

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）について、病原性遺伝子領域 LEE の有無（LEE(+)マイナー血清群および LEE(-)血清群）に分類し、重症化因子の特定に向けた解析および既存培地による分離検出の有用性について評価を行った。網羅的な病原遺伝子検出により LEE(+)マイナー血清群 EHEC の重症例由来株から *katP* 等の遺伝子が高率に検出されることを特定した。*katP* および LEE(-)血清群 EHEC の重症例から高率に検出された *katN* の遺伝子保有状況調査により、いずれも重症率の高い血清型において保有が確認され、抗酸化に関与する因子は特定の血清型の非メジャー血清群 EHEC において重症化に寄与している可能性が示唆された。また、死亡例由来 LEE(-)血清群 EHEC 株の培養細胞への付着性は本菌の外膜タンパクが担っていることを明かにした。さらに、非メジャー血清群 EHEC の半数以上が CT 含有培地において発育が困難であることも確認され、今後 CT 以外の選択剤等にも着目して有用性を評価していく必要があると考えられた。

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。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、非メジャー血清群の EHEC についても着目していく必要がある。

我々はこれまで、過去 15 年間に国内で分離された非メジャー血清群 EHEC のうち HUS 症例由来株が含まれる 14 種類の O 血清群に着目し、これら対象株を病原性遺伝子領域である locus of enterocyte effacement（LEE）を保有しない血清群（LEE(-)血清群）と、保有するが主要ではない血清群（LEE(+)マイナー血清群）の EHEC に分類して解析を行ってきた。昨年

度行った LEE(-)血清群 EHEC の解析では、重症例由来株から *katN* 等複数の遺伝子が有意に高率に検出されること、複数の HUS 症例由来株が未特定の細胞付着因子により HEp-2 細胞に付着性を示していることなどを明らかにした。

本研究では、昨年度取得した LEE(+)-マイナー血清群 EHEC の全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) 解析に加え、LEE(-)血清群 EHEC の *katN* の解析および未特定の細胞付着因子の特定を試みるとともに非メジャー血清群 EHEC について既存培地による分離検出の有用性について評価を行った。

B. 研究方法

1. LEE(+)-マイナー血清群 EHEC の系統解析

昨年度取得した LEE(+)-マイナー血清群 EHEC のうち、HUS 発症由来株を含む 7 種類の O 血清 (O51, O70, O76, O80, O109, O172, O177) に属する 95 株 (表 1) の WGS を使用し、Multilocus sequence typing (MLST) による ST の特定、および SNP 抽出による系統解析を行った。さらにゲノム解析により供試株の血清型および *eae* 保有状況を特定し、各菌株の疫学情報 (発症の有無等) と併せて系統樹のメタデータとして使用した。

2. LEE(+)-マイナー血清群 EHEC の保有遺伝子比較解析

LEE(+)-マイナー血清群 EHEC の重症化に関与する遺伝子を特定するため、1 で解析を行った 95 株のうち *eae* が検出された株を対象株 (LEE(+)-マイナー血清群 EHEC)

として網羅的な病原性関連遺伝子検出を行った。さらに対象株を重症例から分離された株 (重症株) とそれ以外の株 (非重症株) に区分して遺伝子保有状況を比較し、カイ二乗検定により重症例から有意に高率に検出される遺伝子を特定した。特定された遺伝子については O 血清群別の保有率も算出した。病原性関連遺伝子検出方法は、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。

3. *katN* の表現型の解析および保有状況調査と検出系の開発

LEE(-)血清群 EHEC のうち重症例から高率に検出された *katN* について表現型の確認を行うため、マクロファージ細胞 (RAW264.7) を用いた解析を行った。方法は HUS 症例由来 *katN* 陽性 EHEC OX18:H19 (JNE181771 株)、および λ Red-recombination システムにより作製した同株の *katN* 破壊株 (JNE181771 $\Delta katN$) について一晩培養させた菌液を RAW264.7 細胞に接種し貪食させ、30 分後に PBS で洗浄を行った後、細胞外の菌を殺菌するため 50 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシン加培地を分注し、1 時間後 (貪食菌数) および 5 時間後 (生存菌数) の細胞内菌数から算出した

