

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌食中毒事例株の解析

伊豫田 淳

令和3年度 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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒事例株の解析

研究分担者 伊豫田 淳 国立感染症研究所

研究要旨

astA 保有大腸菌に特徴的な系統や病原性因子を明らかにするために、国内分離大腸菌等 3,613 株のゲノムを用いて、同遺伝子保有株を検索した。その結果、約 3% で同遺伝子の保有が認められた。このうち、O26:H11 および O115:H10 では比較的高い保有率が認められた。同遺伝子の多くは IS1414 上に存在しており、様々な系統の株が水平伝播により獲得していることが示唆された。また、2020 年に大規模な食中毒から分離された大腸菌について、近縁株ゲノムを公共データベースから抽出し、系統解析等を行った。その結果、直接的な関連性が疑われる近縁株は見出されなかった。

研究協力者

国立感染症研究所
地方衛生研究所等

窪村亜希子、李 謙一

A. 研究目的

人に下痢等の消化器症状を引き起こす下痢原性大腸菌には、保有する病原性因子等によって腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）、腸管凝集性大腸菌（enteroaggregative *E. coli*: EAEC）等に分類される。EHEC では志賀毒素やその遺伝子の保有、EAEC では凝集性線毛のレギュレー

ター遺伝子（*aggR*）等が分類の指標となるが、既知のいずれの病原型にも属さない大腸菌が下痢症患者から分離されることがある。このうち、EAEC heat stable toxin (EAST1) をコードする遺伝子（*astA*）は既知の病原性遺伝子を保有しないが下痢症を起こしたと推定される大腸菌や、一部の EHEC から検出されることが分かっている。しかし、ゲ

ノム情報を利用した体系的な *astA* の分布調査は行われていない。そこで、国立感染症研究所・細菌第一部でゲノム解読を行った国内分離大腸菌を対象に、*astA* の分布や周辺領域の解析を行った。また、*astA* 保有大腸菌が原因と考えられる食中毒事例由来株の国際比較を行った。

B. 研究方法

(1) ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査

2007 年から 2021 年に国内で分離された大腸菌等 (*E. albertii* を含む主として腸管出血性大腸菌 [EHEC]) 計 3,613 株を解析対象とした。一部の株については、以下の方法で新たに WGS 情報を解読した：ゲノム DNA 抽出を行い、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを用いて、HiSeqX (illumina) によってペアエンドシーケンシング (150-mer×2) を行った。得られたショートリードは、SPAdes によるアセンブリを行いドラフトゲノムを得た。ドラフトゲノムを対象にして、BLAST 検索によって *astA* の検出を行った。*astA* の検出は次の基準で行った：VirulenceFinder

(<https://cge.food.dtu.dk/servi>

[ces/VirulenceFinder/](https://cge.food.dtu.dk/servi)) に登録されている既知の 12 種の配列と 98%以上の相同性、全長 (117 bp) が検出、およびストップコドンが配列中に存在しない。上記 12 種と異なる配列については新規型とした。

(2) *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

既存の *astA* 検出用プライマー (EASTOS1 および EASTOAS2) と、既知および新規の *astA* 配列を比較し、全ての型を検出可能なプライマーを設計した：*astA*-univ-F1 (5' - GGCATCAACRCAGTATATYCG-3')
astA-univ-R1 (5' - TCRCGAGTGACKRCYYTGTA-3')。設計したプライマーを用いて、*astA* 保有株および非保有株のそれぞれ 32 株を用いて同遺伝子の検出を行った。

(3) 大規模食中毒由来大腸菌 07:H4 の国際ゲノム比較

2020 年に 2,958 名の患者が報告された、学校給食を原因とする食中毒事例で分離された大腸菌 07:H4 の由来等を究明するために、公共データベースに存在する近縁株との類縁関係を解析した。Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) へ登録されている大腸菌 07:H4 計 199 株のゲノムデータをダウンロードし、上記食中毒由来株

と共に BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインにて SNP を抽出し、系統解析を行った。

C. 研究結果

(1) ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査

国内で分離された大腸菌（主として EHEC）ゲノムを用いて *astA* の保有状況を調べた結果、供試菌株の約 3%において同遺伝子の保有が認められた（表 1）。血清型別にみると、026:H11 および 0115:H10 においてそれぞれ 19.0%および 34.5%と比較的高率に保有することが明らかとなった。*astA* 配列を解析したところ、新規に 11 種の変異型を同定し、暫定的な型名（X01-11）を付与した。また、8 割以上の株において、*astA* は IS1414 のトランスポゼース配列中に含まれていた。

astA 陽性株の病原性因子を検索したところ、大部分は志賀毒素遺伝子 (*stx*) を保有していた。*stx* 保有株の大部分は III 型分泌装置をコードする遺伝子群（locus of enterocyte effacement: LEE）を保有していた。しかし、0115:H10 や 07:H4 等では主要な LEE などの細胞附着因子や他の毒素遺伝子等を保有しない株も多数認められた（表 1）。

