

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5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 0166:H15 の病原性究明と分離検出法開発のためゲノム解析と細胞付着因子の特定、および特徴的な性状の探索を試みた。性状の探索のため薬剤感受性試験、既存選択培地における発育状況等観察、および Phenotype microarray による網羅的な炭素源分解能の測定を行ったが分離検出に有用な性状は確認されなかった。付着因子特定のためプラスミド導入株の作製と付着性の解析を行った結果、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在している可能性が示唆された。完全長配列を用いた解析では食中毒事例株にのみ共通する病原性関連遺伝子は検出されなかったが、系統解析においては、食中毒事例株が共通して ST2914 に分類されることが明らかとなり、ST2914 が 0166:H15 株における病原性系統である可能性が示唆された。

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)、腸管毒

素原性大腸菌 (*enterotoxigenic E. coli*: ETEC)、腸管凝集性大腸菌 (*enteroaggregative E. coli*: EAEC) 等に分類される。EHEC や ETEC では特定の毒素遺伝子、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。しかし、既存の下痢原性大腸菌分類には属さないものの、集団下痢症事例の起因菌として分離されることから病原性が示唆される大腸菌も存在する。そのうち、EAEC heat stable toxin (EAST1) をコードする遺伝子 (*astA*) を保有する大腸菌は、複数の血清型で食中毒起因菌として報告されている。*astA* 保有大腸菌については多様な血清型の大腸菌から検出されることが知られているが、前年度までの研究によりこれらが系統的に多様であることが判明している。一方で、*astA* 保有大腸菌の血清型のうち 0166:H15 については、食中毒起因菌として最も多く報告される血清型であり、さらに我々のこれまでの研究により同血清型の食中毒事例由来株が培養細胞に付着性を示すことが明らかとなった。そのため、本研究では *astA* 保有大腸菌のうち血清型 0166:H15 の株に着目し、完全長配列を使用したゲノム解析および細胞付着因子の特定による病原性の究明を行った。さらに、有用な分離検出法の開発のため特徴的な生化学的性状の探索も試みた。

B. 研究方法

[1] 食中毒由来大腸菌 0166:H15

株の系統解析

3 事例の食中毒事例由来株を含む 15 株の *astA* 保有大腸菌 0166:H15 (表 1) の WGS データ、および公共のデータベース (Enterobase、<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) に登録されている同血清型のシーケンスデータを使用してコアゲノムから抽出した SNP による系統樹を作製した。さらに、ゲノム解析により *astA* および各下痢原性大腸菌に関連する遺伝子 (*stx*, *elt*, *est*, *aggR*) の検出、Multilocus sequence typing (MLST) による ST の検出も行った。

[2] 完全長ゲノム配列の解析

astA 遺伝子の局在場所の同定や、特徴的なゲノム構造を明らかにするために、0166:H15 4 株および 07:H4 2 株の完全長ゲノム配列を決定した (表 2)。ロングリード解析のための DNA は、BPW 一晚培養液から、MagMAXDNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit を用いて抽出した。抽出 DNA を用いて Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore) にてライブラリー調整を行った。得られたライブラリーのシーケンス解読を R9.4.1 フローセルおよび MinION (Oxford Nanopore) にて行った。得られたロングリードおよび、過去に解読したショー

トリードを用いて、Trycycler および Unicycler を用いたハイブリッドアセンブリを行い、完全長ゲノム配列を決定した。決定した完全長ゲノム配列を用いて、保有遺伝子の BLAST による比較、replication typing (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)、薬剤耐性遺伝子の検索 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) をおこなった。染色体 CDS の BLAST 比較は GView Server (<https://server.gview.ca/>)、*astA* が存在する巨大プラスミド CDS の BLAST 比較は、GenomeMatcher (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html>) によって行った。

[3] プラスミド導入株の作製と細胞付着性の解析

JNE21-003 の完全長配列の解析により確認された 140 kbp のプラスミド (pJNE21-003-1)、および 84 kbp のプラスミド (pJNE21-003-2) について、 λ red-recombination システムにより各プラスミドにカナマイシン (Km) 耐性遺伝子を付与した後、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法により細胞非付着性の株 (DH10B) へ導入し、Km 添加 LB 培地に塗抹するこ

