

厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究
「感染症の病原体を保有していないことの確認方法について」の改定に資する研究
(20HA1009)

研究分担報告書

分担研究課題「長期排菌に関連した微生物学的特性を明らかにするための菌株解析」

研究分担者 伊豫田 淳 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究協力者 李 謙一 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究要旨

EHEC 関連 HUS 脳症による死亡症例由来の分離株を解析した。市販されている抗病原大腸菌 O 群型血清に対する凝集反応がなく、全ゲノムシーケンスによる検討を行ったところ、OX18:H2 系統であり病原遺伝子として STEC autoagglutination adhesin (Saa) 及び Sublittase toxin を有する事が確認された。国内分離 EHEC 株のうち抗 O 群型血清による凝集が得られないものを OX18 特異的なプライマーでスクリーニングしたところ、OX18 株を 25 株特定した。Core genome SNP を利用した系統樹解析により、これらの OX18 株は H 抗原の遺伝子型と合致する 5 系統からなることが確認された。感染症を発症した患者からの分離株は OX18:H2, H19, H34 系統に、無症状の患者らからの分離株は OX18:H8 及び H28 系統に分類された。今回の検討により現行の抗 O 群型血清で分類できない系統についても重篤な感染症をきたす事が明らかになった。伝播経路や感染源の特定のために、Og/Hg 型別を含む遺伝子型の特定や全ゲノムシーケンスの重要性を改めて認識することとなった。

A. 研究目的

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC または enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は、国内では年間 3,000 名以上の感染者が報告される公衆衛生上重要な病原菌である。STEC 感染者の一部は、血便や溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome) を呈し、死に至ることもある。大腸菌は、菌体抗原である O 抗原が血清型別に利用され、現在 180 以上の O 群が知られている。O 型別には既存の抗血清の他に、特異

的プライマーセットを用いた PCR による Og 型別も可能である。しかし、抗血清および PCR のいずれにおいても型別が不能な株が存在する。本研究では、STEC 関連 HUS 脳症による死亡症例から分離された O 型別不能 (O-untypable: OUT) STEC について、ゲノム解析を行った。その結果見出された新規血清群 OX18 について、国内株の網羅的なゲノム解析を行った。

B. 研究方法 臨床経過

2017年に8歳女児が大腸菌による尿路感染症で入院をした。入院2日後に次のような検査結果から、HUSと診断された：貧血（ヘモグロビン：10.5 g/dl）、破碎赤血球の増加、低血小板（ $3.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ ）、高クレアチニン（1.38 mg/dl）、総ビリルビン（1.7 mg/dl）、LDH（1,848 U/l）、大脳基底核および視床の浮腫・壊死（頭部MRI）。そのため、高容量のメチルプレドニゾロン投与、血漿交換、血液透析を実施したが12日後にHUS脳症および腎不全で死亡した。

患者からの STEC 分離及び解析

患者の尿からは *eae* 陰性・*stx2* 陽性 EHEC が分離された。同 STEC は、既存の抗血清および Og-PCR では、O 型別不能であった。そこで、ゲノム DNA 抽出を行い、MiSeq (illumina) によってペアエンドシーケンシング (300-mer \times 2) を行った。得られたショートリードは、SPAdes によってアセンブルを行い、O 抗原決定領域の解析等を行った。

国内 STEC OX18 の網羅的ゲノム解析

死亡例から分離された STEC は新規 O 群である OX18 であったため、Iguchi ら (J Clin Microbiol 2020 doi:10.1128/jcm.01493-20.) が開発した PCR 系を用いて、2007 年から 2019 年に分離された STEC OUT から OX18 の O 抗原決定領域の検出を行った。この結果得られた 25 株の OX18 STEC について、前述の方法で全ゲノム配列の解読を行った。得られた配列から、BactSNP を用いて core genome (cg) SNP を抽出し、系統解析を行った。さらに、アセンブル後に得られたドラフトゲノムから、

病原性遺伝子等の検出を行った。

C. 研究結果

患者からの STEC の解析

患者から得られた STEC OUT の O 抗原決定領域を解析したところ、DebRoy ら (PLoS One 2016 11:e0147434-e0147434.) が提唱した新規 O 群 (OX18) であることが判明した。また、*in silico* 解析による H 型は H2 であった。

国内 STEC OX18 の網羅的ゲノム解析

国内分離 OUT STEC から計 25 株の OX18 株が得られた (表 1)。これらの株と上記の HUS 死亡例由来株 (JNE170426) と併せて、ドラフトゲノムおよび系統解析を行った。この結果、国内 STEC OX18 は、H 抗原の遺伝子型と合致する 5 系統 (H2, H8, H19, H28 および H34) からなることが明らかとなった (図 1)。このうち、有症者由来株は H2, H19 および H34 であった。HUS 死亡例由来株 (JNE170426) は、細胞接着因子として STEC autoagglutination adhesin 遺伝子 (*saa*) や Subtilase 毒素遺伝子 (*sub*) 等を病原性遺伝子として保有していた。しかし、同様に H2 の系統となった株はそれらの遺伝子を保有せず、病原性は異なっていると考えられた。H2 と比較的近縁であった H19 の系統には国内株 20 株が属し、いずれも *saa* および *sub* を保有していた。H2 および H19 の株では、*saa* と *sub* のいずれもプラスミド様配列上に存在していた。H34 の系統には 2 株が属し、接着因子として Pap 線毛遺伝子を保有していた。

