JNE201237	無し	<i>sub, cdt</i>
OX18	JNE170426	HUS	<i>sub, saa</i>
	JNE181771	HUS	<i>sub, saa</i>
	JNE151350	無し	<i>sub</i>
	JNE192124	無し	<i>sub</i>
O183	JNE120442	HUS	<i>sub, saa</i>
	JNE141782	無し	<i>sub</i>
	JNE141066	無し	<i>sub</i>
O74	JNE151685	HUS	<i>sub, saa</i>
	JNE192518	無し	<i>sub</i>
	JNE133336	無し	<i>sub</i>
OgN13	JNE141411	HUS	<i>sub, saa</i>

HUS, Hemolytic-uremic syndrome

表5. SNP抽出による系統樹の作製を行った株

O血清群	株数
O51	3
O70	2
O76	34
O80	7
O109	12
O172	9
O177	28
Total	95

表6. 選定した312株のLEE非保有EHEC

O血清群	株数	症状確認株数	有症者数(%)	重症者数(%)
O74	12	11	3 (27.3)	2 (18.2)
O113	74	59	15 (25.4)	2 (3.4)
O115	115	109	35 (32.1)	6 (5.5)
O163	11	11	3 (27.3)	2 (18.2)
O166	10	10	2 (20.0)	0 (0.0)
O174	51	42	5 (11.9)	2 (4.8)
O183	24	23	5 (21.7)	1 (4.3)
OX18	14	12	7 (58.3)	6 (50.0)
OUT	1	1	1 (100)	1 (100)
合計	312	278	76 (27.3)	22 (7.9)

表7. HUS患者由来株の染色体と保有するプラスミドサイズ

Strain ID	血清型	系統	染色体 (Mbp)	プラスミドサイズ (kbp)	主な共通病原因子
JNE082640	OX21:H19	B1	4.9	167, 8, 7, 2, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE131328	O113:H21	B1	5	161, 15, 7, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub, cdt</i>
JNE170426	OX18:H2	B1	5	159, 86, 7	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE181771	OX18:H19	B1	4.9	131, 89	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE120393	O113:H21	B1	5.1	161, 8, 7, 4, 3, 2, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub, cdt</i>
JNE120442	O183:H18	B2	5	161	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE151685	O74:H20	A	5	174, 61, 7	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE141411	OgN13:H19	B1	5.1	174	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>

表8. 重症例由来株から有意に検出された遺伝子

Gene	<i>p</i> -value (2-tail)
<i>cdiA</i>	0.003157
<i>gad</i>	0.003307
<i>cdiB</i>	0.004481
<i>katN</i>	0.007391
<i>rgdR</i>	0.01384
<i>stx2a</i>	0.01923

表9. ゲノム解析による各血清型大腸菌の*katN* 保有状況調査結果

血清型	解析株数	保有率 (%)	備考
O157:H7	1548	99.9	LEE(+)
O5:H9	31	100	LEE(+)
O172:H25*	15	100	LEE(+), 重症率50%
O165:H25	17	94.1	LEE(+)
OX18:H19*	22	90.9	LEE(-), 重症率57.1%
O177:H25*	17	88.2	LEE(+), 重症率45.8%
O3:H21	3	100	LEE(-)
OX25:H8	2	100	LEE(-)
O148:H10	1	100	LEE(-)
O157:H19	1	100	LEE(+)
O154:H31	1	100	LEE(-)
O50/O2:H5	1	100	LEE(-)
O50/O2:H6	5	60	LEE(-)
O74:H25	2	50	LEE(+)
O104:H2	2	50	LEE(-)
OgN5:H16	2	50	LEE(-)
O8:H8	3	33.3	Non-EHEC
O130:H11	7	28.6	LEE(-)
O8:H19	15	26.7	LEE(-)
OSB17:H19	16	6.3	LEE(-)
O174:H21	25	4	LEE(-)

*本研究対象血清型

表10. 細胞に付着した株の血清型および各株数

O血清	H血清	細胞付着 株数	<i>eibG</i> 保有株数
O74	HUT	1	0
O113	H21	5	0
O115	H10	2	0
O166	H28	1	0
O174	H2	1	1
	H8	1	0
	H20	1	0
O183	H18	5	4
OX18	H2	1	0
	H19	1	0
Total		19	5

HUT, H-untypable

表11. Tn-seq解析により選定された30遺伝子

locus_tag	gene	description	output/input
LOCUS_00150	<i>nhaA</i>	pH-dependent sodium/proton antiporter	0.1
LOCUS_01680	<i>glnD</i>	uridylyltransferase	0.2
LOCUS_05580	<i>nmpC</i>	outer membrane porin protein	0.2
LOCUS_07630	<i>tolB</i>	translocation protein TolB	0.1
LOCUS_09230	-	hypothetical protein	0.2
LOCUS_11710	<i>plsX</i>	phosphate acyltransferase	0.2
LOCUS_12020	<i>ycfZ</i>	inner membrane protein	0.2
LOCUS_12350	<i>minD</i>	cell division inhibitor MinD	0.1
LOCUS_12360	<i>minC</i>	septum site-determining protein MinC	0.2
LOCUS_14010	<i>acnA</i>	aconitate hydratase 1	0.2
LOCUS_14160	<i>sapF</i>	antimicrobial peptide ABC transporter ATPase	0.1
LOCUS_14170	<i>sapD</i>	antimicrobial peptide ABC transporter ATPase	0.2
LOCUS_14180	<i>sapC</i>	antimicrobial peptide transport ABC transporter permease	0.1
LOCUS_14190	<i>sapB</i>	antimicrobial peptide transport ABC transporter permease	0.1
LOCUS_17130	<i>nth</i>	endonuclease III	0.2
LOCUS_17540	<i>pykF</i>	pyruvate kinase	0.2
LOCUS_24910	<i>pta</i>	phosphate acetyltransferase	0.1
LOCUS_27150	<i>ppk</i>	polyphosphate kinase	0.2
LOCUS_27270	<i>bamB</i>	BamABCDE complex OM biogenesis lipoprotein	0.2
LOCUS_27870	<i>rseA</i>	anti-sigma factor	0.2
LOCUS_29240	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma S factor RpoS	0.2
LOCUS_30230	<i>recD</i>	exonuclease V alpha subunit RecD	0.2
LOCUS_30240	<i>recB</i>	exonuclease V beta subunit RecB	0.1
LOCUS_30260	<i>recC</i>	exonuclease V gamma subunit RecC	0.1
LOCUS_31490	<i>tktB_2</i>	transketolase	0.2
LOCUS_33810	<i>deaD</i>	ATP-dependent RNA helicase	0.2
LOCUS_38170	<i>waaF</i>	heptosyltransferase II	0.1
LOCUS_42060	<i>oxyR</i>	oxidative and nitrosative stress transcriptional regulator	0.1
LOCUS_44070	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	0.2
LOCUS_44800	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	0.2

表12. ゲノム解析により病原性関連遺伝子の検出を行った株

O血清群	H抗原	株数	重症率 (%)
O177	H25, H45, H11	28	42.9
O76	H7	9	44.4
O172	H25	8	50
O109	H21, H10	7	14.3
O80	H2	6	16.7
O51	H49	3	33.3
O70	H11	2	50
合計		63	38.1

表13. 重症例由来株から有意に高率に検出された遺伝子

Gene	<i>p</i> -value (2-tail)
<i>katP</i>	0.022
IncFIB	0.024
<i>tssF</i>	0.028
<i>espJ</i>	0.03
<i>upaG/ehaG</i>	0.044

表14. LEE保有マイナー血清群EHECの細胞付着性試験結果

O血清	株数	細胞付着株数 (%)
O51	5	0
O70	2	0
O76	34	0
O80	7	2 (28.6)
O109	16	0
O172	12	0
O177	27	13 (46.4)

表15. 非メジャー血清群EHECの血清型別平板培地発育状況

分類	血清型 (MLST)	株数	CT不含有培地						CT含有培地			
			DHL	SS	McConkey	XM-G	Vi RX O26 寒天培地	クロモアガー STEC	クロモアガー STEC	CIX 寒天培地	Vi EHEC 寒天培地	XM-EHEC 寒天培地
LEE(+)/マイナー EHEC	O177:H25 (ST342)	4	赤	赤	赤	紫	青緑	藤色	藤色	青緑	褐色/えんじ色	紫
	O177:H25 (ST659)	4	白	白	白	青/白	青緑	白～藤	白～藤	紫	緑/えんじ色	青紫
	O76:H7	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	藤色*	群青*	紫～緑*	青紫*
LEE(-)EHEC	O172:H25	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	O113:H21	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	OX21:H19	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	OX18:H19	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	O183:H18	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	O115:H10	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-

