

# 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4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

病原性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* 保有大腸菌の病原性等の特徴を明らかにするために、*astA* がコードする EAST1 の発現解析、培養細胞感染試験、および有症事例株を対象にした全ゲノム配列解析を行った。EAST1 の発現解析では、ウェスタンブロットティングによる検出手法を確立し、有症例由来大腸菌 07:H4 および 0166:H15 において EAST1 ペプチドの発現を確認した。培養細胞感染試験では、0166:H15 および 0gGp9:H18 において CHO および INT407 細胞への接着性が認められた。全ゲノム配列解析では、有症事例株間の関連性は見出されず、*astA* 陽性大腸菌は系統的に多様であることが判明した。今後、これら多様な系統の *astA* 陽性大腸菌の EAST1 発現や共通する病原性因子等について究明する必要がある。

#### 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 では志賀毒素遺伝子、EAEC で

は凝集性線毛のレギュレーター遺伝子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 からも検出されることが分かっている。前年度の研究で、EHEC に広く *astA* が分布することが明らかとなったが、定性および定量的な発現解析の知見はごく限られている。そこで、ウェスタンブロッティングによる EAST1 検出系の確立を試みた。

また、*astA* 陽性大腸菌の病原性およびゲノムの特徴を明らかにするために、主に国内集団感染事例関連株を用いて培養細胞への感染実験およびゲノム系統解析を行った。

## B. 研究方法

### (1) EAST1 発現解析

EAST1 の発現解析を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロッティングによって行った。供試菌株として、食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌を主とした、5 血清型 (07:H4, 166:H15, 169:H45, 0gGp7:H6, 0gGp9:H18) 計 7 株を用いた (表 1)。加えて、JNE21-003 (0166:H15) および JNE22-001 (07:H4) について、*astA* 配列およびプロモーター領域を pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) を使用してクローニングし、同プラスミド (pGEM-*astA*) を親株に導入した。これらの株に

についても本解析に供試した。なお、JNE21-003 は、染色体上とプラスミド上に異なる配列の *astA* が存在したため、それぞれを pGEM-*astA1* および pGEM-*astA2* としてクローニングを行った。各菌株から作製した SDS-PAGE サンプルを Peptide-PAGE mini (TEFCO) に添加し、Tris/Tricine/SDS Buffer (Bio-Rad) を使用して泳動を行った。その後、Immun-Blot PVDF 0.2  $\mu$ m メンブレン (Bio-Rad) に転写し、Anti-EAST1 Rabbit Polyclonal Antibody (Avantor-VWR) で標識を行った。ウェスタンブロッティングの陽性対照としては合成した EAST1 ペプチド、陰性対照としては大腸菌実験室 (非病原性) 株である JM109 株を使用した。

### (2) 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

培養細胞を使用して細胞侵入性、細胞傷害性および細胞接着性の解析を行った。対象株は上記 1 と同じ *astA* 陽性大腸菌を使用した。細胞侵入性は HEp-2 細胞に約  $1.0 \times 10^7$  の菌を接種、1 時間培養後に PBS で 3 回洗浄し、50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン加 DMEM 培地を加え 1 時間培養することで細胞外の菌を殺菌した。その後、PBS で 3 回

洗浄し、1% Triton Xを加え細胞溶解後、LB寒天平板に塗抹し、細菌数を計数した。侵入性試験の陽性対照としては *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 株および 14028s 株を、陰性対照としては EHEC 0157:H7 Sakai 株を用いた。細胞傷害性については HeLa 及び Vero 細胞を使用した。対象は各血清型の食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌に加え、1 で作製した pGEM-*astA* 導入株、対照として EHEC 0157:H7 Sakai 株および JM109 株とした。各細胞に各菌株抽出液を接種し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) で生細胞数の測定を行い、菌液を接種していないウェルの細胞数を 100%として評価を行った。細胞接着性は HEp-2, HeLa, CHO および INT407 細胞を使用した。対象株は各血清型の *astA* 陽性大腸菌に加え、CHO 細胞を使用した試験のみ血清型 0166:H15 の EHEC 4 株 ( JNE181928, JNE162304, JNE192196, JNE192777) も供試した。試験方法は一晚培養菌液を約 100 MOI となるよう各細胞に接種し 1%マンノースを加えた各細胞培養液で 3 時間培養を行った。その後、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