とでプラスミド導入株のセレクションを行った。作製したプラスミド導入株 (DH10B / pJNE21-003-1、DH10B / pJNE21-003-2) について CHO 細胞での細胞付着性の解析を行うことで付着に關与する遺伝子がプラスミド上に存在する可能性について評価を行った。

[4] Tn-seq 解析と遺伝子破壊株の作製

上記 3 の解析によって、染色体上に付着関連遺伝子が存在する可能性が示唆されたため、Tn-seq 解析を実施した (図 3)。まず、JNE21-003 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た。作製されたライブラリーを LB に懸濁した菌液をサンプルとして CHO 細胞による付着性試験を実施した。3 時間の感染を行った後、非付着株を除去するため PBS で 3 回洗浄、0.2% 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 時間培養後、取得した菌体から DNA の抽出を行った。CHO 細胞接種前のランダム破壊株から抽出した DNA サンプルを input、付着性試験後に回収した菌体から抽出した DNA サンプルを output として各サンプルについて Tn-seq 解析

を実施しシーケンスデータを取得した。取得した各サンプルのシーケンスデータを JNE21-003 の染色上から検出された 4837 の遺伝子へマッピングを行い、さらに Tn-seq Explorer を用いた解析によりマッピングデータの各遺伝子のカウント数について、遺伝子サイズの違いにより生じる誤差の修正、および値が 0 に近いほど必須遺伝子である可能性を示す必須性指数の算出を行った。input および output サンプルのカウント数から各遺伝子の output/input の値を算出し、必須性指数についてはグラフ化することで必須遺伝子と非必須遺伝子の境界値の推定を行った。

[5] 薬剤感受性試験

17 株の *astA* 保有大腸菌株を対象に 12 の薬剤 (表 3) についてディスク拡散法にて薬剤感受性試験を実施した。CTX 耐性が確認された株については、WGS 解析により ESBL 産生遺伝子の検出状況の確認も行った。

[6] 生化学的性状試験

0166:H15 株 (集発由来株および非集発由来株)、Sakai 株、EHEC 026:H11 株、K12 (MG1655) について XM-G、SS、DHL、SMAC、RX-026、クロモアガーSTEC、Vi-EHEC、XM-

EHEC の各培地に画線塗抹を行い、発育状況やコロニーの色調等観察を行った。さらに、Phnotype microarray (Biolg 社) の PM1、PM2 プレートにより 192 種類の炭素源利用能の測定を行った。方法は取扱説明書に準拠し、結果の判定はプレートリーダーによる各ウェルの吸光度の測定および目視による色調変化の確認により行った。

C. 研究結果

[1] 食中毒由来大腸菌 0166:H15 株の系統解析

SNP の抽出結果から最尤法により作製した系統樹、および MLST と各遺伝子保有状況について図 4 に示した。0166:H15 株は 4 種類の MLST に分類されたが、解析を行った多くの株は ST349 に分類され、一方で 3 事例の食中毒由来株はいずれも ST2914 に分類された。ST2914 の系統には日本以外にも複数の国から分離された株が含まれていた。*astA* および下痢原性大腸菌 (EHEC、ETEC、EAEC) に関連する遺伝子は ST349 と ST2914 の両方の系統の株から検出された。

[2] 完全長ゲノム配列の解析

染色体のサイズは、0166:H15 で

は 4.8 Mb から 5.1 Mb、07:H74 では 4.7 Mb であった (表 2)。保有プラスミドは 1 から 4 種であり、全ての菌株において 100 kb 以上の巨大プラスミドの保有が認められた。*astA* 遺伝子は染色体または巨大プラスミド上に 1 から 3 コピー認められた。0166:H15 では *astA* 保有プラスミド上に多数の薬剤耐性遺伝子が認められた。07:H4 では染色体上に薬剤耐性遺伝子が存在した。CDS の比較を行ったところ、染色体上に食中毒株特異的な領域は認められなかった (図 1)。病原遺伝子島の検索からは、莢膜関連遺伝子 (*kps* 等) および VI 型分泌装置関連遺伝子群が外来遺伝子として検出された。*astA* を保有するプラスミドの比較を行った結果、食中毒由来 0166:H15 および 07:H4 では類似したプラスミドを有することが明らかとなった (図 2)。一方、散発下痢症由来で *stx* を有する株 (JNE162304) では、類似したプラスミドは認められなかった。同プラスミドに共通する特徴は、VI 型分泌装置関連遺伝子群 (染色体上に存在する遺伝子とは異なる) および *bfp* オペロンの存在であった。