MLST, Multilocus sequence typing; -, 全株発育なし; *半数の4株は発育なし

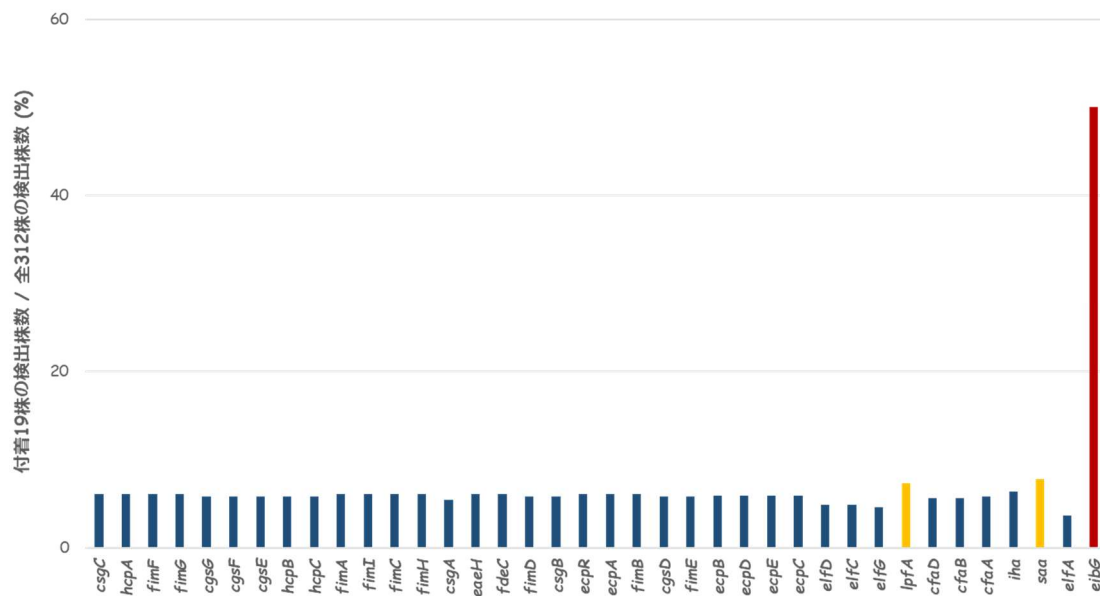


図 1. LEE 非保有 EHEC の細胞付着株と全 312 株の付着関連遺伝子保有率

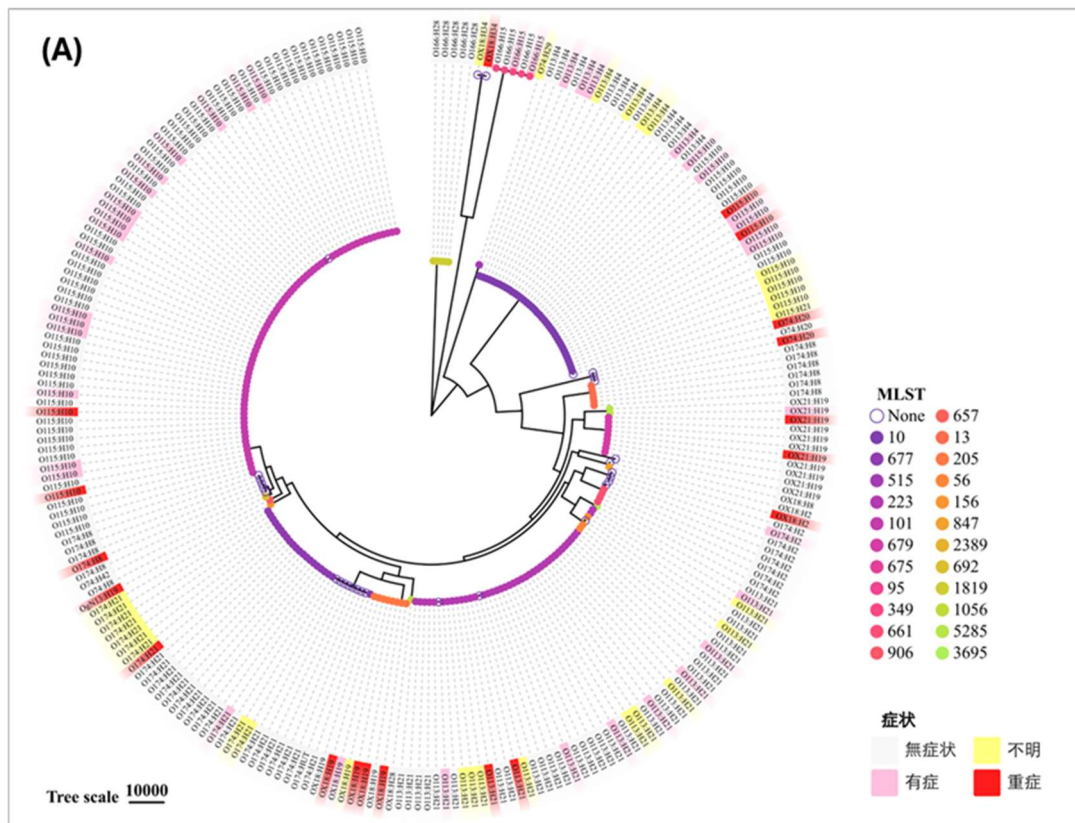


図 2. LEE 非保有 EHEC 株の SNP 抽出による系統解析
菌株ノードの色は MLST を示し、菌株番号の色は症状を示す

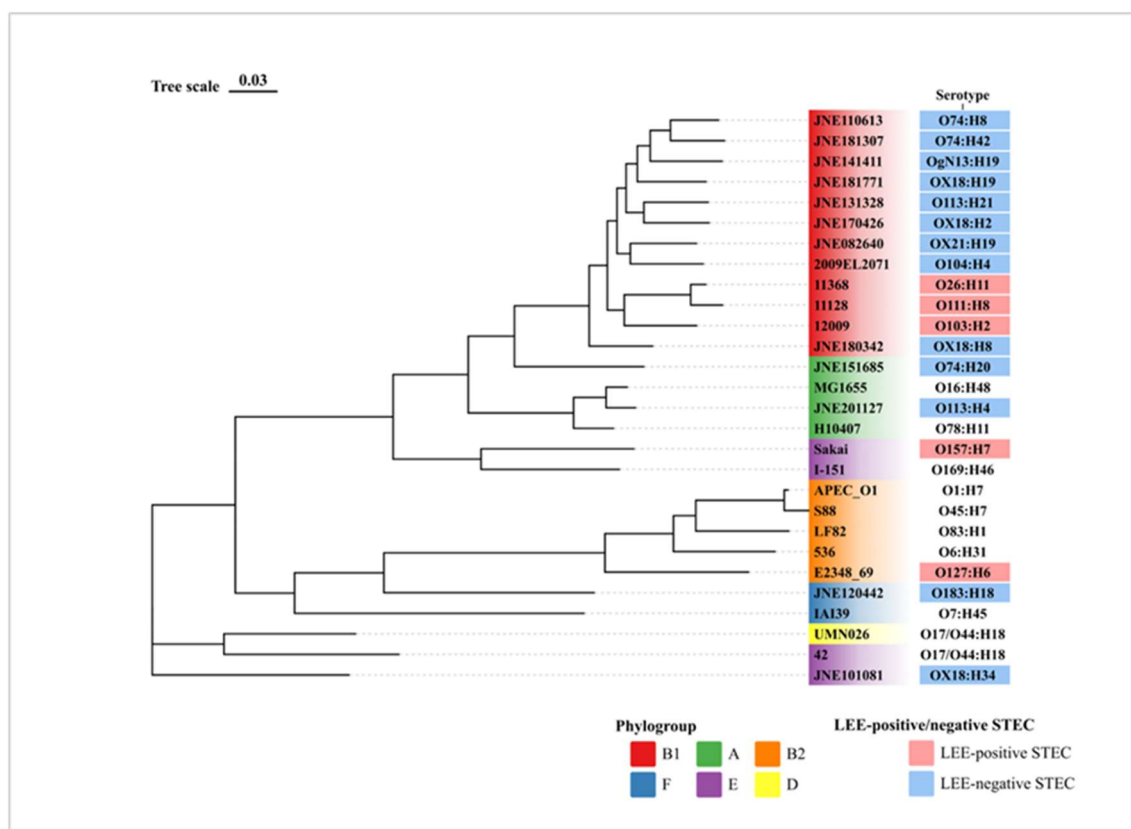


図 3. 各血清型大腸菌の SNP 抽出による系統解析

菌株番号の色は Phylogroup を示し、Serotype の色は LEE 保有の有無を示す

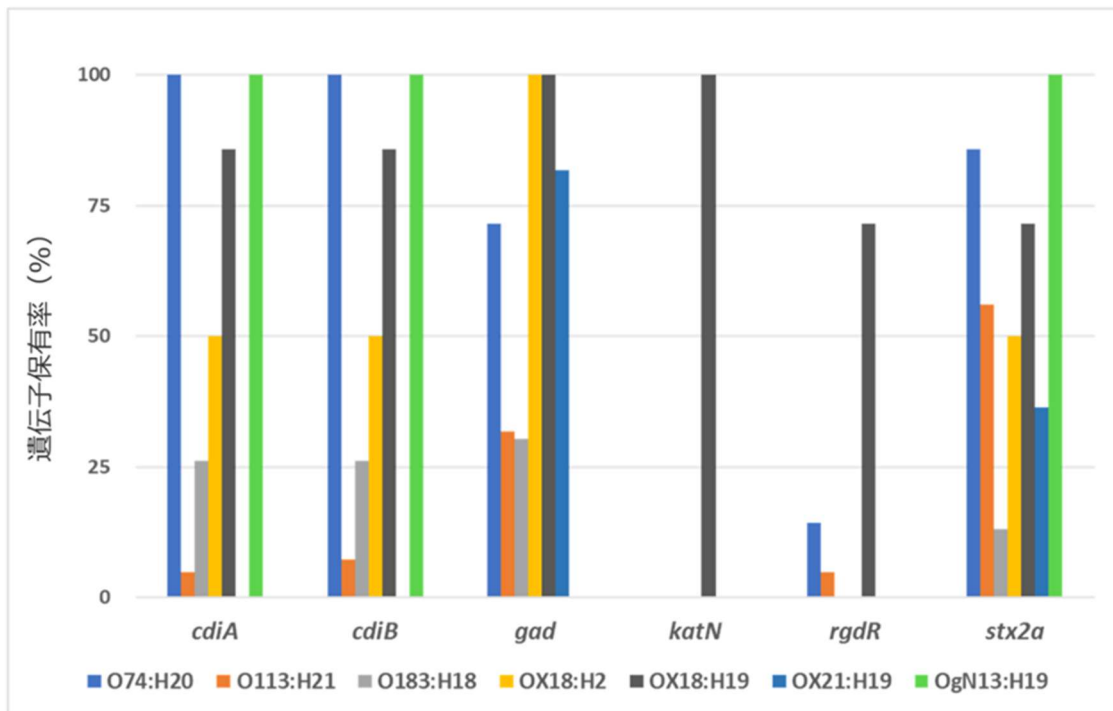


図 4. LEE 非保有 EHEC における血清型別の各遺伝子保有率

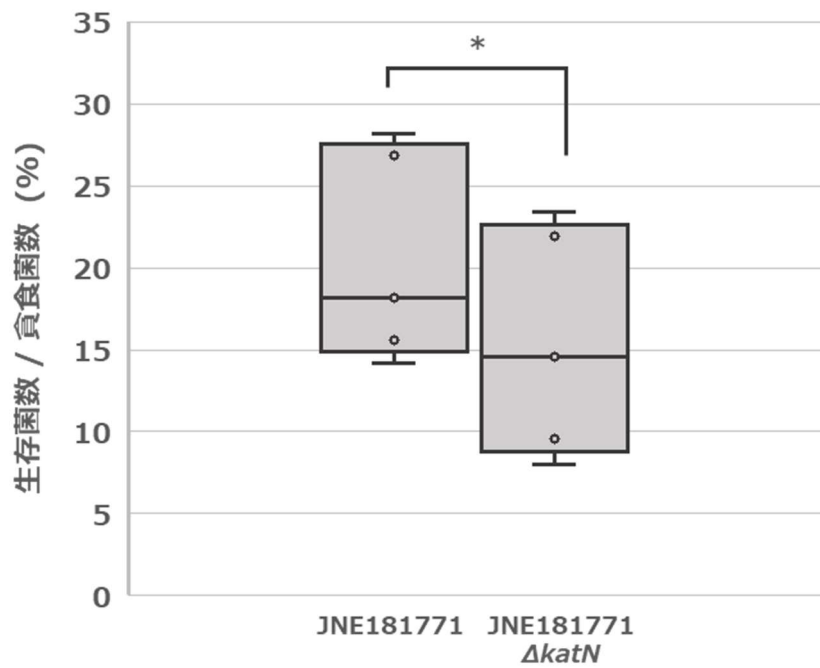
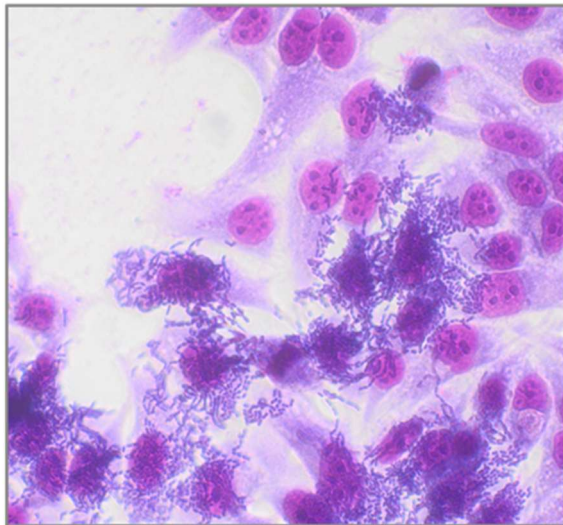