察を行った。

### (3) ゲノム解析

過去に発生した食中毒事例株を中心に、11 種類の血清型の *astA* 陽性大腸菌を全ゲノム配列解析に供試した (表 2)。これらの菌株について、全ゲノム配列を解読し、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。さらに食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌株については WGS データの解析により保有する遺伝子の網羅的な検出を行った。

## C. 研究結果

### (1) EAST1 発現解析

ウェスタンブロッティングの結果、供試した *astA* 陽性大腸菌 11 株と陽性対照の合成 EAST1 ペプチドにおいて、EAST1 の質量約 4.1kDa 付近でシグナルが確認され、陰性対照の JM109 株ではシグナルが見られなかった (図 1)。

### (2) 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

細胞侵入性試験では、供試した *astA* 陽性大腸菌 11 株においては陰性対照である Sakai 株に比べて顕著な侵入性は認められなかった。細胞傷害性試験では、HeLa 細胞を使用した試験で非病原性株

である JM109 株との間に大きな差は認められなかった (図 2A)。また、Vero 細胞を使用した試験では野生株と pGEM-*astA* 導入株との比較を行ったが、大きな差は認められなかった (図 2B)。細胞接着性試験では 0gGp7:H6 の血清型の株 (JNE21-011) について HEp-2, HeLa および CHO 細胞を使用して試験を行ったところ、細胞剥離が確認された。残りの 4 つ血清型の 9 株については、HEp-2 および HeLa 細胞を使用した試験ではいずれの株も検討した条件では細胞接着性は認められなかった (表 3)。CHO および INT407 細胞を使用した試験では血清型が 0166:H15 または 0gGp9:H18 である 5 株が細胞への接着性を示したが、残りの 2 つの血清型 (07:H4, 0169:H45) に属する 4 株は検討した条件ではいずれにおいても細胞接着性は認められなかった。EHEC 0166:H15 4 株についても CHO 細胞を使用して同条件で試験を行ったが、細胞接着性は認められなかった。

### (3) ゲノム解析

系統解析により 9 件の事例から分離された 26 株は 6 つの Phylogenetic group (A, B1, B2, F, D, E) に分類され、いずれも事例間の関連性は低いことが示唆

された (図 4)。また相模原市の食中毒疑い事例で分離された 9 株については 4 種の Phylogenetic group (A, B1, B2, F) に分類された。0166:H15 の系統解析結果では、3 件の食中毒事例株は最小で 130 か所の SNP が認められ、関連性が低いことが見出された (図 5)。また、0166:H15 の EHEC 5 株のうち 4 株は *astA* 陽性であり、食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌 9 株とは隣接した系統であった。また、WGS データ解析により網羅的に遺伝子を検出した結果では、CHO 細胞への接着が認められた血清型 (0166:H15, 0gGp9:H18) の株にのみ保有が認められる接着因子は検出されなかった。

### D. 考察

*astA* 陽性大腸菌の病原性については未だ不明瞭な部分が多く存在するが、本研究では食中毒由来株を研究対象とすることで、病原性究明を試みた。ウェスタンブロッティングの解析結果からいずれの *astA* 陽性大腸菌株も EAST1 を産生している可能性が示唆された。しかし、細胞傷害性試験では、検討した条件では EAST1 による傷害性を示す結果を得ることができなかった。EAST1 の病原性への寄与については、今後