[3] プラスミド導入株の作製と細胞付着性の解析

JNE21-003 の各プラスミド導入株 (DH10B pJNE21-003-1、DH10B pJNE21-003-2) の CHO 細胞への付着性試験についてはいずれも非付着性であった (図 5)。そのため、付着に関与する遺伝子は染色体ゲノム上に存在する可能性が示唆された。

[4] Tn-seq 解析と遺伝子破壊株の作製

Tn-seq により取得したシーケンスデータについて染色体ゲノム上へマッピングと Tn-seq Explorer による解析を行った。output/input の値と遺伝子数のグラフ化により、output と input で差が認められないことから 1 を示す遺伝子が最も多く (1016 種類) 検出された (図 6A)。さらに必須性指数と遺伝子数のグラフ化により、必須及び非必須遺伝子により示される二峰性のグラフからその最低値の 8 以上が非必須遺伝子である可能性が示唆された (図 6B)。染色体上の 4,837 の遺伝子のうち output/input の値が 0.9 以下となる遺伝子は 1,194 種類、そのうち必須性指数が 8 以上の遺伝子は 1,078 種類存在した (図 6C)。

[5] 薬剤感受性試験

astA 保有株 17 株を対象に 12 薬

剤に対する感受性試験を実施した結果、0166:H15については3事例のうち2事例で同一耐性パターンを示した(表4)。さらに8事例の食中毒由来株のうち5事例はアンピシリン耐性を示し、CTX耐性であった3株からは *bla_{CTX-M}* が検出された。

[6] 生化学的性状試験

大腸菌 0166:H15の各事例株等について8種類の培地へ画線塗抹を行い発育状況やコロニーの色調について観察を行った結果、大腸菌 0166:H15はCT添加培地に発育しないことが確認され、発育が確認された培地のコロニーについて特徴的な性状は認められなかった。また、Phenotype microarrayによる炭素源利用能の測定結果では、MacConkey基礎培地等への添加により容易に作成可能な分離培地の開発を目的としているため、炭素源のうち糖に着目して評価を行ったが、条件に合うものは確認されなかった。

D. 考察

本研究では *astA* 保有大腸菌のうち食中毒起因菌として複数回報告されている血清型である 0166:H15の株に着目し解析を行った。分離検出法開発を目的とした特徴的な

性状等探索では、簡便な検出法に利用可能な性状等は検出されなかった。一方で、病原性究明を目的としたゲノム解析や表現型の解析では有用なデータを取得することができた。

0166:H15株が示す MLST 結果のうち ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。さらに、昨年度から実施している細胞付着性の解析においても、3事例の食中毒事例由来株(ST2914)のみが細胞付着性を示したことも病原性系統を示唆する裏付けとなっている。また、公共データベース上の ST2914 の株には、日本以外の複数の国における分離株が含まれていたことから、集団下痢症の起因菌となる 0166:H15 株は国外においても分布している可能性が示唆された。しかし、完全長配列によるプラスミドや染色体の比較では、3事例の食中毒事例由来株のみが共通して保有する既知の付着関連遺伝子や病原性関連遺伝子は確認されなかった。そのため、病原性解明や付着因子特定のためには、検出された既知の病原性遺伝子の詳細な解析、あるいは未特定の病原因子にも着目して解析を続ける必要がある。