図 5. HUS 症例由来 *katN* 保有 EHEC (JNE181771) とその *katN* 破壊株 (JNE181771 $\Delta katN$) の RAW264.7 細胞内の 5 時間後の生存率 (* $p = 0.017$)

(A)



(B)

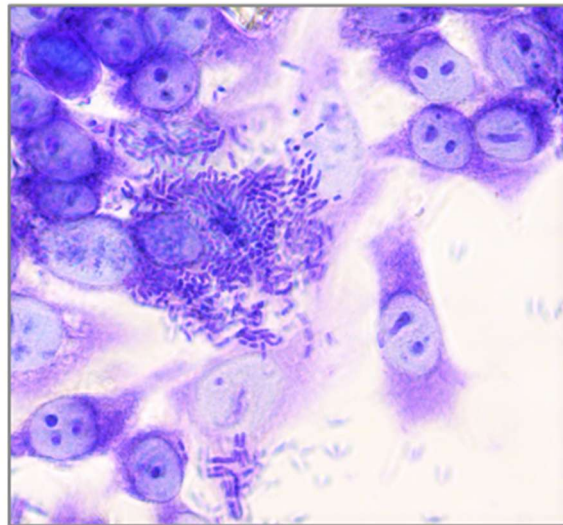


図 6. HEp-2 細胞への付着性試験により Chain-like adherence (CLA) を示した O183:H18 株 (A) と CLA 以外の付着形態を示した O174:H2 株 (B)

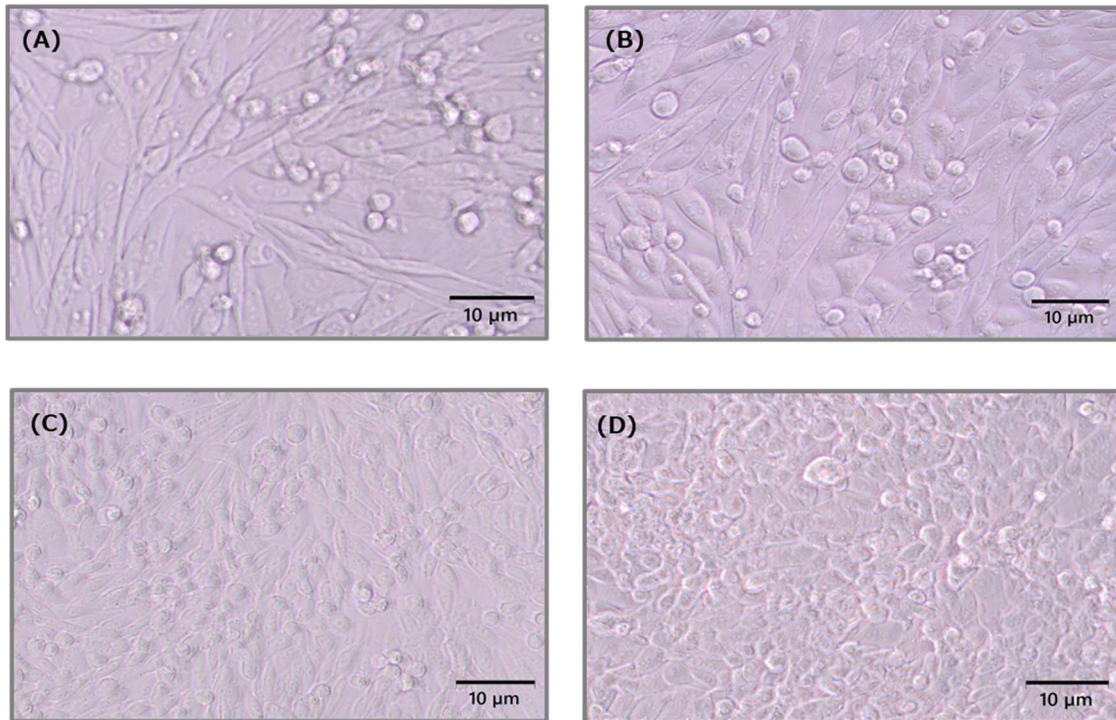


図 7. CHO 細胞の細胞伸長試験により細胞伸長が認められた *cdt* 保有株 JNE131328 (A) と JNE120393 (B)、および陰性対照の *cdt* 非保有株 JNE082640 (C) と菌液非接種コントロール (D)