別の手法で検証する必要がある。

細胞接着性試験では、0166:H15と0gGp9:H18はCHOおよびINT407細胞への接着性を示した。0166:H15はこれまで、複数の事例で食中毒の起因菌として報告されている。細胞への接着性は同血清型の病原性に関与している可能性があると考えられるが、本研究では接着因子の特定には至らなかった。接着因子を同定し、検出するための系が確立されれば、地方衛生研究所等に有用な情報を還元することが可能となることから、今後、接着因子を明らかにすることは重要であると考えられる。供試菌株のうち、0gGp7:H6（JNE21-011）は、感染実験で細胞剥離が確認された。同株は、細胞剥離に関与するとされる溶血素遺伝子（*hlyA*）を保有していた。*hlyA*の病原性への関与は不明であるが、今後検証する必要がある。

*astA*陽性大腸菌の系統解析からは、事例間の関連性は低く、様々な系統の菌が有症例に関与していることが示唆された。相模原市の食中毒疑い事例では、健常者や食品からも種々の*astA*陽性大腸菌が分離されたことから、同菌は広く分布することが示唆された。0166:H15株に着目した解析では、供試したEHECとnon-EHECの株はいずれも

Phylogenetic group Eに属したが、3件の食中毒事例由来株は同一の系統であった。食中毒事例株とEHECでは、CHO細胞への接着性は異なることから、これらの違いに着目することで食中毒等の集団感染を起こす*astA*陽性大腸菌の病原性について解析できる可能性が示唆された。

#### E. 結論

全ゲノム配列解析によって、*astA*陽性大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。本年度に確立したEAST1検出手法や培養細胞接着性試験等を用いて、同菌の病原性に関わる因子を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）