細胞内生存率を比較した。菌数測定は1% Triton X を加え細胞溶解液を作製し、LB 寒天平板に塗抹した。試験は5回実施し、1回につき各サンプルを2重に試験した。*katN* 保有状況調査は所内に保管される non-EHEC を含む大腸菌 4522 株 (287 血清型) を対象にゲノム解析により行った。また PCR 法による *katN* の検出系開発のため、*katN* の保有が既に報告されている EHEC O157:H7 EDL933 株と所内 *katN* 保有大腸菌 5 株の遺伝子配列から検出プライマーの設計を行った。設計したプライマーより *katN* 保有状況が判明している大腸菌 54 株を対象に PCR を実施することで適切に検出が可能であるか確認も行った。

4. HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の細胞付着因子の特定

死亡例を含む複数の HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の細胞付着因子を特定するため、JNE170426 株を対象に Tn-seq 解析を行った。方法は JNE170426 株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。作製したライブラリーを HEp-2 細胞に接種し3時間感染実験を行った後、非付着株を除去するため PBS で3回洗浄、1% Triton-X100 添加により取得した細胞溶解液をカナマイシン添加 LB 培地にて 37°C で 18 時間培養し、取得した菌体から DNA の抽出を行った。HEp-2 細胞接種前のライブラリーから抽出した DNA サンプル (input)、および付着性試験後に回収した菌体から抽出した DNA サンプル (output) について Tn-seq 解析を実施しシ

ークエンズデータを取得した。取得した input および output サンプルのシークエンズデータを JNE170426 の染色上ゲノムにマッピングを行い、Tn-seq Explorer を用いて染色上の各遺伝子にマッピングされたカウント数を検出した。各遺伝子のカウント数の output/input 比から細胞付着性に寄与している可能性の高い遺伝子を選定し λ Red-recombination システムにより破壊した株および当該遺伝子をクローニングしたプラスミドにより相補した株と細胞非付着株 (DH10B) に導入した株を作製し、HEp-2 細胞への付着性を解析した。

5. 非メジャー血清群 EHEC の既存培地への発育状況確認

本研究対象血清型のうち国内分離株数の多い 8 種類の血清型を各 8 株、合計 64 株を対象として既存平板培地を用いた分離検出の有用性を評価した。使用する平板培地は、EHEC の分離に用いられる選択剤であるセフィキシム・亜テルル酸カリウム (CT) を含有する 4 種類の EHEC 分離用の平板培地、および CT 不含の 6 種類の平板培地 (合計 10 種類) とした。さらに規定量の半分の CT を添加したクロモアガー-STEC 培地を作製し、全ての CT 感受性株を対象に塗抹した。各平板培地は 37°C で 18-24 時間培養後に各菌株の発育状況やコロニーの色調等の観察を行った。

C. 研究結果

1. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の系統解析

系統解析により LEE(+)マイナー血清群 EHEC においても、同じ O 血清群のうち

H 抗原型が異なる場合は必ずしも近縁ではなく、ST も異なることが確認された(図 1)。さらに、O76 および O109 においては H 抗原型の違いにより *eae* 保有の有無が異なり、いずれも *eae* 保有系統からのみ HUS 発症例および重症例が確認された。

2. LEE(+)-マイナー血清群 EHEC の保有遺伝子比較解析

1 の解析により *eae* 不検出株等を除いた 63 株の LEE(+)-マイナー血清群 EHEC 株(表 2)を対象に網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行った結果、63 株から 309 種類の遺伝子が検出された。さらに 63 株のうち 24 株を重症株、39 株を非重症株に区分して遺伝子保有状況を比較した結果、重症株から *katP*, *IncFIB*, *tssF*, *espJ*, *upaG/ehaG* が有意に ($p < 0.05$) 高率に検出された(表 3)。O 血清群別の遺伝子保有率では、カタラーゼ-ペルオキシダーゼをコードする *katP* は比較的重症率の高い 3 血清(O177, O172, O76)からのみ保有が確認された(図 2)。