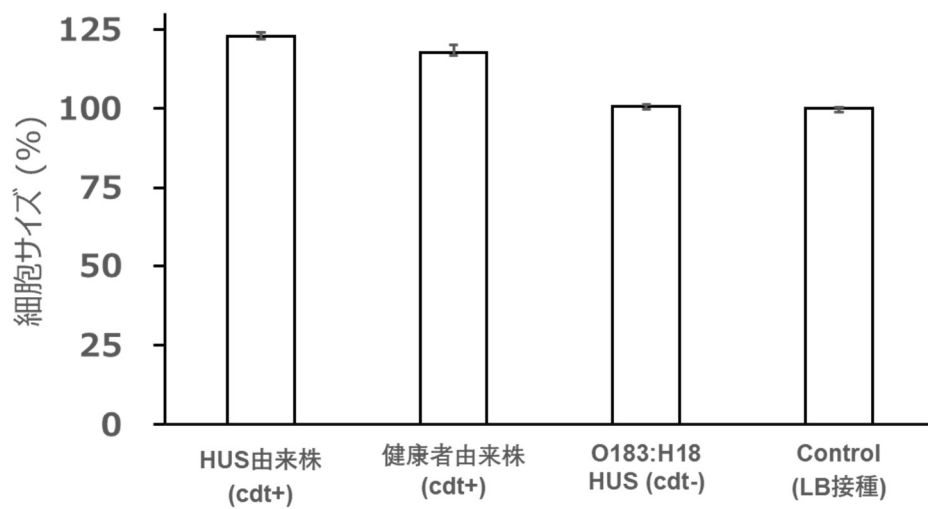


図 8. HUS 症例由来株と健康者由来株の菌液を接種した CHO 細胞の平均細胞サイズ測定結果

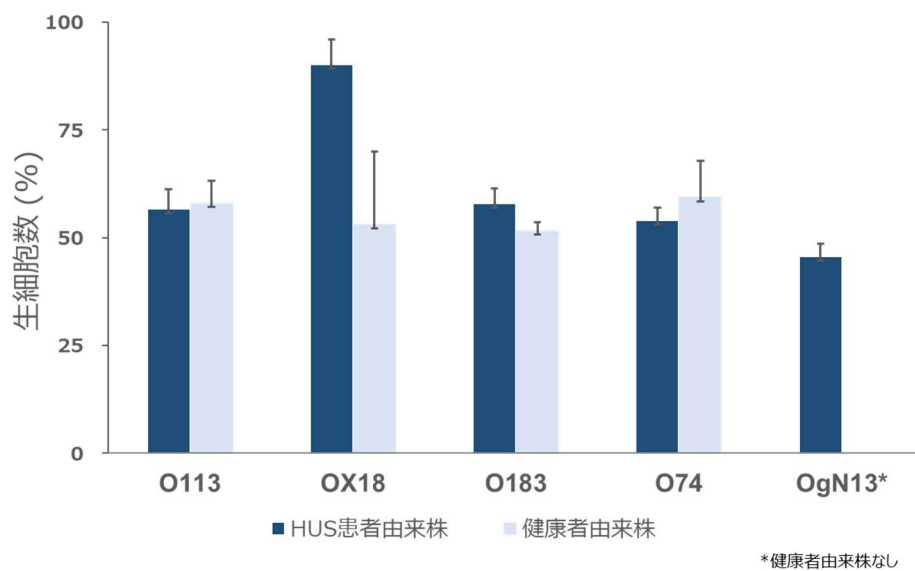


図 9. HUS 症例由来株と健康者由来株の菌液を接種した CHO 細胞の O 血清群別生細胞数

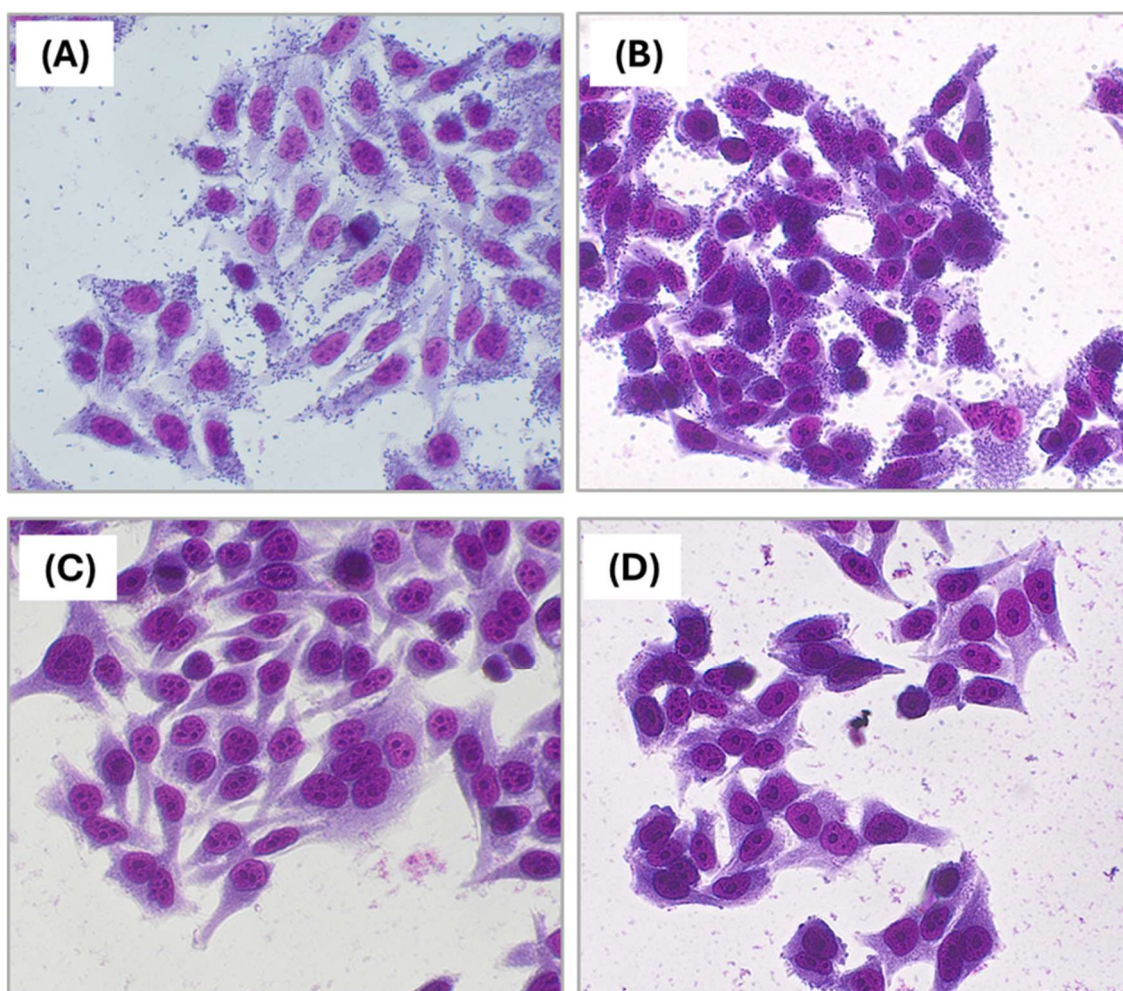


図 10. JNE170426 株のプラスミド (pJNE170426-1, pJNE170426-2) にカナマイシン耐性を付与した株 (A, B)、および各プラスミドを DH10B に導入した株 (C, D) の HEp-2 細胞付着像

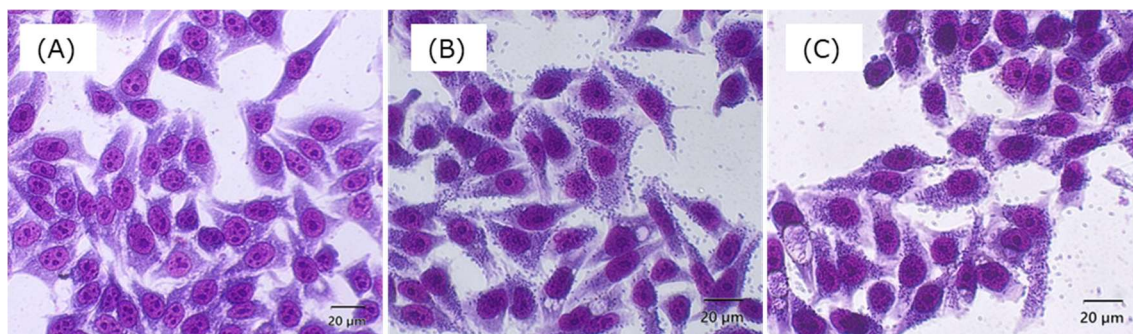


図 11. JNE170426 Δ *nmpC* (A) 、JNE170426 Δ *nmpC*/pMW119-*nmpC* (B) および DH10B/pMW119-*nmpC* (C) の HEp-2 細胞付着像

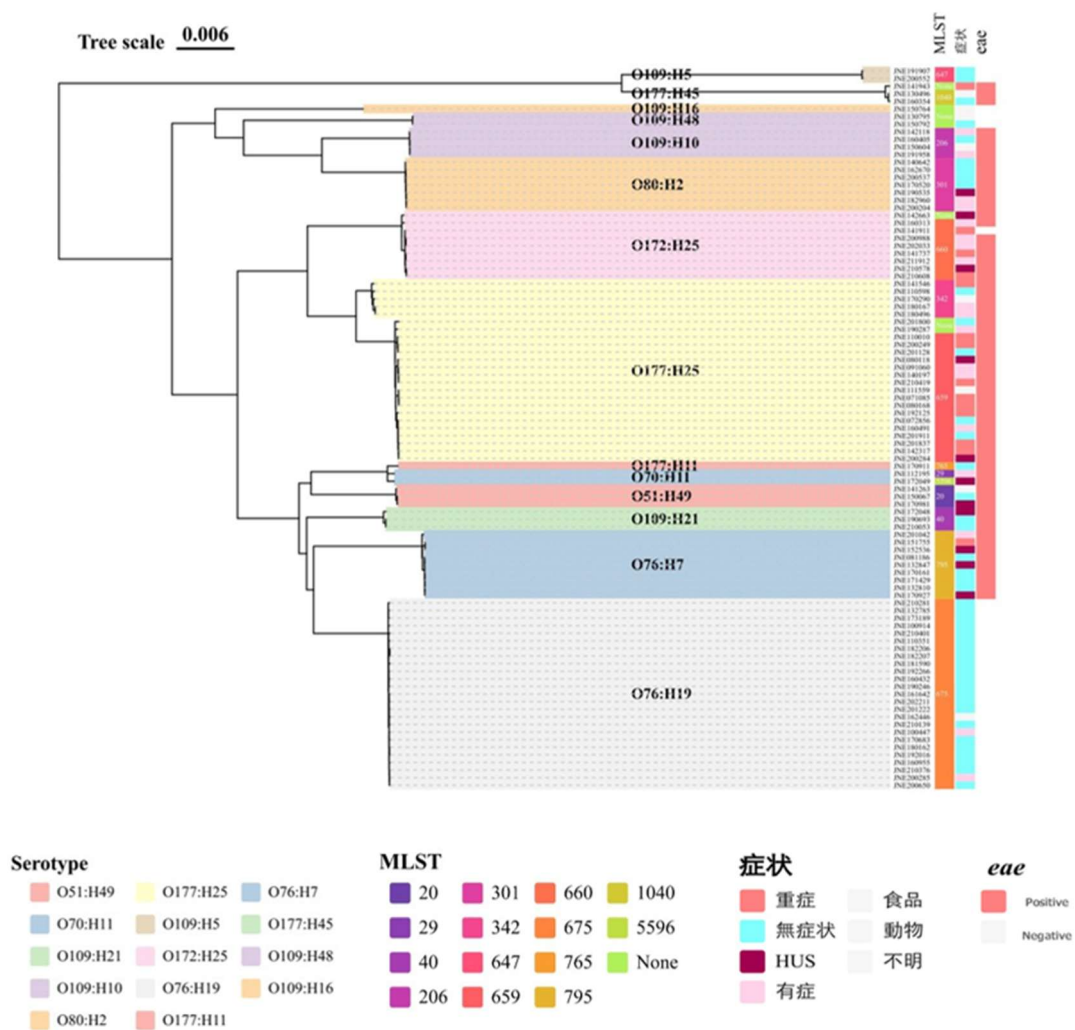


図 12. LEE 保有マイナーEHEC 株の SNP 抽出による系統解析
系統樹の枝の色は血清型を示している

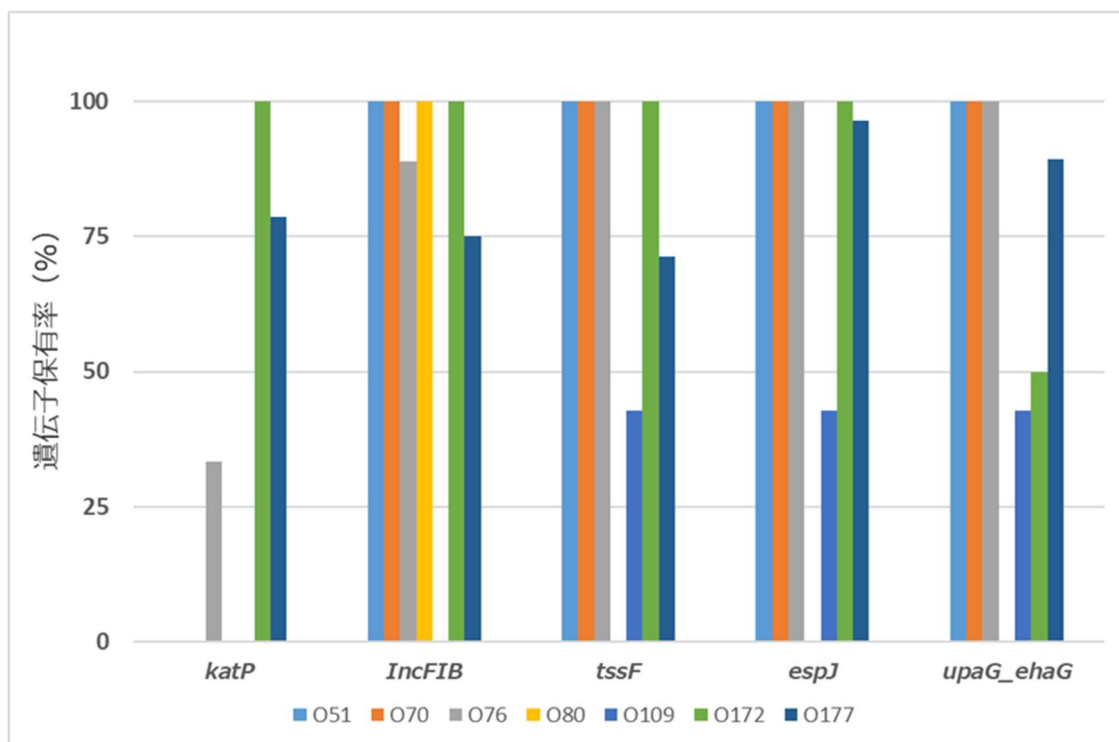


図 13. LEE 保有マイナーEHEC における血清型別の各遺伝子保有率

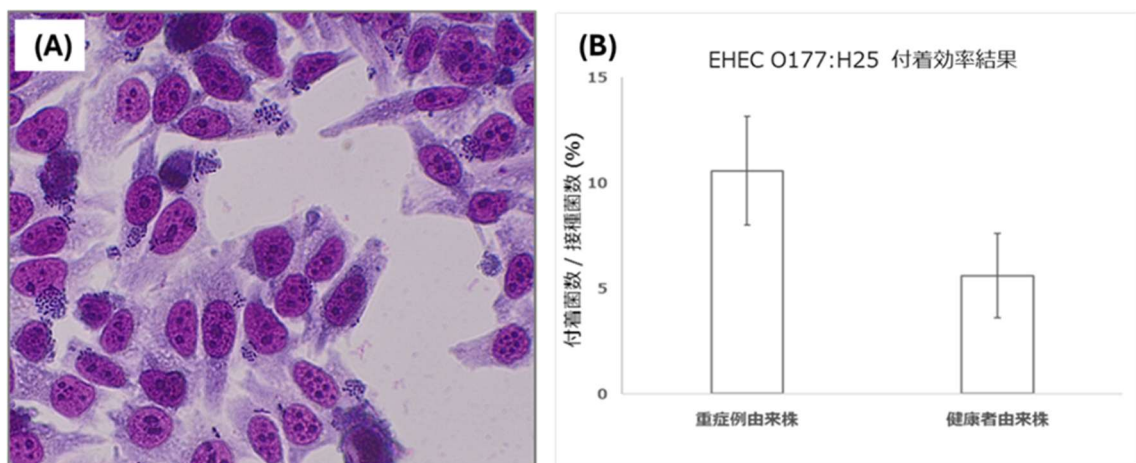


図 14. EHEC O177:H25 の細胞付着像 (A) 、および重症例と健康者由来株の細胞付着効率結果 (B)