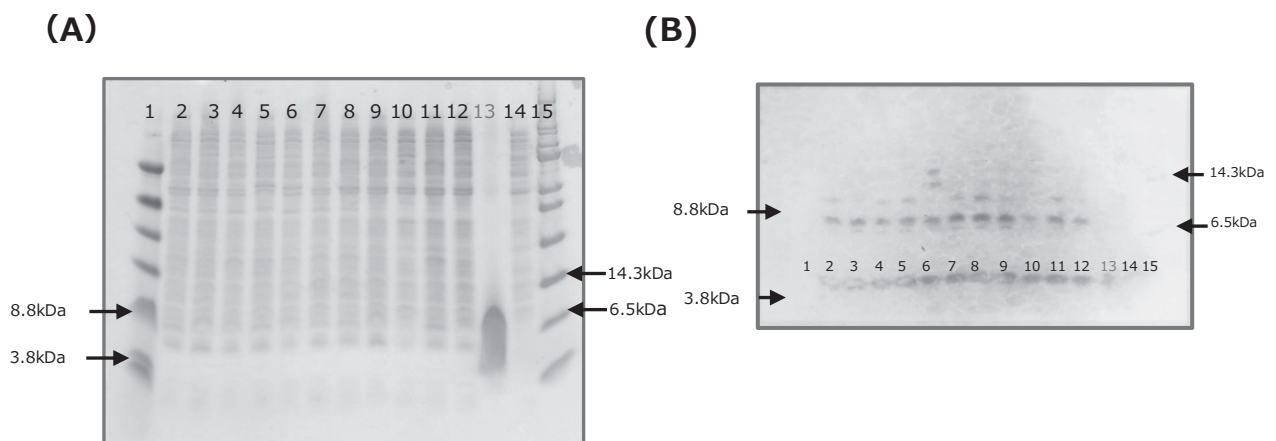
なし

（学会等発表）

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



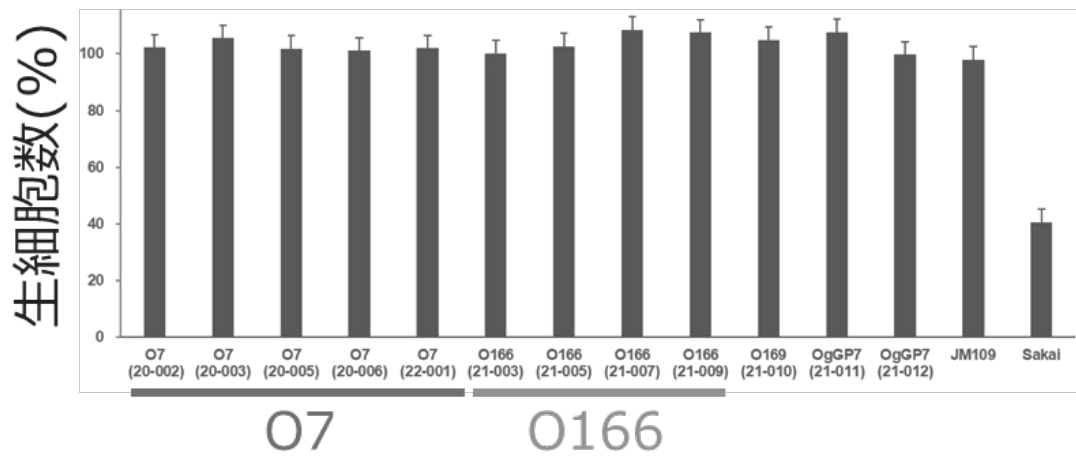
(C)

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sample name	Ladder 1	20-002 (O7)	21-003 (O166)	21-009 (O166)	21-010 (O169)	21-011 (OgGP7)	21-012 (OgGP9)	22-001 (O7)	21-003 pGEM-astA1	21-003 pGEM-astA2	22-001 pGEM-astA	21-003 pGEM-NC	合成 EAST1 ペプチド	JM109	Ladder 2

図 1. SDS-PAGE ゲル染色像 (A) とウェスタンブロットティング (B) の結果および各レーンの添加サンプル (C)



(A)



(B)

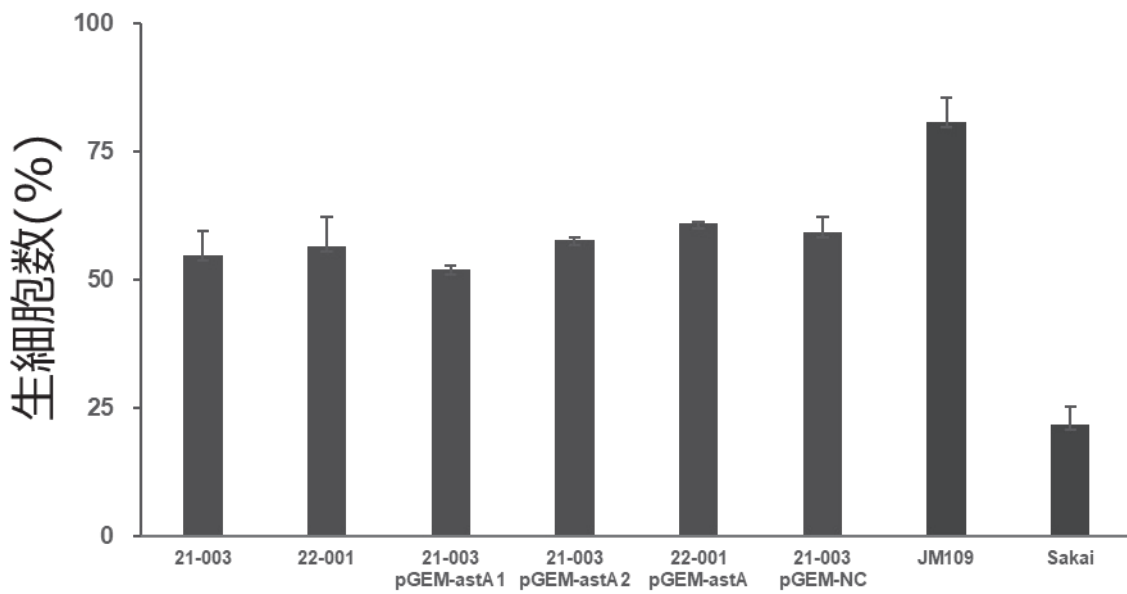
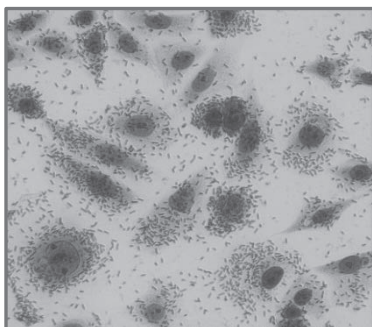
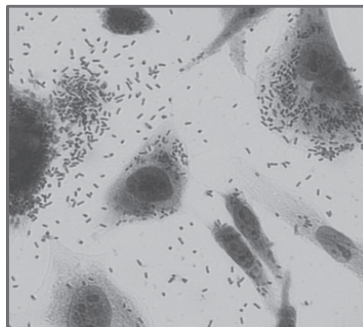


