

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）
研究総括報告書

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

主要な O 血清群ではない腸管出血性大腸菌 (EHEC) のうち、病原性遺伝子領域 LEE を保有しない EHEC (LEE(-)血清群 EHEC) の病原性解明のため全ゲノム配列解析および培養細胞感染試験を行った。ゲノム解析により取得した重症例由来株の完全長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。培養細胞感染試験結果から、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。今後、LEE(-)血清群 EHEC の病原性解明のためには、取得したゲノムデータを使用した詳細な解析や付着因子以外の因子の解析も行っていくことが重要である。

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、非メジャー血清群についても着目していく必要がある。

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いる。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。しかし、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については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

のうち LEE を保有しない EHEC (LEE(-) 血清群 EHEC) の病原性機序解明のため、網羅的な全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) と培養細胞への影響について評価を行った。

B. 研究方法

1. WGS 解析

国内で 2007-2021 年に分離された 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。また、HUS 患者由来株 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

クエンスを TruSeq および Unicycler を用いたハイブリッドアセンブリで完全長配列 (コンプリートゲノム) の決定を行った。取得したコンプリートゲノム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. 培養細胞を使用した表現型の確認

培養細胞を使用した細胞付着性試験、及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 患者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約 100 MOI 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 患者由来株のうち 8 株で保有が確認された付着関連遺伝子 *saa* の発現状況を分子生物学的に評価するため、細胞付着性試験で付着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。細胞毒性試験については HUS 患者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、同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無かったため HUS 患者由来株のみとした (表 2)。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。

C. 研究結果

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 3)。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 \times 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 患者由来株についてロングリードシーケンス解

析を行い、新たに 4 株のコンプライトゲノムを決定した。さらに、既を取得済みの 4 株と合わせた 8 株の HUS 患者由来株について、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 4)。

2. 培養細胞を使用した表現型の確認

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 5)、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。付着した 19 株のうち 5 株 (O183:H18 が 4 株、O174:H2 が 1 株) は付着関連遺伝子 *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 2)。HUS 患者由来株の付着性試験では *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 株から作製した *saa* 破壊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。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 3)、平均細胞サイズは HUS 患者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 4)。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 患者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 5)。

D. 考察

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い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。

HEp-2 細胞を使用した付着性の解析結果では、細胞への付着株数は 19 株 (6.1%) のみであり、細胞への付着と LEE(-)血清群 EHEC の発症との関連性は示されなかった。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。また、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はあると考えられた。しかし、細胞への付着以外の因子についても病原性発揮に関与している可能性はあるため、細胞付着性以外の因子にも着目して検討を行っていく必要があると考えられる。

HUS 患者由来株の解析では、取得したコンプライトゲノム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、今回検討を行った条件ではいずれも LEE(-)血清群 EHEC 感染症の重症化因

子として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 患者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。

細胞へ付着した株のうち 15 株 (78.9%) は細胞付着形態から付着因子の特定が困難であった。LEE を保有する EHEC の細胞への付着形態は局在性付着であることが既に知られているが、本研究により LEE を保有しない株の細胞付着形態は多様であり、*eibG* 以外については付着形態による付着因子の特定は困難であることが明らかとなった。また、LEE(-)血清群 EHEC においても細胞への付着は病原性に関与している可能性があることから引き続き付着因子の特定を行っていくことも重要であると考えられる。

E. 結論

LEE を保有しない LEE(-)血清群 EHEC は LEE を保有する EHEC と HEp-2 細胞への付着状況が異なることが明らかとなった。病原性発揮に関与する因子については、細胞付着因子以外にも着目して解析を行っていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

なし.

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

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. 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3. 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4. 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5. 細胞に付着した株の血清型と付着株数

O血清	H血清	付着株数
O74	HUT	1
O113	H21	5
O115	H10	2
O166	H28	1
O174	H2	1
	H8	1
	H20	1
O183	H18	5
OX18	H2	1
	H19	1
Total		19