astA 保有大腸菌 0166:H15 の付着に関与する遺伝子は染色体上に

存在する可能性が示唆された。しかし、JNE21-003 の染色体上には 4,837 種類の遺伝子が確認され、そのうち output/input の値が 1 より少ない値となる遺伝子は 1,194 種類存在した。付着因子特定を行うには、今後、抽出した各遺伝子の破壊株等作製など追加の解析が必要となってくることから、より可能性が高い遺伝子を抽出するための条件設定が重要となる。必須性指数については、今回の解析により値が 8 以上の遺伝子が非必須遺伝子である可能性が高いことが確認されたが、output/input 値については指標となる数値が現時点で存在しない。しかし、本研究により JNE21-003 が保有する 140 kbp と 84 kbp のプラスミドは CHO 細胞への付着性には関与していないことが示唆されたことから、Tn-seq データをこれらプラスミド上の遺伝子にマッピングし、同様の解析を行うことで、抽出条件設定に有用なデータが取得される可能性がある。今後、遺伝子破壊株の作製とその解析等により、本菌の付着因子が特定されれば、各検査機関で利用可能となる簡便な検出系の確立が可能となることから、引き続き解析を行うことが重要であると考えられる。

E. 結論

血清型が 0166:H15 である *astA* 陽性大腸菌に着目した解析により、ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。本菌の病原性究明のためには、引き続き付着因子の特定や病原性関連遺伝子の詳細な解析を行う必要がある。

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)

李 謙一. EHEC における WGS 解析. 令和 5 年度 北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者研修会. 令和 6 年 1 月 18 日. 岩手

