

総合研究分担研究
報告書

病原大腸菌食中毒事例株の解析

伊豫田 淳

令和 3 ～ 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 保有大腸菌に特徴的な系統や病原性因子等を明らかにするために、国内分離大腸菌等 3,613 株のゲノムを用いた *astA* 保有株の検索、*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。さらに血清型が O166:H15 である *astA* 保有大腸菌の病原性究明を行うためゲノム解析と細胞付着因子の特定、および分離検出法開発のため特徴的な性状の探索を試みた。*astA* 保有株の探索では、約 3% で同遺伝子の保有が認められ、O26:H11 および O115:H10 で比較的高い保有率が認められた。さらに同遺伝子の多くは 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。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 O7:H4 および O166: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、O166:H15 および OgGp9:H18 において CHO および INT407 細胞への付着性が認められた。2020 年の大規模食中毒から分離された大腸菌 O7:H4 について、公共データベースから近縁株のゲノムを抽出して系統解析を行ったが、直接的な関連性が疑われる近縁株は見出されなかった。一方で、複数の血清型の有症事例由来 *astA* 保有大腸菌を用いた系統解析においても株間の関連性は見出されなかったことから、*astA* 保有大腸菌は系統的に多様であることが判明した。大腸菌 O166:H15 に着目した解析では、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。さらに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 O166: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 窪村亜希子、李 謙一
地方衛生研究所等

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原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原菌として報告されている。一方で、*astA* 保有大腸菌は健康者からも検出されることが知られているが、食中毒由来株との特徴的な違いや病原性について明らかとなっていない。本研究では、ゲノム解析による *astA* の分布調査や周辺領域の解析、食中毒事例由来株を用いた系統解析、完全長ゲノム配列による病原性関連遺伝子の保有状況比較、ウェスタンブロッティングによる EAST1 の定性的な発現解析と培養細胞への感染実験による表現型確認を行った。さらに *astA* 保有大腸菌のうち食中毒起原菌として最も多く報告される血清型である O166:H15 の株について、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を試みた。

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国立感染症研究所・細菌第一部でゲノム解読を行った大腸菌等 (*E. albertii* を含む) 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/services/VirulenceFinder/>) 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 種の配列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' - TCRGAGTGACKRCYYTGTA-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] 集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される 9 件の集団下痢症事例株で 11 種類の血清型を含む 26 株の *astA* 陽性大腸菌、および O166:H15 株に着目した解析を行うため 5 株の非集発由来 EHEC 株についても WGS データを使用して 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、最尤法により系統樹の作製、および WGS デー

タの解析により保有する遺伝子の網羅的な検出や Phylogenetic group の確認も行った。さらに、2020 年に 2,958 名の患者が報告された、海藻を原因食品とする食中毒事例から分離された大腸菌 07:H4、および 3 事例の食中毒事例から分離された株を含む 15 株の大腸菌 0166:H15 については、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ゲノムデータを用いて国際比較を行った。系統解析は上記の解析パイプラインを用いて行い、さらに Multilocus sequence typing (MLST) による ST の検出も行った。

[4] 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。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、

replicon typing (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)、薬剤耐性遺伝子の検索 ([inder\) を行った。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。](http://genepi.food.dtu.dk/resf</p></div><div data-bbox=)

[5] 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ト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。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 μm 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。ウェスタンブロット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。

[6] 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付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 1.0×10^7 の菌を接種、1 時間培養後に PBS で 3 回洗浄し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。細胞付着性は 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。試験方法は一晩培養菌液を約 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。

[7] プラスミド導入株の作製と細胞付着性の解析

JNE21-003 (食中毒由来 *astA* 保有大腸菌 0166:H15 株) 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 細胞による細胞付着性の解析を行うことで付着に関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。

[8] Tn-seq 解析と遺伝子破壊株の作製

上記 6 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。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 解析を実施しシークエ

ンスデータを取得した。取得した各サンプルのシークエンスデータを JNE21-003 の染色上から検出された 4,837 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。

[9] 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。

[10] 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 (Bilolig 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] ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査

国内大腸菌ゲノムを用いて *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。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 などの細胞付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。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 IS1414 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 (EASTOAS1 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] 集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される *astA* 陽性大腸菌の系統解析においては、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。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。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 細胞への付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付着因子は検出されなかった。公共データベースに登録されているゲノムデータを用いた解析のうち、血清型が 07:H4 の株については、2020 年の食中毒由来株と近縁であった 49 株を用いて系統樹を作製した結果、食中毒由来株と最も近縁であったのは、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。血清型が 0166:H15 の株については、作製した系統樹、MLST および各遺伝子保

有状況の結果では、0166:H15 株は 4 種類の MLST に分類され、解析を行った多くの株は ST349 に分類されたが、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。

[4] 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。

[5] 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。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。細胞付着性試験では 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付着性は認められなかった。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 株が細胞への付着性を示したが、

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付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、細胞付着性は認められなかった。[6] 完全長配列の解析

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。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。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。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。

[7] 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。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。

[8] 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。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。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 1194 種類、そのうち必須性指数が 8 以上の遺伝子は 1078 種類存在した。

[9] 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。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。

[10] 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

astA 保有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、本研究では所内に保管される過去 15 年分の大腸菌から取得したゲノムデータ、および過去の食中毒事例から実際に分離された菌株を複数用いて解析を行ったことで、*astA* は大腸菌の約 3% から検出されること、*astA* 保有大腸菌は系統的に多様であること、さらに一部の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などを明らかにした。さらに 0166:H15 の血清型については、*astA* 保有大腸菌による食中毒事例において最も多く報告されることなどから、本菌について分離検出法の開発を試みたが、簡便な分離検出法に利用可能な性状等は検出されなかった。しかし、病原性究明を目的としたゲノム解析や表現型の解析により有用なデータを取得することができた。

astA 保有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* 保有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。大規模食中毒由来大腸菌 07: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。

ウェスタンブロットニングの解析結果からいずれの *astA* 保有大腸菌株も 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。0gGp7:H6 株 (JNE21-011) については培養細胞への感染実験において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。一方で、細胞付着性試験においては、食中毒事例由来 0166:H15 株と 0gGp9:H18 株が CHO および INT407 細胞への付着性を示した。細胞への付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。

0166:H15 株に着目した系統解析から、ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。さらに、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をして解析を続ける必要がある。

0166:H15の付着に關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。output/input値についても指標となる有用なデータを取得していく必要があるため、取得したデータについて追加の解析を行っていく必要がある。今後、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

*astA*は国内分離大腸菌にも広く分布し、さらに*astA*保有大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。血清型が0166:H15である*astA*陽性大腸菌については、細胞付着性を示すことが明らかとなり、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)

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)

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. 知的財産権の出願・登録状況

なし