3. *katN* の表現型の解析および保有状況調査と検出系の開発

RAW264.7 細胞を用いた *katN* の表現型の解析により、JNE181771 野生株の 5 時間後の生存率は JNE181771 $\Delta katN$ に比べ有意に低い値となった($p = 0.017$)(図 3)。*katN* の保有状況調査では、287 の血清型のうち 21 の血清型(OUT および HUT 除く)から *katN* が検出された。このうち本研究対象としている血清型では重症率が 45.8~57.1%と比較的高かった 3 血清型(O172:H25, O177:H25, OX18:H19)から高

率(88.2~100%)に検出されることが明らかとなった(表 4)。また、*katN* の PCR 検出用プライマーを設計し(*katN*-F: TATTGGTTCTCTTGTTGGTAT、*katN*-R: GTCAAAGTTTTTCATCACTGT)、当該プライマーを用いた PCR 法では *katN* 保有株にのみ目的のサイズ(409bp)の増幅バンドが確認された。

4. HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の細胞付着因子の特定

Tn-seq により取得した配列を JNE170426 の染色体上に存在する 4802 遺伝子にマッピングを行い、各遺伝子の input および output サンプルのカウント数比(output/input)を 0.2 以下等の条件を設定することで細胞付着性に関与している可能性の高い 30 遺伝子を抽出した(表 5)。これら 30 遺伝子を対象に順次破壊株の作製および培養細胞への付着性の解析を行った結果、細胞外膜タンパクに関連する遺伝子(*nmpC*)を破壊した株(JNE170426 $\Delta nmpC$)において細胞付着性が消失した。そのため pMW119 に *nmpC* をクローニングし、相補株(JNE170426 $\Delta nmpC$ /pMW119-*nmpC*)および DH10B への導入株(DH10B/pMW119-*nmpC*)を作製し、当該 2 株についても細胞付着性の解析を行った結果、いずれも細胞付着性を示したことから、本菌の細胞付着因子として NmpC を特定した(図 4)。

5. 非メジャー血清群 EHEC の既存培地への発育状況確認

供試した 8 血清型のうち O177:H25 については 2 つの系統(ST659 および ST342)

が含まれ、系統により色調の異なるコロニーが確認されたが、残りの 7 血清型では血清型ごとに概ね同様の色調を示した (表 6)。一方で、供試した全 64 株のうち O177:H25 の全 8 株と O76:H7 の 4 株を除く 52 株 (81.3%) については、CT を含有する培地においてコロニー形成が確認されず、発育が困難であることが明らかとなった。これら 52 株については、半量の CT が添加された平板培地にも塗抹を行ったが、発育が確認されたのは 11 株 (21.2%) のみであった。

D. 考察

本研究により国内での分離株数が多い 8 血清型の非メジャー血清群 EHEC のうち 7 血清型において CT 添加平板培地での発育が困難であることが確認された。非メジャー血清群を含む多様な血清型の EHEC に有用な分離検出法を確立することは重要な課題であり、そのためには CT 以外の選択剤等に注目して有用性を評価していく必要があると考えられた。また、系統解析では、同一 O 血清群のうち LEE 保有株と考えられる *eae* 保有系統の方が病原性は高いことが示唆された。

酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子は特定の血清型の非メジャー血清群 EHEC の重症化に寄与している可能性が示唆された。抗酸化に関与する遺伝子である *katP* および *katN* が LEE(+)マイナー血清群および LEE(-)血清群 EHEC の重症例からそれぞれ高率に検出され、またそれら遺伝子はいずれも比較的高い重症率の血清型または O 血清群から検出されることが明らかとなった。さらに HUS

症例由来 *katN* 保有 EHEC OX18:H19 株がその *katN* 破壊株に比べマクロファージ細胞内生存率が高いことも実際に確認され、抗酸化に関与する遺伝子が特定の血清型の EHEC において重症化と関連している可能性が示唆されたことから、引き続き *katN* および *katP* 保有株について解析を行っていくことが重要であると考えられる。