D. 考察

ヒトから分離される STEC のうち、大部分は locus of enterocyte effacement (LEE) 領域にコードされる III 型分泌装置を有する。しかし、O113 や O104 等の LEE 領域を保有せず、接着因子として Saa や aggregative adherence fimbriae (AAF) を保有する菌が重症例から分離される場合がある。saa および sub を保有する O113:H21 や O104:H21 の菌では、同遺伝子は巨大プラスミド上に存在することが分かっている。本研究で解析した H2 および H19 の系統の菌でも、それら遺伝子はプラスミド様配列上に存在することから、類似した病原性プラスミドを保有することが示唆された。

重症例から分離された系統のうち、H19 の系統は国内で継続的に分離されている。この系統はウシからも分離されており、他の STEC と同様にウシが保菌動物となり国内に定着している可能性も示唆された。本 O 群の監視のために、国立感染症研究所では OX18 等の新規 O 群に対する Og 型別体制を確立するとともに、民間企業による抗血清開発に協力している。

E. 結論

本研究では、非定型的 (LEE 非保有および OUT) の STEC の解析から、新規 O 群である STEC OX18 が重症例を引き起こし、国内で継続的に分離されていることを明らかにした。今後、ゲノム解析や Og 型別によって、同 O 群の継続的な監視が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Lee K, Iguchi A, Uda K, Matsumura S, Miyairi I, Ishikura K, Ohnishi M, Seto J, Ishikawa K, Konishi N, Obata H, Furukawa I, Nagaoka H, Morinushi H, Hama N, Nomoto R, Nakajima H, Kariya H, Hamasaki M, Iyoda S, Whole-genome sequencing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* OX18 from a fatal hemolytic uremic syndrome case. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(5):1509-1512.
<https://doi.org/10.3201/eid2705.204162>

2) 学会発表

1. 小児重症例から分離された腸管出血性大腸菌新規血清群 OX18 および関連株のゲノム解析、李 謙一、井口 純、宇田和宏、松村壮史、宮入烈、石倉健司、大西真、伊豫田 淳, EHEC Working Group in Japan、第94回日本細菌学会総会、2021/3/23-25、国内、オンデマンドスライド発表

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. 国内で分離された STEC OX18

Strain	Isolated year	Symptoms or source †	H genotype	Phylogenetic group	MLST	stx subtype ‡	
						stx1	stx2
JNE101081	2010	BD	H34	E	9185	1a	-
JNE130471	NA*	Swine	H34	E	9185	1a	-
JNE130573	2012	D	H19	B1	205	-	2a
JNE133347	2012	AC	H2	B1	9397	-	2e
JNE150598	2015	BD	H19	B1	205	-	2a
JNE151350	2015	AC	H19	B1	205	-	2d
JNE170426	2017	HUS, death	H2	B1	847	-	2a
JNE180342	2018	AC	H8	B1	Novel	1a	2d
JNE181771	2018	HUS	H19	B1	205	-	2a
JNE182474	2018	BD	H19	B1	205	-	2a
JNE182523	NA	NA	H19	B1	205	-	2a
JNE191031	2019	BD	H19	B1	205	-	2a
JNE192124	2019	AC	H19	B1	205	-	2a
JNE192333	2019	AC	H28	B1	1056	1d	-
A140161	2010	Cattle	H19	B1	205	-	2a
A140164	2010	Cattle	H19	B1	205	-	2a
A140165	2010	Cattle	H19	B1	205	-	2a
A140286	2012	Cattle	H19	B1	205	-	2a
A140453	2010	Cattle	H19	B1	Novel	1a	2a
A140462	2010	Cattle	H19	B1	205	1a	-
A140486	2014	Cattle	H19	B1	205	-	2a×2
A150011	2014	Cattle	H19	B1	205	-	2a×2
A150026	2014	Cattle	H19	B1	205	-	2a×2
A150037	2015	Cattle	H19	B1	205	-	2a×2
A150038	2015	Cattle	H19	B1	205	-	2a×2
A150039	2015	Cattle	H19	B1	205	-	2a×2

*NA, not available.

† BD, bloody diarrhea; D, diarrhea; AC, asymptomatic carrier; HUS, hemolytic uremic syndrome; NA, not available.

‡ -, not detected; 2a×2, two copies of *stx2a* were detected.

図 1. cgSNP を用いた最尤法系統樹

STEC OX18 の株名を太字で示す。OX18 以外の大腸菌については、血清型と pathotype 等 をカッコ内に示す。STEC OX18 においては、*in silico* 解析による H 型、*stx* 型、および由来（ヒトの場合は症状）を系統樹右側に示す。AC, asymptomatic carrier; BD, bloody diarrhea; D, diarrhea; HUS, hemolytic uremic syndrome。