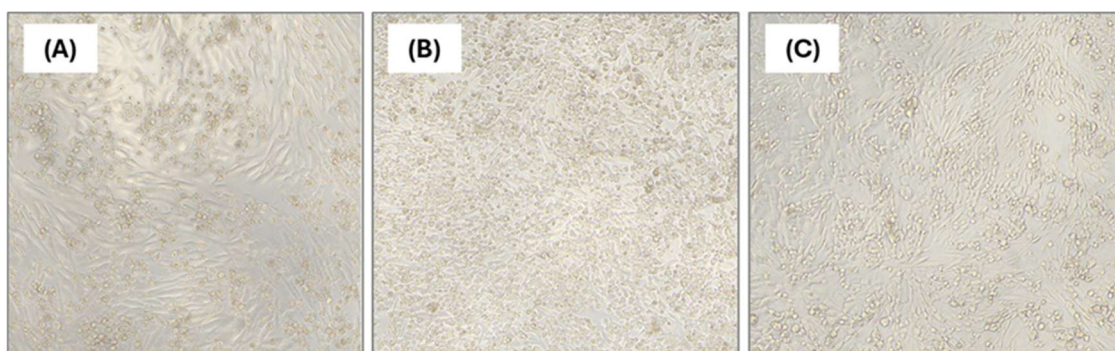


図 15. *cdt* 陽性 EHEC (A)、*cdt* 陰性 EHEC (B)、および非病原性株 (C) の菌液を接種した CHO 細胞 (400 倍画像)

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「非メジャー血清群腸管出血性大腸菌の重症化因子の同定及び
新たな分離検出法確立のための研究」
令和 4-6 年度 分担研究報告書

分担研究課題

「非メジャー血清群腸管出血性大腸菌のゲノム解析」

研究分担者 李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究要旨

主要な O 血清群ではない腸管出血性大腸菌（EHEC）の病原性解明のため、HUS を起こした O 血清群の株を対象に全ゲノム配列解析による系統解析、および網羅的な病原性関連遺伝子検出により重症例由来株から高率に検出される遺伝子の特定を行った。解析は EHEC の病原性遺伝子領域である LEE 保有の有無（LEE(+)マイナー血清群および LEE(-)血清群）に分類して実施した。

LEE(-)血清群 EHEC においては、系統解析により同じ O 血清群でも H 抗原が異なる場合には必ずしも近縁ではないことが示され、血清型により病原性等も異なる可能性が考えられた。網羅的な遺伝子検出により重症例由来株から *cdiAB*, *gad*, *katN*, *rgdR*, *stx2* が有意に高率に検出され、*stx2* は全ての血清型から検出された。LEE(+)マイナー血清群 EHEC においては、系統解析により O76 および O109 の一部の H 抗原型で LEE 非保有系統も確認されたが、そのうち LEE 保有系統のみ重症例由来株が含まれていた。また、HUS 症例由来株の全株から *stx2* が検出され、非メジャー血清群 EHEC においても *stx2* は重症化に寄与している可能性が示唆された。網羅的な病原遺伝子検出により重症例由来株から高率に検出された遺伝子のうち、*katP* は重症率の高い O 血清群からのみ検出され、LEE(-)血清群 EHEC の重症例から高率に検出された *katN* においても、重症率が高い複数の血清型が高率に保有していることが明らかとなり、抗酸化に関与する因子は非メジャー血清群 EHEC のうち特定の血清型において重症化に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は食中毒や腸管感染症の原因微生物の 1 つであり、重症例では血便や溶血性尿毒症症候群（HUS）を発症し、死者も報告されることから公衆衛生上重要な微生物である。

国内で分離される EHEC の 90%以上は、主要 7 血清群（O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165）であるが、主要血清群ではない血清群（以下、非メジャー血清群）についても重症例や死亡例が国内外で報告されていることから、非メジャー血清群の EHEC についても着目していく必要

性がある。

非メジャー血清群 EHEC は病原性遺伝子領域 locus of enterocyte effacement (LEE) を保有しない血清群 (LEE(-)血清群) と、LEE を保有するが主要ではない血清群 (LEE(+))マイナー血清群) の EHEC に分類することができる。

本研究では、国内で分離された過去 15 年分の非メジャー血清群 EHEC について LEE(-)血清群および LEE(+))マイナー血清群に分けて全ゲノム配列(whole-genome sequence: WGS)の取得を行う。さらに取得した WGS を用いてゲノム解析を行い系統解析による高病原性系統の抽出、および網羅的な病原性関連遺伝子の検出等により重症例と関連する遺伝子の特定を試みる。

B. 研究方法

1. LEE(-)血清群 EHEC の解析

1-1. WGS 解析

2007-2021 年に国内で分離された LEE(-)血清群 EHEC のうち、HUS を起こした O 血清群を中心とした 9 種類の O 血清群 (O74, O113, O115, O163, O166, O174, O183, OX18, OUT) に属する 328 株を解析対象株とした。328 株のうち WGS 解析が未実施である 209 株について、HiSeqX (illumina) を用いて WGS 解読を行い、得られたシーケンスデータを使用して網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行うことで確実に LEE(-)血清群 EHEC 研究対象株の選定を行った。遺伝子検出方法は、アセンブル後のドラフトゲノムを用いて Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>)、お

よび The Virulence Factor Database (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) で検出されている病原性関連遺伝子を中心とした独自のデータベース上の遺伝子を対象に BLASTn にてアライメント長 60%以上、類似性 90%以上の遺伝子が検出された場合を保有と判定した。さらに検出された病原性関連遺伝子のうち細胞付着関連遺伝子に着目し、保有状況の確認を行った。

1-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

1-1 で取得した WGS データを使用して Multilocus sequence typing (MLST) による ST の特定、および SNP 抽出による系統樹の作製を行った (表 1)。さらに、重症化に関与する可能性のある遺伝子を特定するため、HUS 症例由来株と同じ血清型 (O74:H20, O113:H21, O183:H18, OX18:H2, OX19:H19, OX21:H19, OgN13:H19) であることが確認された 92 株 (表 2) を重症例から分離された 13 株 (重症株) とそれ以外の 79 株 (非重症株) に区分して遺伝子保有状況の比較解析を行い、カイ二乗検定において重症例から有意に高率に検出される遺伝子の抽出を行った。抽出された各遺伝子については、解析対象とした 92 株の血清型別保有率も確認した。

1-3. ゲノム解析による *katN* 保有状況調査

1-2 で重症例から高率に検出された *katN* について、所内に保管される non-EHEC を含む大腸菌 4522 株 (287 血清型) を対象にゲノム解析により保有状況調査

を行った。

1-4. 完全長ゲノム配列の取得

HUS 症例由来株 9 株のうち 4 株について PacBio Sequel IIe による解読を行い (表 3)、得られたロングリードシーケンスおよびショートリードシーケンスを Tricycler および Unicycler を用いたハイブリッドアセンブリで完全長ゲノム配列の決定を行った。取得した完全長ゲノム配列から保有するプラスミドのサイズやプラスミド上にコードされる主な病原性関連遺伝子等の確認を行った。

2. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の解析

2-1. WGS 解析

2007-2021 年に国内で分離された主要 7 血清群以外の O 血清群に属する LEE(+)血清群 EHEC で HUS を起こした 7 種類の O 血清群 (O51, O70, O76, O80, O109, O172, O177) に属する 103 株を解析対象株とし、HiSeqX (illumina) を用いて WGS 解読を行った。さらに、対象株のうち HUS 症例由来株である 11 株についてはゲノム解析により EHEC の主な毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *cdt*, *sub*) の保有状況の確認を行った。

2-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

2-1 で取得した WGS データの解析により、HUS 症例由来株と関連する 7 種類の O 血清群であった 95 株 (表 4) を対象として、MLST による ST の特定、および SNP 抽出による系統解析を行った。さらにゲノム解析により *eae* 保有状況の特定も行った。さらに、LEE(+)マイナー血清群 EHEC の重症化に関与する遺伝子を特

定するため、95 株のうち *eae* が検出された株を LEE 保有株として網羅的な病原性関連遺伝子検出を行った。病原性関連遺伝子検出は、1-1 と同様の方法で行った。さらに検出された病原遺伝子について、1-2 と同様の方法により重症例から有意に高率に検出される遺伝子を特定した。特定された遺伝子について O 血清群別の保有率も算出した。

C. 研究結果

1. LEE(-)血清群 EHEC の解析

1-1. WGS 解析

328 株の WGS から網羅的に保有遺伝子の検出を行い、312 株の LEE(-)血清群 EHEC の選定を行った。選定された株で症状が確認可能であった 278 株のうち 76 株 (27.3%) が有症例、22 株 (7.9%) が血便等の重症例由来株であった (表 5)。312 株からは 293 種類の病原性関連遺伝子が検出され、そのうち 53 種類は細胞付着関連遺伝子であった (図 1)。1 つの株からは 18~46 種類の付着関連遺伝子が検出され、LEE(-)血清群 EHEC に特異的な付着関連遺伝子である *saa* と *eibG* はそれぞれ 90 株 (28.8%) と 8 株 (2.6%) から検出された。さらに、検出された 53 種類の細胞付着関連遺伝子を機能的に関連する遺伝子を 1 つにまとめることで 17 の遺伝子に分類し、各遺伝子の検出状況を O 血清群別に図 2 に示した。17 遺伝子のうち 7 遺伝子は全ての O 血清群から検出されたが、一方で *paa* (O115) や *fl7* (O174) は特定の O 血清群からのみ検出され、*elf* (O183)、*lpfA* (O166)、*saa* と *iha* (O115) は特定の遺伝子でのみ不検出となった。