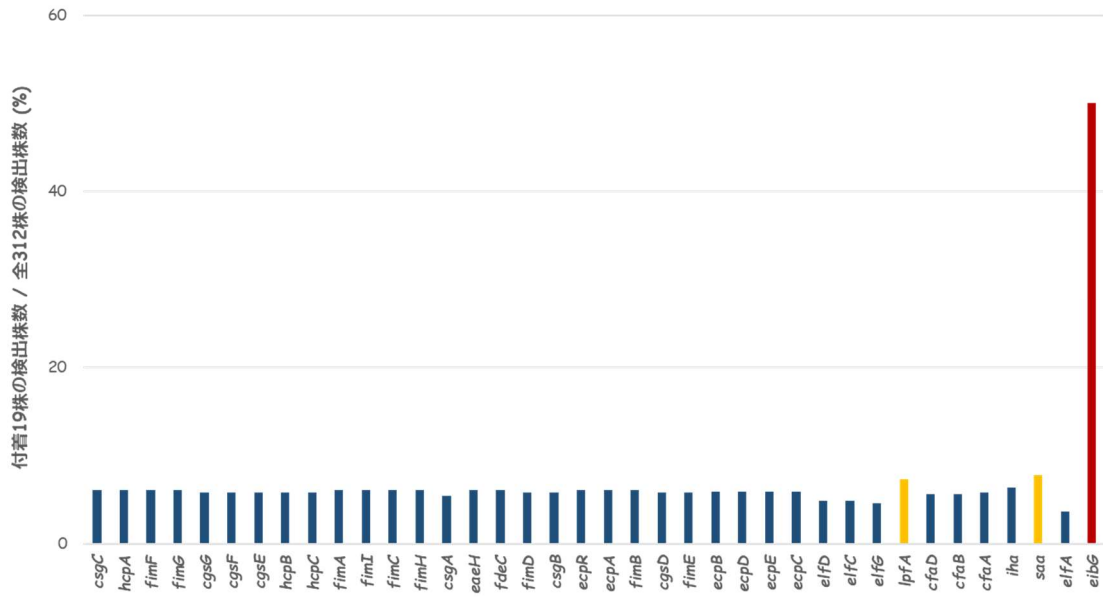
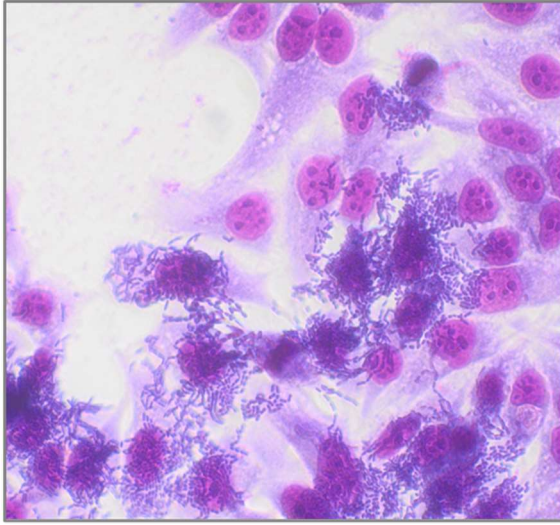


図 1. LEE 非保有 EHEC の細胞付着株と全 312 株の付着関連遺伝子保有率

(A)



(B)

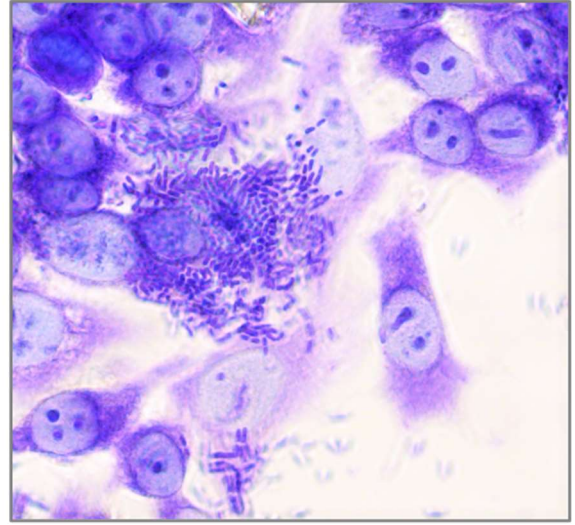


図2 .HEp-2 細胞への付着性試験により Chain-like adherence (CLA) を示した O183:H18 株 (A) と CLA 以外の付着形態を示した O174:H2 株 (B)