比較的高率に *astA* を保有していた 026:H11 および 0115:H10 について、保有状況と系統との関係を調べた。026:H11 では、*astA* 保有株の内 45 株（86.5%）が同一の系統に属していた。本系統では、*astA* は ISIS1414 上に存在せず、祖先株が同遺伝子を獲得して垂直伝播している可能性が示唆された。0115:H10 は、系統の大きく異なる ST10 および ST101 に分けられる。*astA* 保有株はいずれも ST10 に属しており、同 ST の菌株はいずれも *astA* を保有していた。

(2) *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

既知および新規の *astA* 配列と既存の *astA* 検出用プライマー（EASTOS1 および EASTOAS2）配列を比較したところ、*astA* 08 および 11 において 3' 末端領域に単一塩基置換が認められた。このため、主に 3' 領域に混合塩基を加えた *astA*-univ-F1 および *astA*-univ-R1 を設計した。*astA* 保有および非保有株で検証を行ったところ、それぞれ全て陽性および陰性の結果となった。

(3) 大規模食中毒由来大腸菌 07:H4 の国際ゲノム比較

公共データベース上に存在する全ての大腸菌 07:H4 のゲノム情報を用いて、系統解析を行った。食中

毒由来株の近縁株計 49 株からなる系統樹を図 1 に示す。食中毒由来株と最も近縁となったのは、カタール由来株で 20-21 か所の SNP が認められた。次にレバノン由来株が 22-23 か所の SNP が認められた。さらに、タンザニアおよび中国由来株との間には約 60 か所の SNP が認められた。中国株は下痢症からの分離との情報があったが、その他の株では臨床情報は得られなかった (表 2)。

D. 考察

国内で分離された大腸菌ゲノムの解析では、約 3% で *astA* が認められた。ただし、今回の解析対象の 90% 以上は *stx* を有する EHEC であり、他の病原性大腸菌や非病原性大腸菌では分布が異なる可能性がある。同遺伝子は多くの場合、IS 上に存在しており、多様な系統へ水平伝播していると考えられた。一方、O26:H11 の一部の系統や O115:H10 ST10 のように、垂直伝播によって同遺伝子が保持されている例も見られた。また、*astA* 配列には多型が認められ、今後これらの発現状況を明らかにする必要がある。

大規模食中毒由来大腸菌 O7:H4 の国際ゲノム比較では、比較的近縁な菌株が中東、アフリカおよび中国で見いだされた。これらの株につい

ての疫学情報は入手できなかったため、直接的な関連性は不明であるが、遺伝的に近縁な株が国際的に分布している可能性がある。

E. 結論

astA は国内分離大腸菌にも広く分離していることが明らかとなった。同遺伝子や周辺領域の配列には多型が認められたことから、発現状況や病原性への関与についてより詳細に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Kashima K, Sato M, Osaka Y, Sakakida N, Kando S, Ohtsuka K, Doi R, Chiba Y, Takase S, Fujiwara A, Shimada S, Ishii R, Mizokoshi A, Takano M, Lee K, Iyoda S, Honda A. 2021. An outbreak of food poisoning due to *Escherichia coli* serotype O7:H4 carrying *astA* for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin1 (EAST1). *Epidemiol Infect* 149:e244.