図 2. HeLa (A) および Vero (B) 細胞における細胞傷害性試験結果

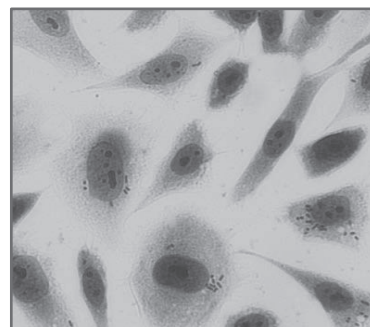
(A)



JNE21-003 (O166:H15)

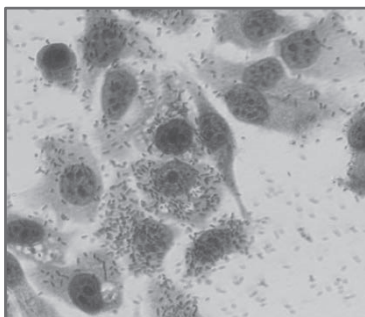


JNE21-012 (OgGP9:H18)

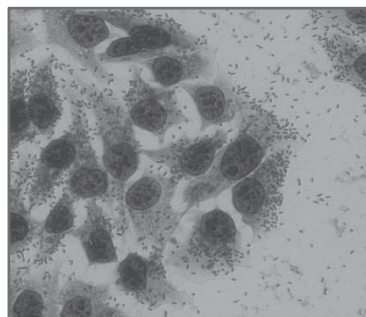


JNE20-002 (O7:H4)

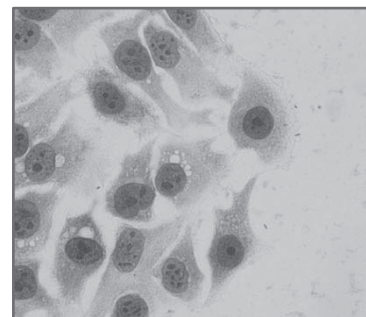
(B)



JNE21-003 (O166:H15)



JNE21-012 (OgGP9:H18)



JNE20-002 (O7:H4)