1-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

系統解析により高病原性が示唆される系統は確認されなかった（図 3）。しかし、各血清型の代表 1 株と代表的な大腸菌株について系統解析を行った結果、同じ O 血清群であっても H 抗原型が異なる場合は必ずしも近縁ではないことが確認され、病原性等の特徴も異なる可能性が考えられた（図 4）。HUS 症例由来株と同じ血清型に属していた株について網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行った結果、92 株から 228 種類の遺伝子が検出された。さらに重症株と非重症株に区分して遺伝子保有状況を比較した結果、重症株から *cdiAB*, *gad*, *katN*, *rgdR*, *stx2* が有意に ($p < 0.05$) 高率に検出された（表 6）。検出された遺伝子のうち *stx2* は全ての血清型から検出され、*cdiAB* と *katN* についてはそれぞれ O74:H20 と OX18:H19 の全株から検出された（図 5）。

1-3. ゲノム解析による *katN* 保有状況調査

5422 株を対象に保有状況調査を行った結果、21 の血清型（OUT および HUT 除く）から *katN* が検出された（表 7）。本研究対象血清型では O172:H25, O177:H25, OX18:H19 の 3 つの血清型が含まれており、重症率はそれぞれ 50.0%, 45.8%, 57.1% であった。

1-4. 完全長ゲノム配列の取得

HUS 症例由来株についてロングリードシーケンスを行い、新たに 4 株の完全長ゲノム配列を決定した。さらに、既に取

得済みの 4 株と合わせた 8 株の HUS 症例由来株の完全長ゲノム配列を使用して、保有する染色体やプラスミドのサイズ等確認を行った結果、いずれの株も巨大プラスミド (131~174kb) の保有が確認され、プラスミド上には共通して *saa* や *espP* など複数の病原性関連遺伝子が検出された（表 8）。

2. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の解析

2-1. WGS 解析

HUS 症例由来 11 株を対象に EHEC の主な毒素遺伝子を検出した結果、全ての株から *stx2* が検出され、*ehx* と *cdt* はそれぞれ 8 株および 3 株から検出されたが、*sub* はいずれの株からも検出されなかった。

2-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

系統解析により LEE(+)マイナー血清群 EHEC においても、同じ O 血清群のうち H 抗原型が異なる場合は必ずしも近縁ではなく、ST も異なることが確認された（図 6）。また、O76 および O109 においては H 抗原型の違いにより *eae* 保有の有無が異なり、いずれも *eae* 保有系統からのみ HUS 発症例および重症例が確認された。*eae* 不検出株等を除いた 63 株の LEE(+)マイナー血清群 EHEC 株（表 9）を対象として網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行った結果、63 株から 309 種類の遺伝子が検出された。さらに 63 株のうち 24 株を重症株、39 株を非重症株に区分して遺伝子保有状況を比較した結果、重症株から *katP*, *IncFIB*, *tssF*, *espJ*, *upaG/ehaG* が有意に ($p < 0.05$) 高率に検出された（表 10）。O 血

血清群別の遺伝子保有率では、*katP* は比較的重症率の高い 3 つの O 血清群 (O177, O172, O76) からのみ保有が確認された (図 7)。

D. 考察

LEE 保有の有無により EHEC の病原性機序や遺伝子保有状況は異なることが知られているが、本研究において HUS 症例由来株を対象とした EHEC の主な毒素遺伝子の検出では、LEE(-)血清群 EHEC の 8 株から検出された *sub* が、LEE(+)マイナー血清群 EHEC の 11 株では不検出になるなど、HUS 症例由来株においても一部の遺伝子で保有状況が異なることが確認された。さらに、HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の完全長ゲノム配列の解析により、共通して巨大プラスミドの保有が確認された。さらに巨大プラスミド上には複数の共通する病原性関連遺伝子が検出されたことから、巨大プラスミドが LEE(-)血清群 EHEC の重症化に関与している可能性がある。しかし、巨大プラスミドの保有は HUS 症例由来株以外でも確認されていることから、巨大プラスミドの重症化への寄与については、症状別にゲノム配列を比較するなどの詳細な解析が必要であると考えられた。

LEE(-)血清群 EHEC の各解析対象株から複数の細胞付着関連遺伝子が検出され、一部は O 血清群により保有状況が異なる可能性が示唆された。しかし、検出された各細胞付着関連遺伝子が発現し、実際に細胞への付着性に寄与するかについては、別の手法で検証し確認を行う必要がある。また、O 血清群別の保有状況では O115

のみ *saa* と *iha* が不検出となった。*saa* や *iha* は巨大プラスミド上にコードされている遺伝子であるため、O115 においては巨大プラスミドを保有しない可能性も示唆された。

LEE(-)血清群 EHEC の重症化に関与する因子は血清型により異なる可能性が示唆された。系統解析において、血清型により系統が異なることが示唆されたことから、重症化因子も血清型により異なる可能性が考えられる。また網羅的な遺伝子検出により重症例から高率に検出された *cdiAB* および *katN* は特定の血清型からのみ検出された。しかし、これら遺伝子が重症化に関与しているか評価するためには、各遺伝子の発現状況や表現型の確認など別の手法による解析が必要となる。一方で、*stx2* については全ての血清型から検出され、また、LEE(+)マイナー血清群 EHEC の HUS 症例由来株の全株から共通して検出されたことから、*stx2* は非メジャー血清群 EHEC においても重症化に寄与している可能性が示唆された。

同一 O 血清群では *eae* 保有系統の方が病原性は高い傾向が本研究においても示唆された。*eae* 保有株は、LEE 保有株であると考えられるため、LEE 領域内の他の複数の病原性関連遺伝子も併せて保有していることが示唆される。下痢原性大腸菌の病原性と保有する病原遺伝子数に関連性があることも既に報告されており、本研究においても LEE(+)マイナー血清群 EHEC から検出される病原性関連遺伝子の種類 (309 種類) は、LEE(-)血清群 EHEC (228 種類) よりも多い。また O76 および O109 において、HUS 症例や重症例が

eae 保有系統からのみ確認されるなど *eae* 非保有系統に比べ病原性が高いことが示唆された。

酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子は特定の血清型の非メジャー血清群 EHEC において、重症化との関連が示唆された。重症例から高率に検出されたカタラーゼ-ペルオキシダーゼをコードする *katP*、およびカタラーゼ遺伝子の1つである *katN* が確認された。さらに、これら遺伝子はいずれも本研究対象株のうち比較的重症率の高い O 血清群または血清型からのみ検出されることも明らかとなった。そのため、非メジャー血清群 EHEC から検出されるカタラーゼ関連遺伝子は重症化因子の1つである可能性も示唆されるが、実際にこれらの遺伝子が発現し酸化ストレス防御に寄与しているかについては、別の手法により解析を行う必要があると考える。

E. 結論

非メジャー血清群においても同一 O 血清群では *eae* 保有系統の方が病原性が高い傾向が示唆された。また非メジャー血清群の EHEC においても *stx2* が重症化に寄与している可能性が示唆され、さらに特定の血清型の EHEC においては酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子が重症化と関連している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

Kubomura A, Lee K, Ohnishi M, Iyoda S, Akeda Y, EHEC Working Group. Complete genome sequence of eight LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from patients with hemolytic-uremic syndrome. *Microbiol Resour Announc.* 2023 Dec 20:e0059123.

2) 学会発表

- 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏 LEE非保有の腸管出血性大腸菌における細胞付着性の解析 第96回日本細菌学会総会（2023年3月16-18日）ポスター発表
- 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏 LEE非保有の腸管出血性大腸菌の細胞付着性と全ゲノム配列解析 第166回日本獣医学会学術集会（2023年9月5-8日）
- 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏 LEE非保有腸管出血性大腸菌感染症の重症化に関与する因子特定のための解析 第97回日本細菌学会総会（2024年8月8日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし

表1. SNP抽出による系統樹作製を行った株

O血清群	株数
O74	10
O113	74
O115	115
O166	10
O174	51
O183	24
OX18	14
OX21	11
OUT	1

表2. ゲノム解析により病原性関連遺伝子の検出を行った株

血清型	株数	重症株数	重症率 (%)
O74:H20	7	2	28.6
O113:H21	41	2	4.9
O183:H18	23	1	4.3
OX18:H2	2	1	50
OX18:H19	7	4	57.1
OX21:H19	11	2	18.2
OgN13:H19	1	1	100
Total	92	13	14.1

表3. HUS患者由来株のPacBio解析対象株と保有する主な病原性関連遺伝子

Strain ID	血清型	PacBio 解析株	主な病原性関連遺伝子		
			<i>saa</i>	<i>cdt</i>	<i>sub</i>
JNE082640	OX21:H19	●	+	-	+
JNE131328	O113:H21	●	+	+	+
JNE170426	OX18:H2	●	+	-	+
JNE181771	OX18:H19	●	+	-	+
JNE120393	O113:H21		+	+	+
JNE120442	O183:H18		+	-	+
JNE151685	O74:H20		+	-	+
JNE141411	OgN13:H19		+	-	+
JNE140672	O115:H10		-	-	-

表4. SNP抽出による系統樹の作製を行った株

O血清群	株数
O51	3
O70	2
O76	34
O80	7
O109	12
O172	9
O177	28
Total	95

表5. 選定した312株のLEE非保有EHEC

O血清群	株数	症状確認株数	有症者数(%)	重症者数(%)
O74	12	11	3 (27.3)	2 (18.2)
O113	74	59	15 (25.4)	2 (3.4)
O115	115	109	35 (32.1)	6 (5.5)
O163	11	11	3 (27.3)	2 (18.2)
O166	10	10	2 (20.0)	0 (0.0)
O174	51	42	5 (11.9)	2 (4.8)
O183	24	23	5 (21.7)	1 (4.3)
OX18	14	12	7 (58.3)	6 (50.0)
OUT	1	1	1 (100)	1 (100)
合計	312	278	76 (27.3)	22 (7.9)

表6. 重症例由来株から有意に検出された遺伝子

Gene	<i>p</i> -value (2-tail)
<i>cdiA</i>	0.003157
<i>gad</i>	0.003307
<i>cdiB</i>	0.004481
<i>katN</i>	0.007391
<i>rgdR</i>	0.01384
<i>stx2a</i>	0.01923