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

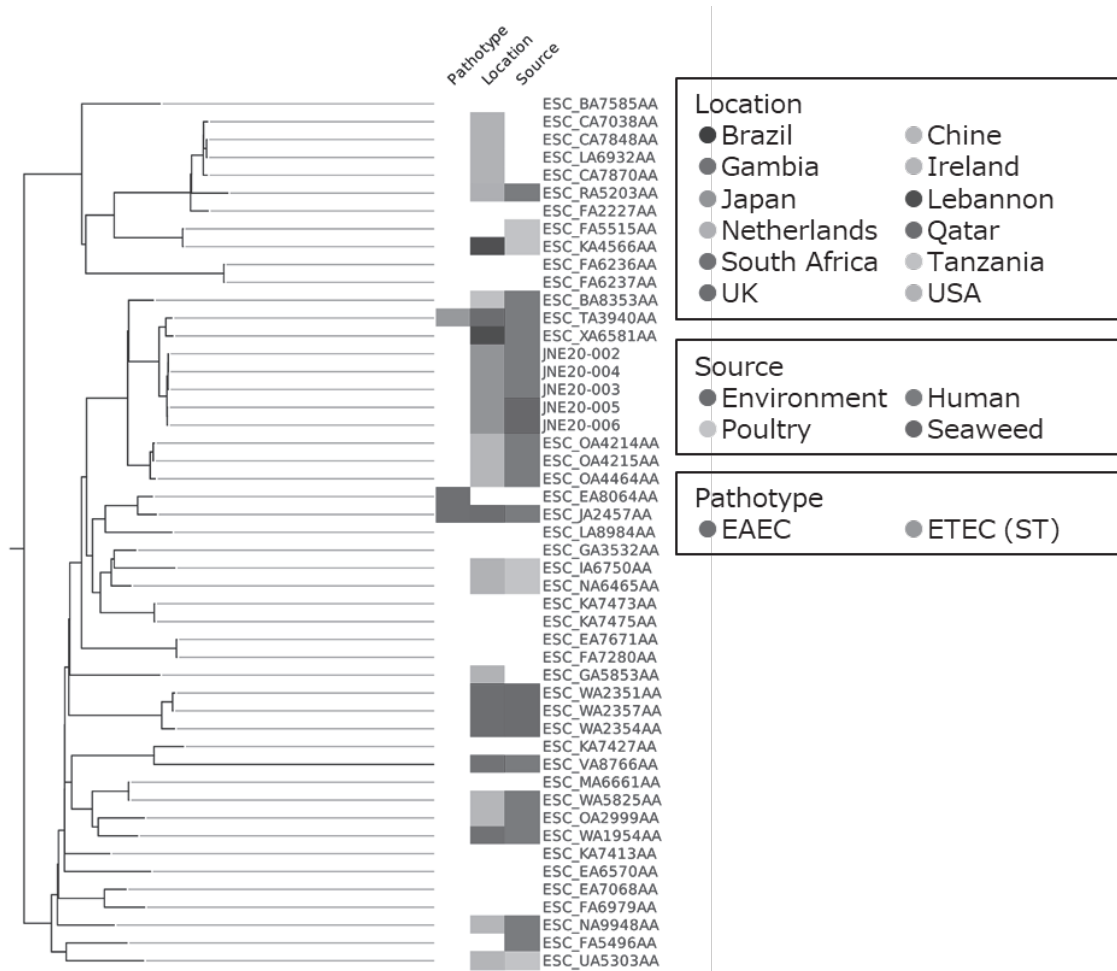


図 1. 大腸菌 O7:H4 の SNP による最尤法系統樹
食中毒由来株と近縁な 49 株の系統樹。右側のカラムは分離国、分離株の由来、
pathotype を示す。

表 1. 国内大腸菌における *astA* 保有状況

血清型	菌株数	<i>astA</i> 保有株数(%)	Phylogenetic group	MLST	主な病原性因子	<i>stx</i> subtype	<i>astA</i> subtype
O26:H11	274	52 (19.0)	B1	21	LEE	1a,2a,1a2a	4,5,X01,X07,X09
O115:H10	29	10 (34.5)	A	10		1a	X05
O109:H21	9	9 (100)	B1	40	LEE	2f	X06
O63:H6	9	8 (88.9)	B2_UT	583	LEE	2f	4
O157:H7	1,368	3 (0.2)	E	11	LEE	1a2a	4,X03
O7:H4	3	3 (100)	A	484		stx(-)	X08
O103:H25	41	2 (4.9)	B1	343	LEE	1a,2a	4,X01
O121:H10	2	2 (100)	B1	641	F18	2e	4
O121:H19	153	2 (1.3)	B1	655	LEE	2a	4
O133:H39	2	2 (100)	B2_IV	UT		stx(-)	X04
O156:H1	2	2 (100)	B2_UT	941	LEE	stx(-)	X10
O103:H2	176	1 (0.6)	B1	17	LEE	1a	X03
O111:H8	1,020	1 (0.1)	B1	1792	LEE	1a	4
O115:HUT*	1	1 (100)	-	2819	LEE	2f	4,5
O123:H36	5	1 (20.0)	A	10	LEE	1a	5
O15:H16	1	1 (100)	A	325	ST	2g	4
O159:H16	1	1 (100)	A	3630	ST	2e	X02
O183:H18	5	1 (20.0)	UT	657	eibG, sub	2a	1
O8:H9	1	1 (100)	C	23		2e	4
OUT:H11	9	1 (11.1)	B1	21	LEE	1a2a	X01
OX18:H28	1	1 (100)	B1	1056		1d	X03
計	3,613	105 (2.9)					

**E. albertii*

表 2. 2020 年食中毒由来 O7:H4 株と最も近縁な株の情報

Accession no.	SNP*	由来	分離年	分離国	症状
ESC_TA3940AA	20-21	Human	2018	Qatar	NA †
ESC_XA6581AA	22-23	Human	2018-2019	Lebanon	NA
ESC_BA8353AA	59-60	Human	2009	Tanzania	NA
ESC_OA4215AA	63-64	Human	2017	China	下痢
ESC_OA4214AA	64-65	Human	2017	China	下痢
ESC_OA4464AA	65-66	Human	2017	China	NA

*2020年食中毒由来O7:H4株とのSNP距離

† NA, not available