**図 3. CHO 細胞 (A) および INT407 細胞 (B) への細胞接着性試験結果**

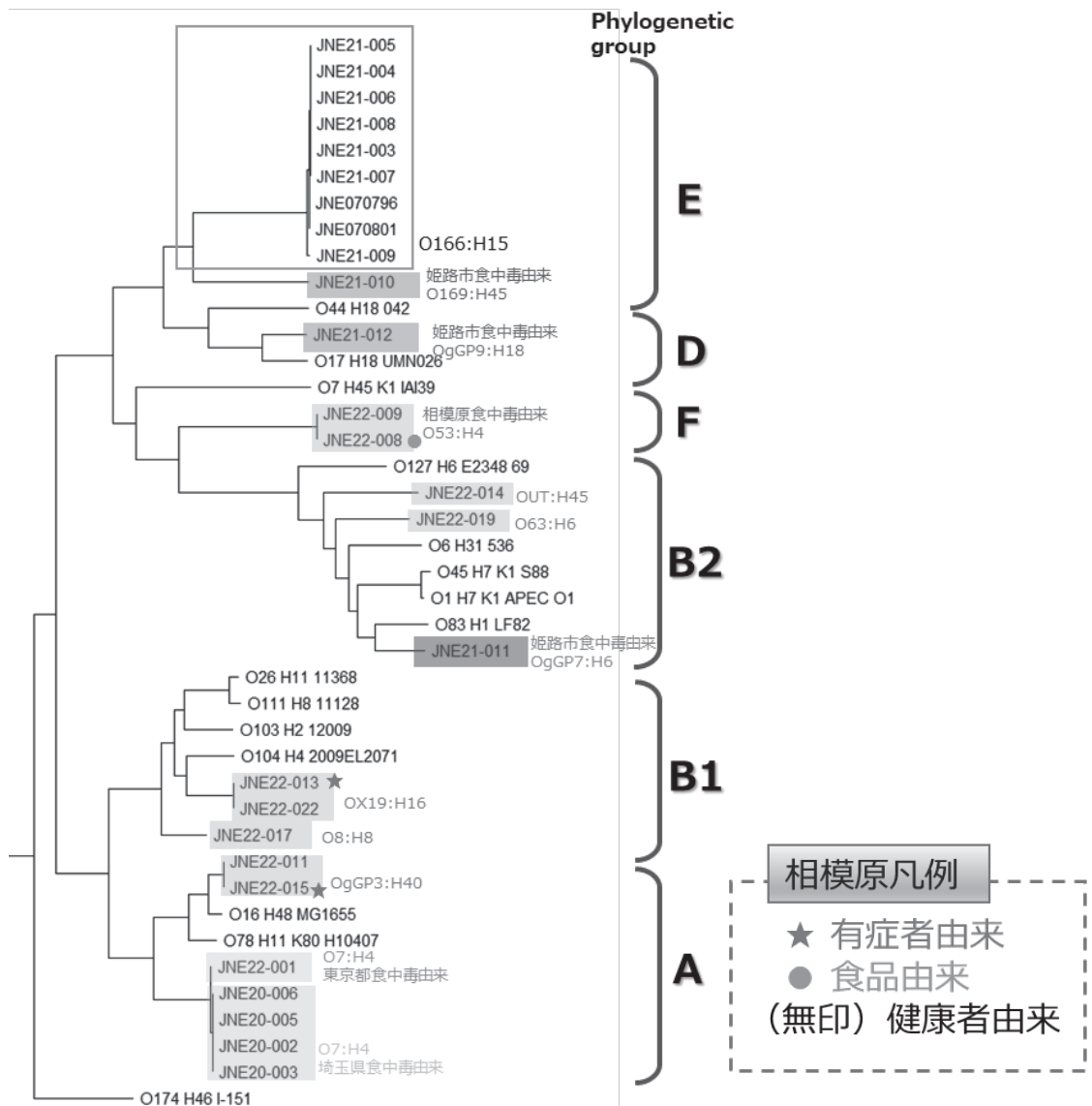


図 4. *astA* 陽性大腸菌におけるコアゲノム SNP を用いた最尤法系統樹

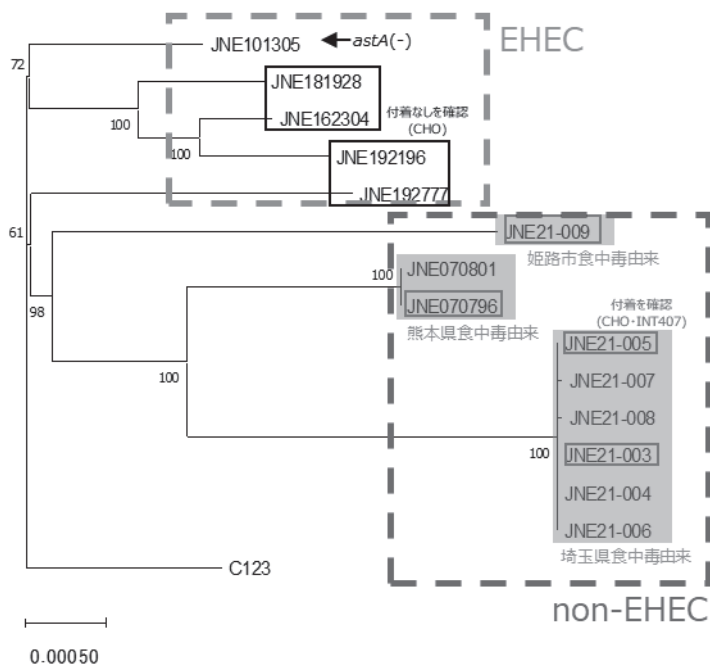


図 5. O166:H15 におけるコアゲノム SNP を用いた最尤法系統樹

表1. EAST1発現解析に用いた菌株

ID	血清型	由来	プラスミド
JNE20-002	O7:H4	埼玉県	
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	
JNE21-009	O166:H15	姫路市	
JNE21-010	O169:H45	姫路市	
JNE21-011	OgGp7:H6	姫路市	
JNE21-012	OgGp9:H18	姫路市	
JNE22-001	O7:H4	東京都	
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	pGEM-astA1
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	pGEM-astA2
JNE22-001	O7:H4	東京都	pGEM-astA
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	pGEM

表2. ゲノム解析に用いた菌株

血清型	ID	由来
O7:H4	JNE20-002	埼玉県
	JNE20-003	埼玉県
	JNE20-005	埼玉県
	JNE20-006	埼玉県
	JNE22-001	東京都
O8:H8	JNE22-017	相模原市
O53:H4	JNE22-008	相模原市
	JNE22-009	相模原市
O63:H6	JNE22-019	相模原市