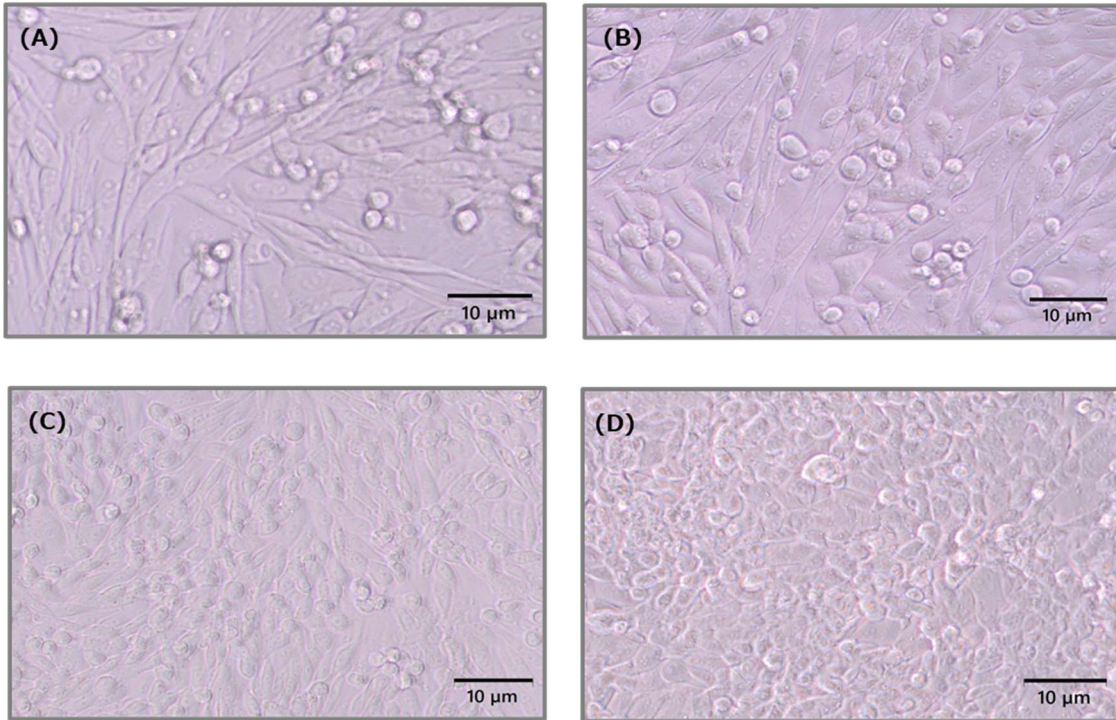


図 3 . CHO 細胞の細胞伸長試験により細胞伸長が認められた *cdt* 保有株 JNE131328 (A) と JNE120393 (B)、および陰性対照の *cdt* 非保有株 JNE082640 (C) と菌液非接種コントロール (D)

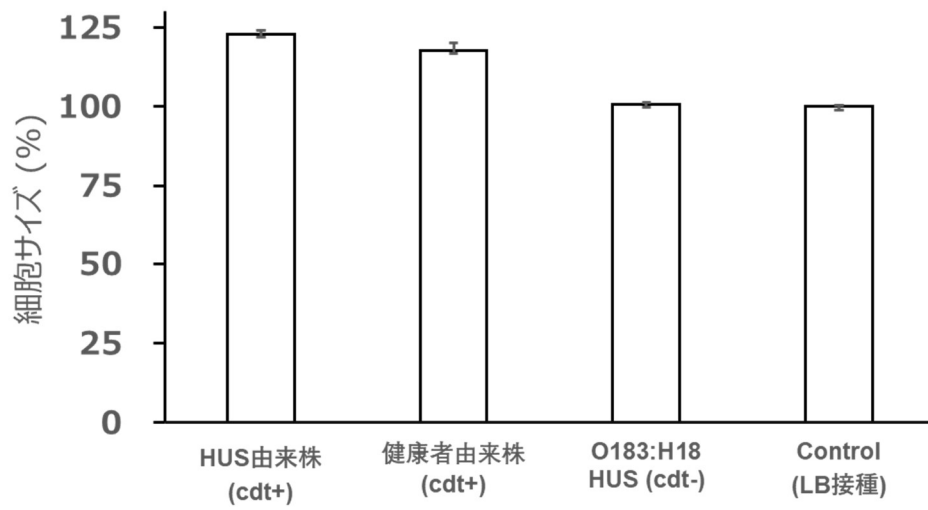


図4. HUS患者由来株と健康者由来株の菌液を接種したCHO細胞の平均細胞サイズ測定結果

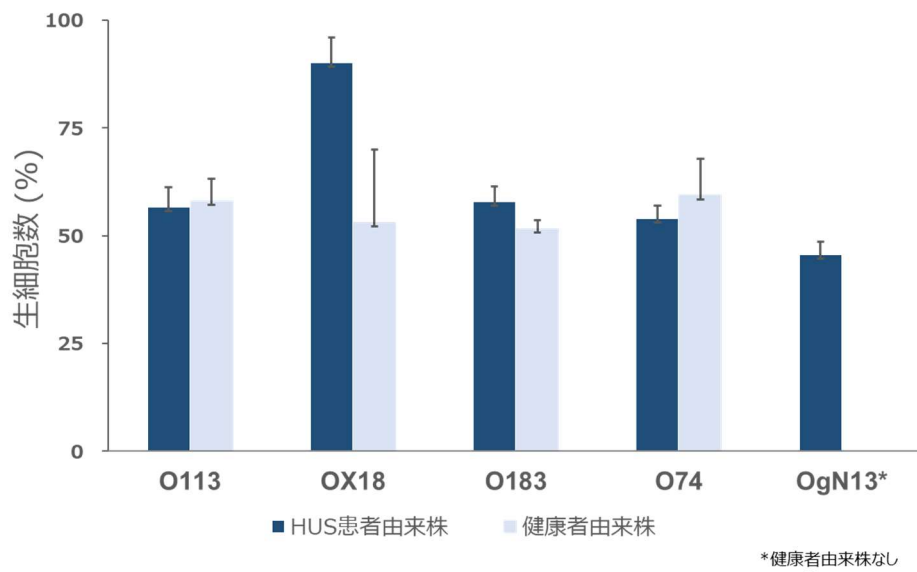


図5. HUS患者由来株と健康者由来株の菌液を接種したCHO細胞のO血清群別生細胞数