表7. ゲノム解析による各血清型大腸菌の*katN* 保有状況調査結果

血清型	解析株数	保有率 (%)	備考
O157:H7	1548	99.9	LEE(+)
O5:H9	31	100	LEE(+)
O172:H25*	15	100	LEE(+), 重症率50%
O165:H25	17	94.1	LEE(+)
OX18:H19*	22	90.9	LEE(-), 重症率57.1%
O177:H25*	17	88.2	LEE(+), 重症率45.8%
O3:H21	3	100	LEE(-)
OX25:H8	2	100	LEE(-)
O148:H10	1	100	LEE(-)
O157:H19	1	100	LEE(+)
O154:H31	1	100	LEE(-)
O50/O2:H5	1	100	LEE(-)
O50/O2:H6	5	60	LEE(-)
O74:H25	2	50	LEE(+)
O104:H2	2	50	LEE(-)
OgN5:H16	2	50	LEE(-)
O8:H8	3	33.3	Non-EHEC
O130:H11	7	28.6	LEE(-)
O8:H19	15	26.7	LEE(-)
OSB17:H19	16	6.3	LEE(-)
O174:H21	25	4	LEE(-)

*本研究対象血清型

表8. HUS患者由来株の染色体と保有するプラスミドサイズ

Strain ID	血清型	系統	染色体 (Mbp)	プラスミドサイズ (kbp)	主な共通病原因子
JNE082640	OX21:H19	B1	4.9	167, 8, 7, 2, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE131328	O113:H21	B1	5	161, 15, 7, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub, cdt</i>
JNE170426	OX18:H2	B1	5	159, 86, 7	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE181771	OX18:H19	B1	4.9	131, 89	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE120393	O113:H21	B1	5.1	161, 8, 7, 4, 3, 2, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub, cdt</i>
JNE120442	O183:H18	B2	5	161	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE151685	O74:H20	A	5	174, 61, 7	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE141411	OgN13:H19	B1	5.1	174	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>

表9. ゲノム解析により病原性関連遺伝子の検出を行った株

O血清群	H抗原	株数	重症率 (%)
O177	H25, H45, H11	28	42.9
O76	H7	9	44.4
O172	H25	8	50
O109	H21, H10	7	14.3
O80	H2	6	16.7
O51	H49	3	33.3
O70	H11	2	50
合計		63	38.1

表10. 重症例由来株から有意に高率に検出された遺伝子

Gene	<i>p</i> -value (2-tail)
<i>katP</i>	0.022
IncFIB	0.024
<i>tssF</i>	0.028
<i>espJ</i>	0.03
<i>upaG/ehaG</i>	0.044

図 1. LEE 非保有 EHEC 312 株の各付着関連遺伝子検出状況

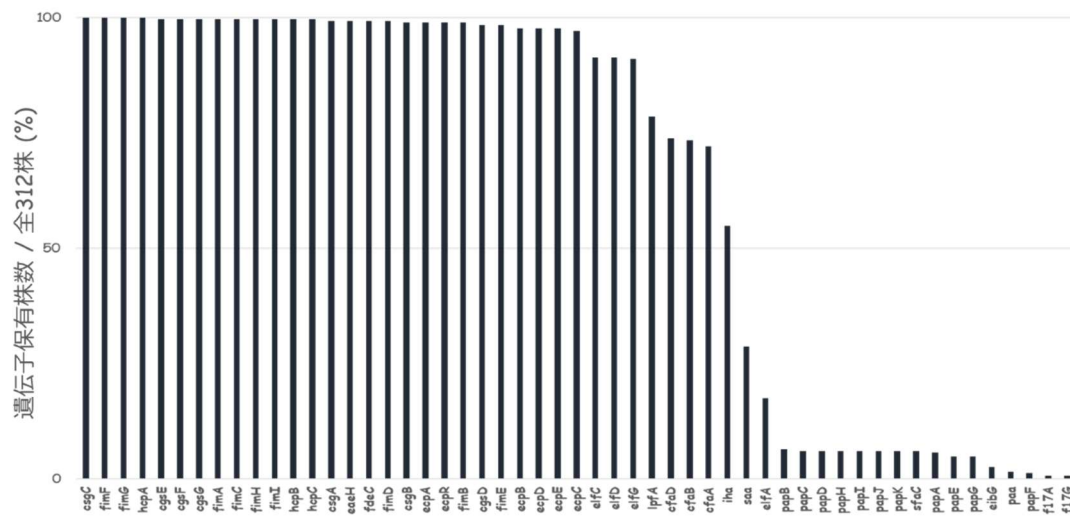
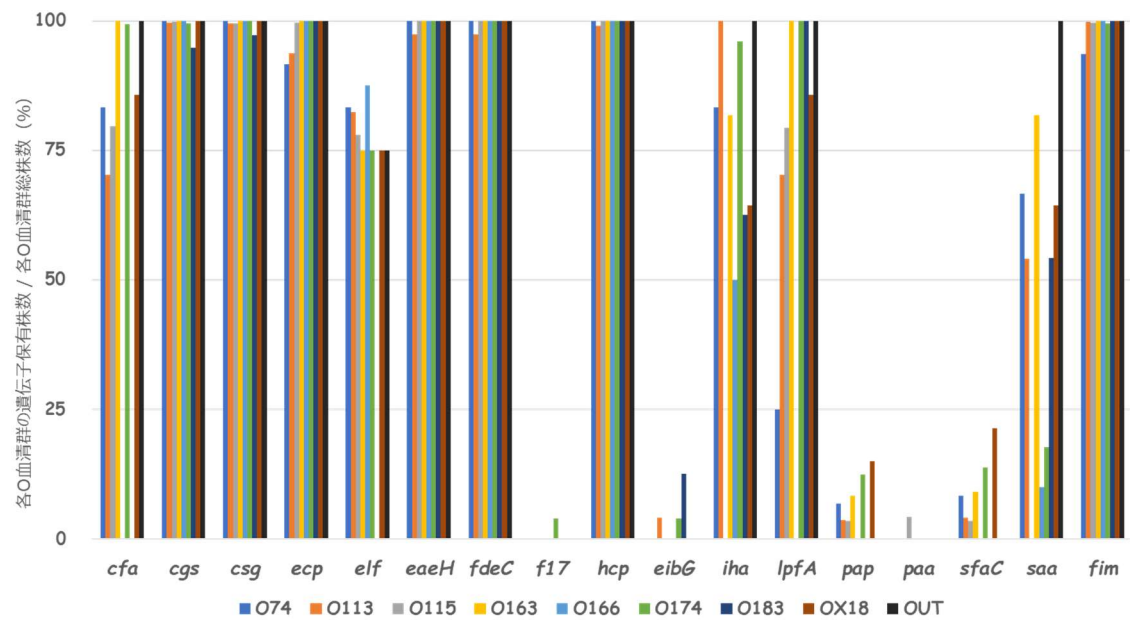