O166:H15	JNE070796	熊本県
	JNE070801	熊本県
	JNE101305	愛知県
	JNE162304	大阪府
	JNE181928	宮城県
	JNE192196	香川県
	JNE192777	山梨県
	JNE21-003	埼玉県
	JNE21-004	埼玉県
	JNE21-005	埼玉県
	JNE21-006	埼玉県
	JNE21-007	埼玉県
	JNE21-008	埼玉県
	JNE21-009	姫路市
O169 :H45	JNE21-010	姫路市
OgGp3(O118/O151):H40	JNE22-011	相模原市
	JNE22-015	相模原市
OgGp7 :H6	JNE21-012	姫路市
OgGp9:H18	JNE21-011	姫路市
OX19:H16	JNE22-013	相模原市
	JNE22-022	相模原市
OUT:H45	JNE22-014	相模原市

表3. 細胞接着性試験結果

株名	血清型	細胞種ごとの付着性			
		HEp-2	HeLa	CHO	INT407
JNE070796	O166:H15	—*	NT	+	+
JNE21-003	O166:H15	—	—	+	+
JNE21-005	O166:H15	—	NT	+	+
JNE21-007	O166:H15	—	NT	NT	NT
JNE21-009	O166:H15	—	—	+	+
JNE21-012	OgGp9:H18	—	NT	+	+
JNE20-002	O7:H4	—	—	—	—
JNE20-003	O7:H4	—	NT	NT	NT
JNE20-005	O7:H4	—	NT	—	—
JNE20-006	O7:H4	—	NT	NT	NT
JNE22-001	O7:H4	—	NT	—	—
JNE21-010	O169:H45	—	—	—	—
JNE21-011	OgGp7:H6	CD	CD	CD	NT

\*+, 付着あり; —, 付着なし; NT, not tested; CD, cell detaching