死亡例由来 EHEC の未特定の細胞付着因子は *NmpC* であることが明らかになった。*nmpC* に関する研究論文は乏しく、2011 年に耐熱性に関与することが報告されているが細胞付着性に関連する報告は確認されないことから EHEC の新規の細胞付着因子であると考えられる。培養細胞への付着性と EHEC 感染症の重症化には関連性があることが既に報告されていることや、*nmpC* が死亡例由来株から特定されたことから、本因子による細胞付着性も重症化に関与している可能性があると考えられる。一方で *nmpC* については、その分布状況や発現制御機構等不明な点が多く残されている。本因子について研究を続けることも EHEC 感染症による重症化の機序解明に繋がると考えられる。

E. 結論

多様な血清型の EHEC に有用な分離検出法の確立には CT 以外にも注目して有用性を評価することが重要である。酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子および *NmpC* は特定の血清型の EHEC 感染症の重症化に関与している可能性がある。

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非保有腸管出血性大腸菌感染症の重症化に関与する因子特定のための解析
第97回日本細菌学会総会（2024年8月8日）

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. SNP抽出による系統樹の作製を行った株

O血清群	株数
O51	3
O70	2
O76	34
O80	7
O109	12
O172	9
O177	28
Total	95

表2. ゲノム解析により病原性関連遺伝子の検出を行った株

O血清群	H抗原	株数	重症率 (%)
O177	H25, H45, H11	28	42.9
O76	H7	9	44.4
O172	H25	8	50
O109	H21, H10	7	14.3
O80	H2	6	16.7
O51	H49	3	33.3
O70	H11	2	50
合計		63	38.1

表3. 重症例由来株から有意に高率に検出された遺伝子

Gene	<i>p</i> -value (2-tail)
<i>katP</i>	0.022
IncFIB	0.024
<i>tssF</i>	0.028
<i>espJ</i>	0.03
<i>upaG/ehaG</i>	0.044

表4. ゲノム解析による各血清型大腸菌の*katN*保有状況調査結果

血清型	解析株数	保有率 (%)	備考
O157:H7	1548	99.9	LEE(+)
O5:H9	31	100	LEE(+)
O172:H25*	15	100	LEE(+), 重症率50%
O165:H25	17	94.1	LEE(+)
OX18:H19*	22	90.9	LEE(-), 重症率57.1%
O177:H25*	17	88.2	LEE(+), 重症率45.8%
O3:H21	3	100	LEE(-)
OX25:H8	2	100	LEE(-)
O148:H10	1	100	LEE(-)
O157:H19	1	100	LEE(+)
O154:H31	1	100	LEE(-)
O50/O2:H5	1	100	LEE(-)
O50/O2:H6	5	60	LEE(-)
O74:H25	2	50	LEE(+)
O104:H2	2	50	LEE(-)
OgN5:H16	2	50	LEE(-)
O8:H8	3	33.3	Non-EHEC
O130:H11	7	28.6	LEE(-)
O8:H19	15	26.7	LEE(-)
OSB17:H19	16	6.3	LEE(-)
O174:H21	25	4	LEE(-)