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

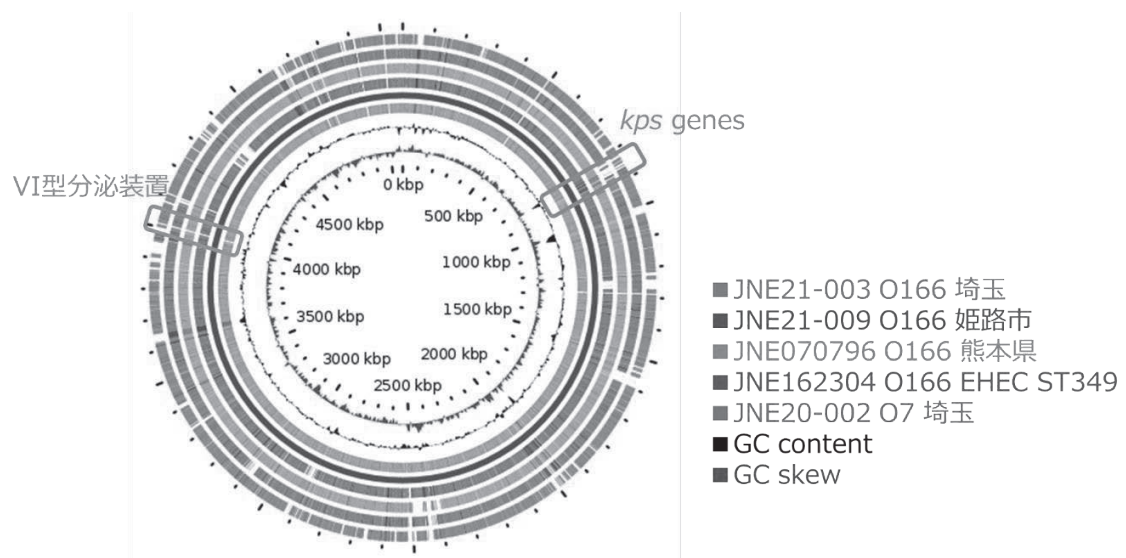


図 1 BLAST atlas による O166:H15 および O7:H4 完全長ゲノム配列の比較

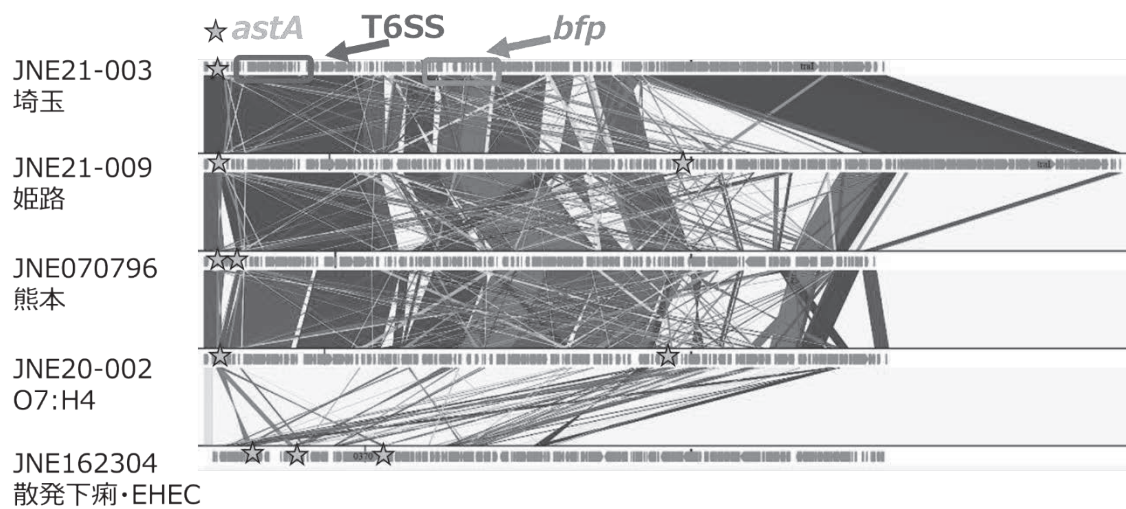


図 2. *astA* 保有プラスミドの完全長配列比較

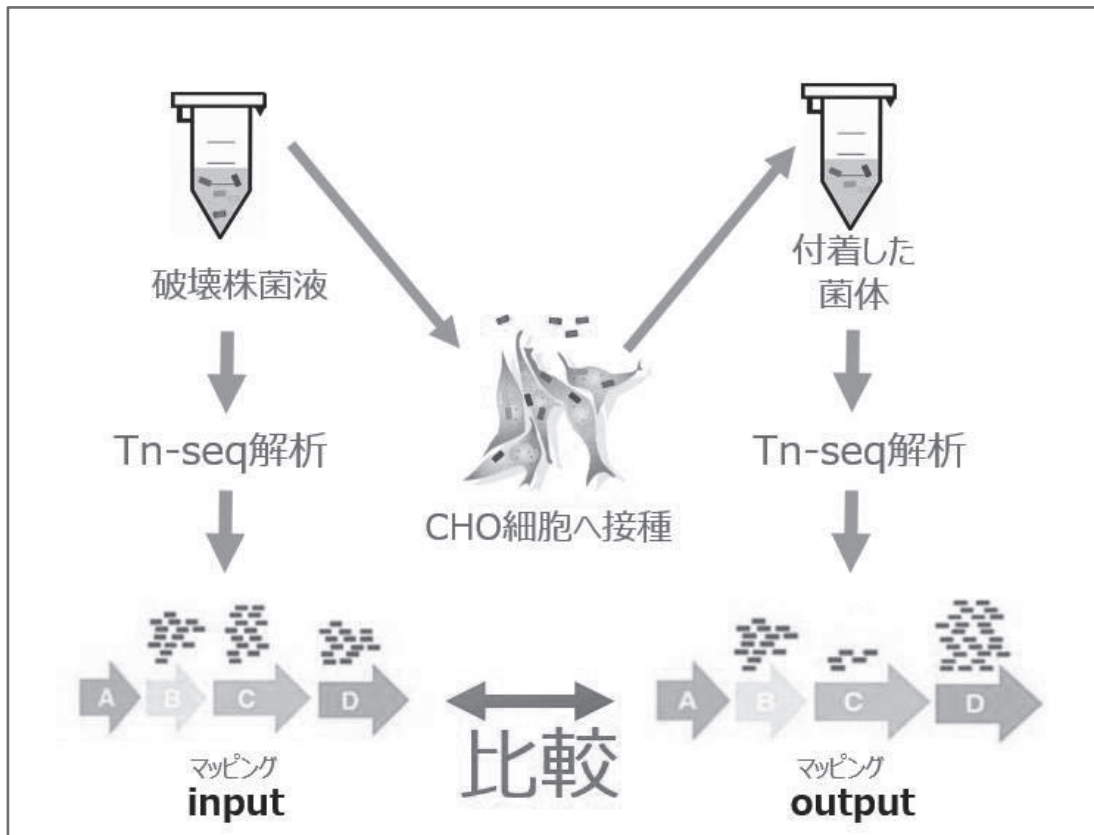


図 3. Tn-seq 解析法を用いた細胞付着因子特定の概要

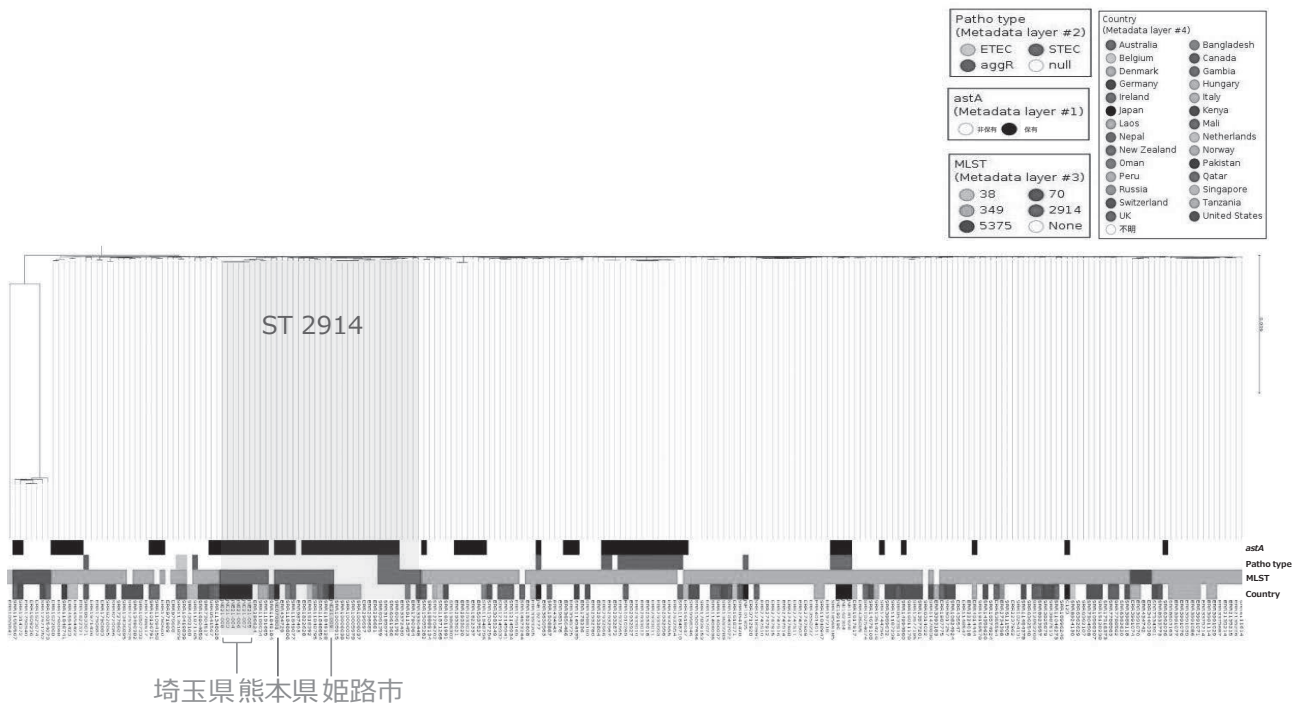


図 4. *astA* 保有大腸菌 O166:H15 の系統解析と各食中毒事例株の系統

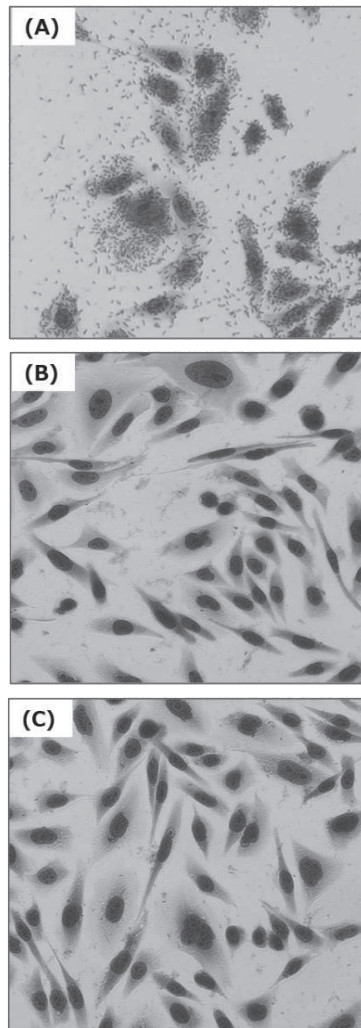
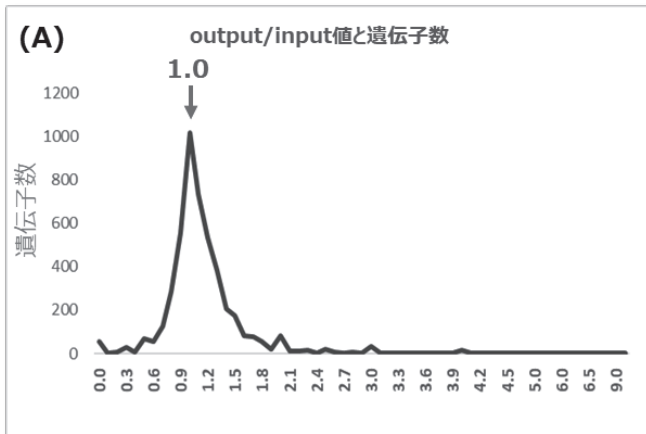


図 5. JNE21-003 (A) および DH10B に JNE21-003 のプラスミドを導入した DH10B/pJNE21-003-1 (B) と DH10B/pJNE21-003-2 (C) の CHO 細胞における付着性試験結果