図 2. 各付着関連遺伝子の O 血清群ごとの保有率



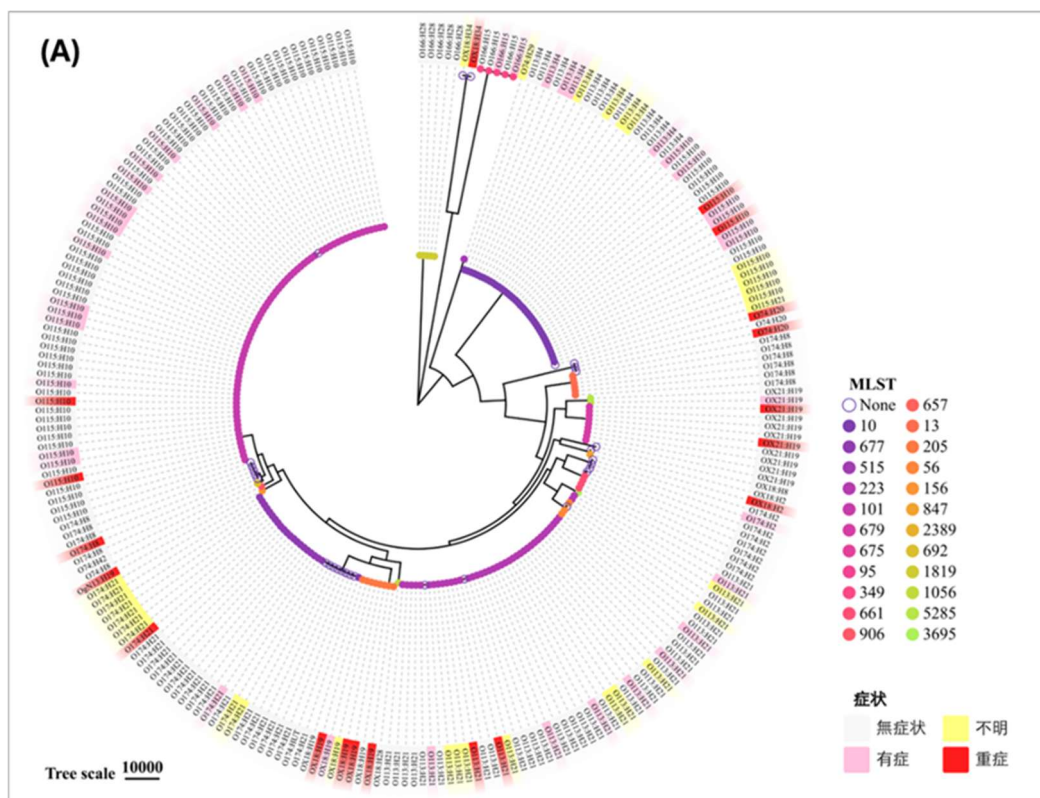


図 3. LEE 非保有 EHEC 株の SNP 抽出による系統解析
菌株ノードの色は MLST を示し、菌株番号の色は症状を示す

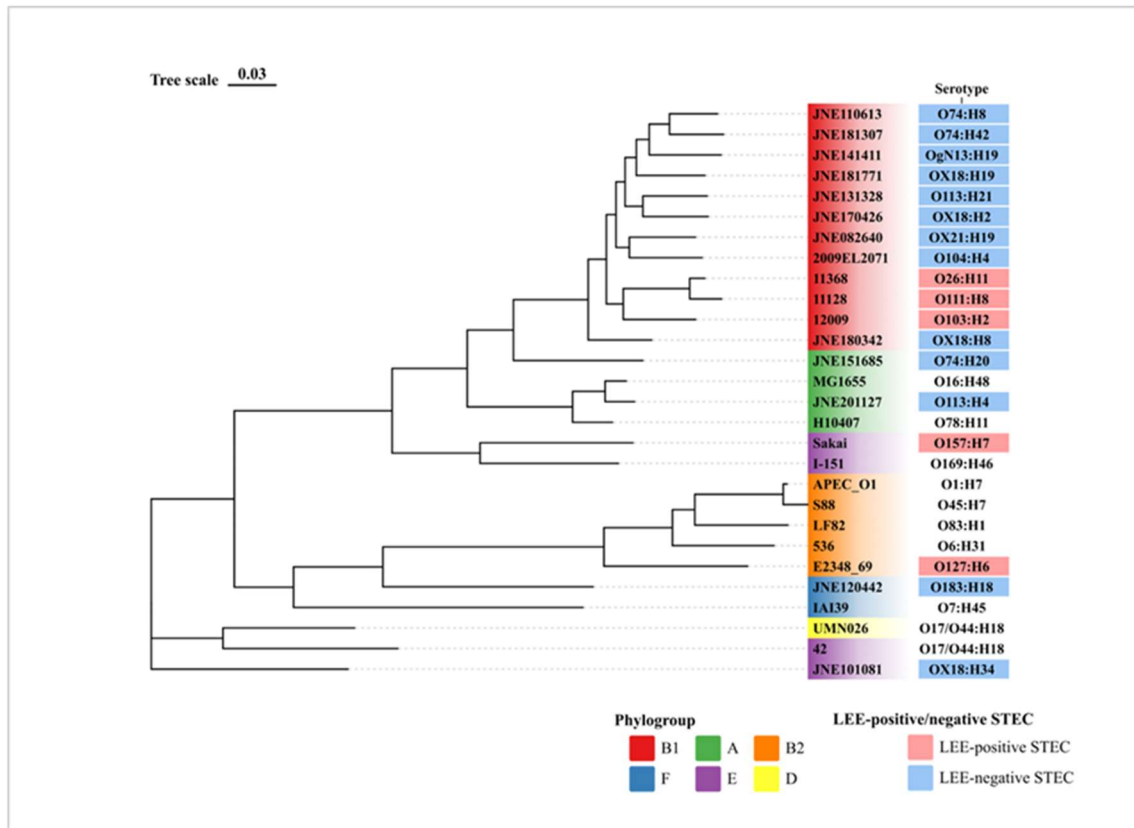


図 4. 各血清型大腸菌の SNP 抽出による系統解析

菌株番号の色は Phylogroup を示し、Serotype の色は LEE 保有の有無を示す

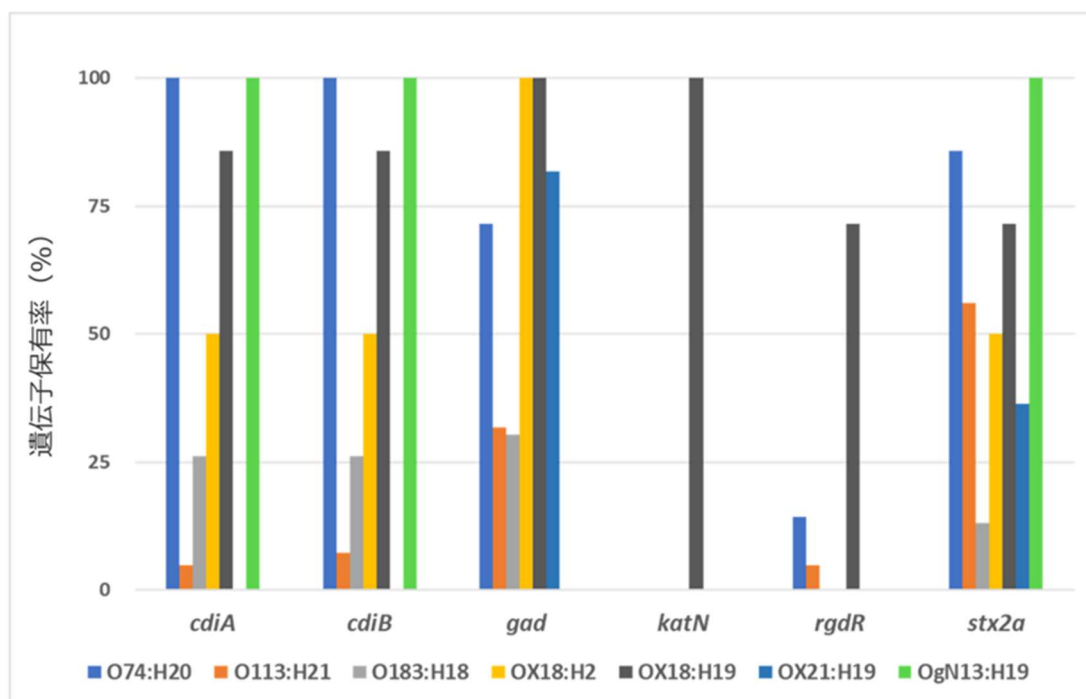


図 5. LEE 非保有 EHEC における血清型別の各遺伝子保有率

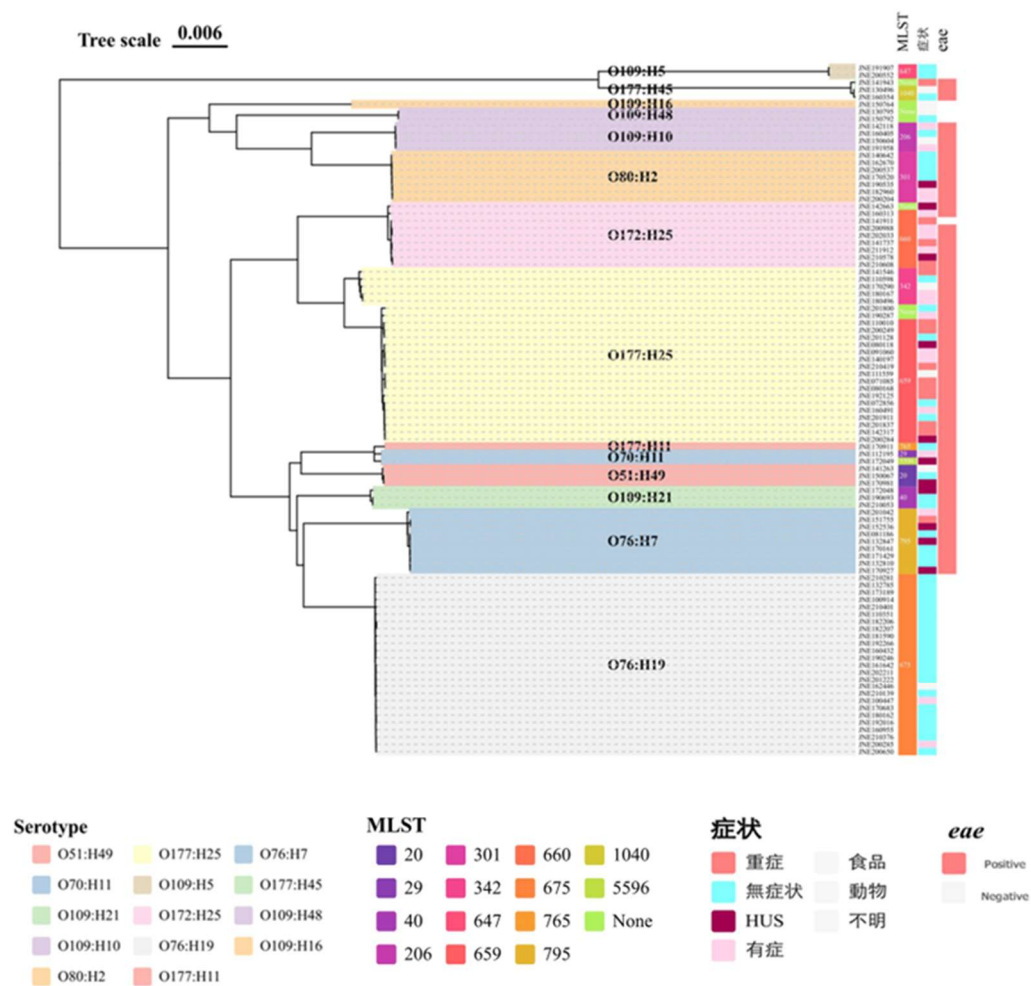


図 6. LEE 保有マイナーEHEC 株の SNP 抽出による系統解析
系統樹の枝の色は血清型を示している

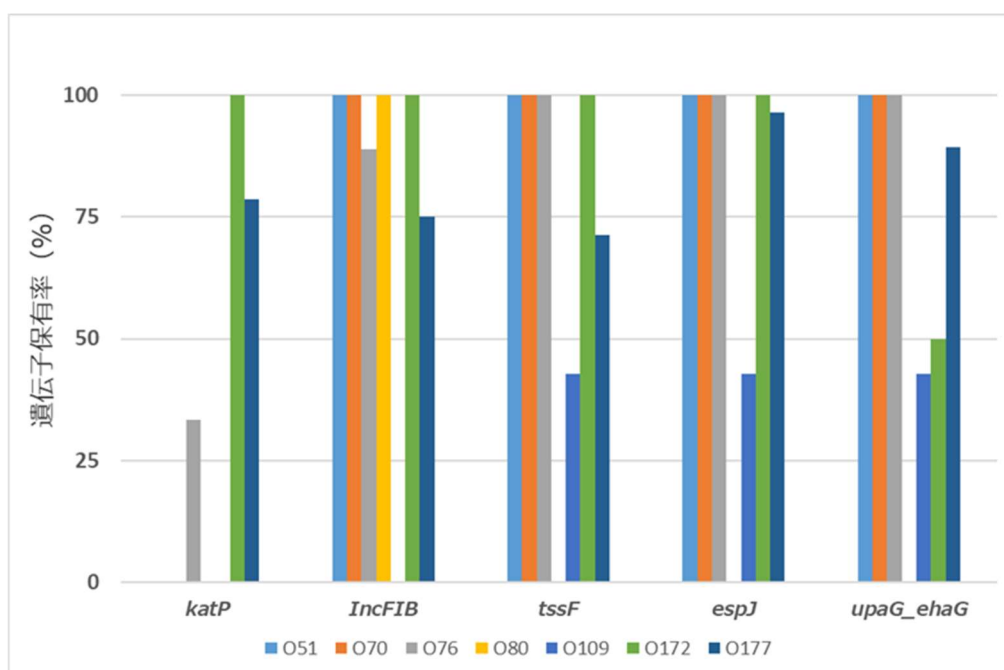


図 7. LEE 保有マイナー血清群 EHEC における血清型別の遺伝子保有率

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubomura A, Lee K, Ohnishi M, Iyoda S, Akeda Y, et al. EHEC Working Group.	Complete genome sequence of eight LEE-negative Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> strains isolated from patients with hemolytic-uremic syndrome	<i>Microbiology Resource Announcements</i>	Volume 13 • Number 1 • January 2024	e0059123	2023