*本研究対象血清型

表5. Tn-seq解析により選定された30遺伝子

locus_tag	gene	description	output/input
LOCUS_00150	<i>nhaA</i>	pH-dependent sodium/proton antiporter	0.1
LOCUS_01680	<i>glnD</i>	uridylyltransferase	0.2
LOCUS_05580	<i>nmpC</i>	outer membrane porin protein	0.2
LOCUS_07630	<i>tolB</i>	translocation protein TolB	0.1
LOCUS_09230	-	hypothetical protein	0.2
LOCUS_11710	<i>plsX</i>	phosphate acyltransferase	0.2
LOCUS_12020	<i>ycfZ</i>	inner membrane protein	0.2
LOCUS_12350	<i>minD</i>	cell division inhibitor MinD	0.1
LOCUS_12360	<i>minC</i>	septum site-determining protein MinC	0.2
LOCUS_14010	<i>acnA</i>	aconitate hydratase 1	0.2
LOCUS_14160	<i>sapF</i>	antimicrobial peptide ABC transporter ATPase	0.1
LOCUS_14170	<i>sapD</i>	antimicrobial peptide ABC transporter ATPase	0.2
LOCUS_14180	<i>sapC</i>	antimicrobial peptide transport ABC transporter permease	0.1
LOCUS_14190	<i>sapB</i>	antimicrobial peptide transport ABC transporter permease	0.1
LOCUS_17130	<i>nth</i>	endonuclease III	0.2
LOCUS_17540	<i>pykF</i>	pyruvate kinase	0.2
LOCUS_24910	<i>pta</i>	phosphate acetyltransferase	0.1
LOCUS_27150	<i>ppk</i>	polyphosphate kinase	0.2
LOCUS_27270	<i>bamB</i>	BamABCDE complex OM biogenesis lipoprotein	0.2
LOCUS_27870	<i>rseA</i>	anti-sigma factor	0.2
LOCUS_29240	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma S factor RpoS	0.2
LOCUS_30230	<i>recD</i>	exonuclease V alpha subunit RecD	0.2
LOCUS_30240	<i>recB</i>	exonuclease V beta subunit RecB	0.1
LOCUS_30260	<i>recC</i>	exonuclease V gamma subunit RecC	0.1
LOCUS_31490	<i>tktB_2</i>	transketolase	0.2
LOCUS_33810	<i>deaD</i>	ATP-dependent RNA helicase	0.2
LOCUS_38170	<i>waaF</i>	heptosyltransferase II	0.1
LOCUS_42060	<i>oxyR</i>	oxidative and nitrosative stress transcriptional regulator	0.1
LOCUS_44070	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	0.2
LOCUS_44800	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	0.2

表6. 非メジャー血清群EHECの血清型別平板培地発育状況

分類	血清型 (MLST)	株数	CT不含培地					CT含有培地				
			DHL	SS	McConkey	XM-G	Vi RX O26 寒天培地	クロモアガー STEC	クロモアガー STEC	CIX 寒天培地	Vi EHEC 寒天培地	XM-EHEC 寒天培地
LEE(+) マイナー EHEC	O177:H25 (ST342)	4	赤	赤	赤	紫	青緑	藤色	藤色	青緑	褐色/えんじ色	紫
	O177:H25 (ST659)	4	白	白	白	青/白	青緑	白～藤	白～藤	紫	緑/えんじ色	青紫
	O76:H7	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	藤色*	群青*	紫～緑*	青紫*
	O172:H25	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
LEE(-) EHEC	O113:H21	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	OX21:H19	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	OX18:H19	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	O183:H18	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-
	O115:H10	8	赤	赤	赤	青	青緑	藤色	-	-	-	-