(C)

| output/input | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 合計 |
|--------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 遺伝子数 | 57 | 2 | 8 | 29 | 8 | 67 | 57 | 128 | 284 | 554 | 1194 |
| EI*8以上の遺伝子数 | 38 | 2 | 7 | 13 | 7 | 44 | 50 | 104 | 268 | 545 | 1078 |

*EI, 必須性指数

図 6 . Tn-seq データを JNE21-003 染色体上の遺伝子にマッピング後の各 output/input 値の遺伝子数 (A)、各必須性指数の遺伝子数 (B) および output/input が 0.9 以下の遺伝子数と合計

表1. 系統解析に使用した株

| 分類 (株数) | ID | 血清型 | 由来 |
|---------------|-----------|----------|-------------|
| non-EHEC (10) | JNE070796 | O166:H15 | 食中毒事例 (熊本県) |
| | JNE070801 | O166:H15 | 食中毒事例 (熊本県) |
| | JNE21-003 | O166:H15 | 食中毒事例 (埼玉県) |
| | JNE21-004 | O166:H15 | 食中毒事例 (埼玉県) |
| | JNE21-005 | O166:H15 | 食中毒事例 (埼玉県) |
| | JNE21-006 | O166:H15 | 食中毒事例 (埼玉県) |
| | JNE21-007 | O166:H15 | 食中毒事例 (埼玉県) |
| | JNE21-008 | O166:H15 | 食中毒事例 (埼玉県) |
| | JNE21-009 | O166:H15 | 食中毒事例 (姫路市) |
| | | C123 | O166:H15 |
| EHEC (5) | JNE181928 | O166:H15 | 散発下痢症 (宮城県) |
| | JNE162304 | O166:H15 | 散発下痢症 (大阪府) |
| | JNE101305 | O166:H15 | 散発下痢症 (愛知県) |
| | JNE192196 | O166:H15 | 健康者 (香川県) |
| | JNE192777 | O166:H15 | 健康者 (山梨県) |