MLST, Multilocus sequence typing; -, 全株発育なし; *半数の4株は発育なし

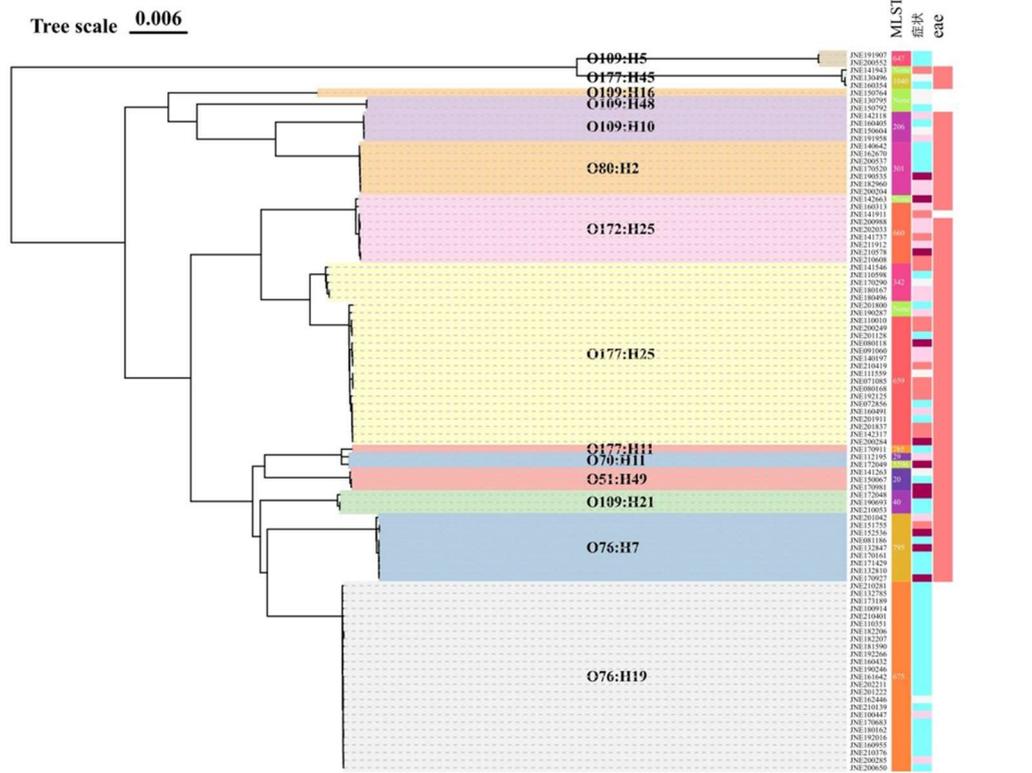


図 1. LEE 保有マイナーEHEC 株の SNP 抽出による系統解析
系統樹の枝の色は血清型を示している

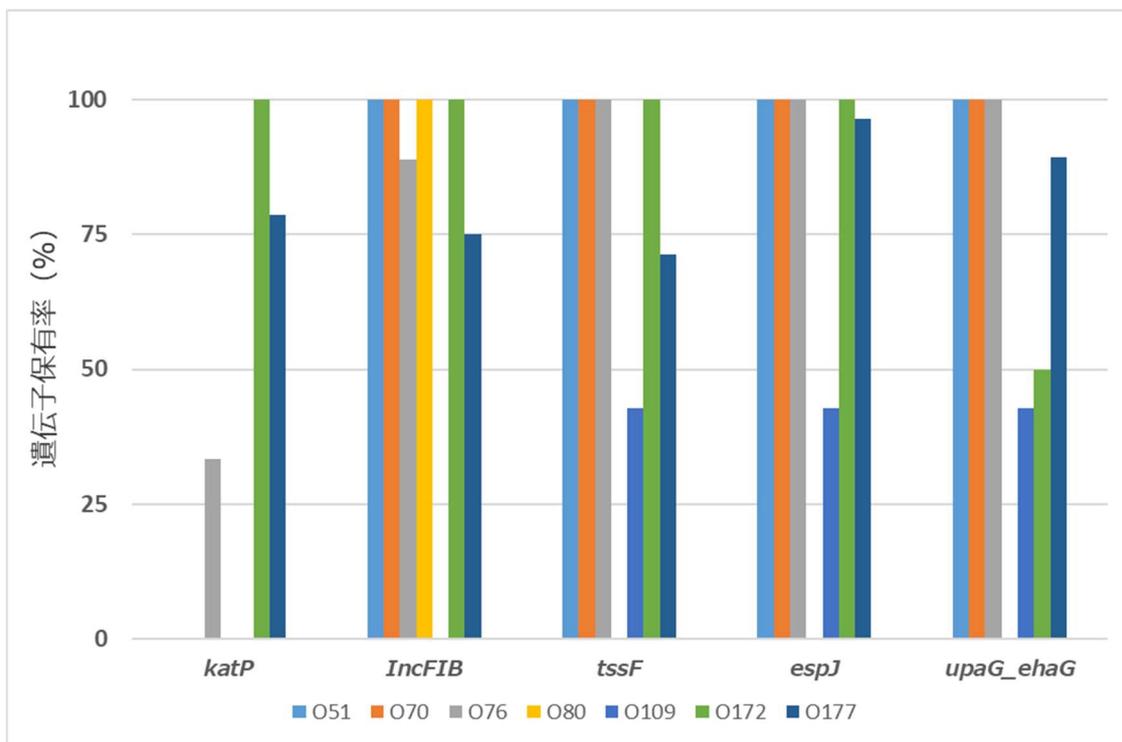


図 2. LEE 保有マイナーEHEC における血清型別の各遺伝子保有率

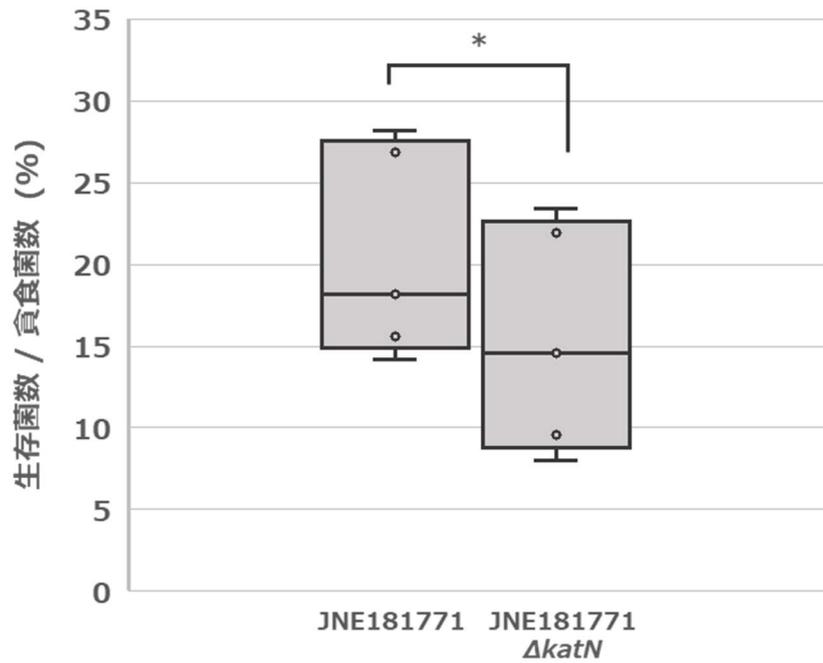


図 3. HUS 症例由来 *katN* 保有 EHEC (JNE181771) とその *katN* 破壊株 (JNE181771 $\Delta katN$) の RAW264.7 細胞内の 5 時間後の生存率 (* $p = 0.017$)

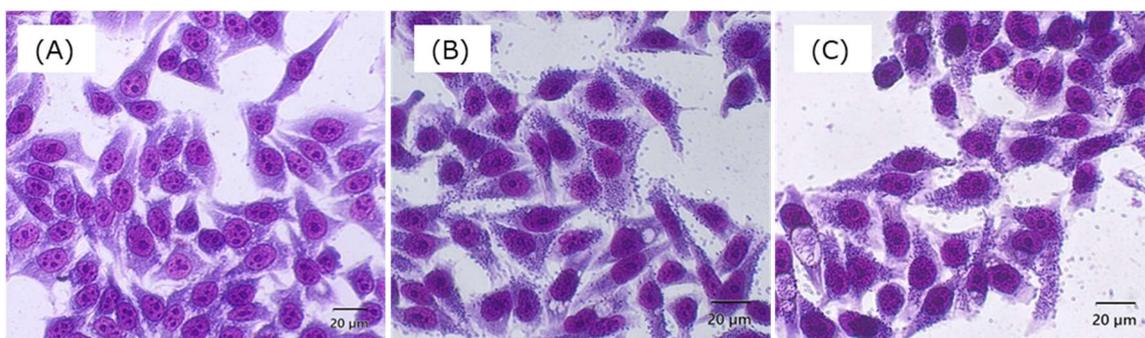


図 4. JNE170426 Δ nmpC (A) 、JNE170426 Δ nmpC/pMW119-nmpC (B) および DH10B/pMW119-nmpC (C) の HEp-2 細胞付着像