表2. 完全長ゲノム配列の特徴

| ID | Serotype | Source | Replicon | size (bp) | Replicon typing ^a | astA | Antimicrobial resistance gene |
|-----------|----------|-------------|--------------------|-----------|---------------------------------|-------------------------|---|
| JNE21-003 | O166:H15 | 埼玉県 食中毒 | chromosome | 5,070,559 | - ^b | v31×3 | - |
| | | | p140k ^c | 139,944 | IncFII | X12 | - |
| | | | p85k | 84,721 | IncI1-I(Alpha) | - | - |
| | | | p33k | 3,345 | - | - | - |
| | | | p2k | 1,945 | - | - | - |
| JNE21-009 | O166:H15 | 姫路市 食中毒 | chromosome | 5,144,898 | - | - | - |
| | | | p189k | 188,563 | IncFII | X11, v17 | - |
| | | | p163k | 163,241 | IncFII(pHN7A8) | - | <i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA5</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>mph(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA17</i> |
| | | | p2k | 2,012 | - | - | - |
| | | | chromosome | 5,050,164 | - | v31×3 | - |
| JNE070796 | O166:H15 | 熊本県 食中毒 | p138k | 138,061 | IncFII(pHN7A8) | prot, v17v ^d | - |
| | | | p92k | 91,511 | IncFII | - | <i>aac(3)-IId</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aadA5</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>mph(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA17</i> |
| | | | p58k | 5,831 | - | - | - |
| | | | chromosome | 4,830,611 | - | - | - |
| | | | p140k | 140,281 | - | protv×3 ^c | - |
| JNE162304 | O166:H15 | 散発下痢 大阪府 | p112k | 112,125 | IncFIB(AP001918),IncFII(pHN7A8) | V25 | - |
| | | | p59k | 59,430 | IncI2(Delta) | - | - |
| | | | chromosome | 4,724,187 | - | - | <i>blaCTX-M-15</i> , <i>qnrS1</i> |
| | | | p141k | 140,595 | IncFIC(FII) | X08, X13 | - |
| | | | chromosome | 4,724,738 | - | - | <i>blaCTX-M-15</i> , <i>qnrS1</i> |
| JNE20-002 | O7:H4 | 埼玉県 食中毒 | p142k | 140,755 | IncFIC(FII) | X08, X13 | - |
| JNE20-005 | O7:H4 | | | | | | |

^aInc type identified by PlasmidFinder

^b-, not detected

^cp, plasmid

^dv17v, single nucleotide variant of v17; protv, single nucleotide variant of prot

表3. 薬剤感受性試験に使用した薬剤

| 略記 | 薬剤名 |
|------|-----------------------------------|
| AM | Ampicillin |
| ST | Sulfamethoxazole and trimethoprim |
| TC | Tetracycline |
| NA | Nalidixic acid |
| SM | Streptomycin |
| CP | Chloramphenicol |
| GM | Gentamicin |
| CTX | Cefotaxime |
| CFX | Cefoxitin |
| KM | Kanamycin |
| CPFX | Ciprofloxacin |
| FOM | Fosfomycin |

表4. 各供試株の薬剤感受性パターンとESBL産生遺伝子

| 血清型 | non-EHEC /EHEC | 自治体 | 株数 | 耐性パターン | ESBL産生遺伝子 |
|-----------|-------------------|------|----|------------------------|-----------------------------|
| O166:H15 | non-EHEC | 埼玉県 | 2 | | |
| | non-EHEC | 熊本県 | 2 | AM-ST-TC-NA-SM-GM | |
| | non-EHEC | 姫路市 | 1 | AM-ST-TC-NA-SM-GM | |
| | EHEC | 宮城県他 | 4 | | |
| | EHEC | 山梨県 | 1 | AM-ST-TC-NA-SM-CP-CPFX | |
| O7:H4 | non-EHEC | 埼玉県 | 2 | AM-CTX | <i>bla</i> _{CTX-M} |
| | non-EHEC | 東京都 | 1 | TC | |
| | EHEC | 鹿児島県 | 1 | AM-ST-TC-NA-SM-CP | |
| O169 :H45 | non-EHEC | 姫路市 | 1 | AM | |
| OgGp9:H18 | non-EHEC | 姫路市 | 1 | | |
| OgGp7 :H6 | non-EHEC | 姫路市 | 1 | AM-CTX | <i>bla</i> _{CTX-M} |