

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）
「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」
令和 4-6 年度 分担研究報告書

分担研究課題

「非メジャー血清群腸管出血性大腸菌のゲノム解析」

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）の病原性解明のため、HUS を起こした O 血清群の株を対象に全ゲノム配列解析による系統解析、および網羅的な病原性関連遺伝子検出により重症例由来株から高率に検出される遺伝子の特定を行った。解析は EHEC の病原性遺伝子領域である LEE 保有の有無（LEE(+)マイナー血清群および LEE(-)血清群）に分類して実施した。

LEE(-)血清群 EHEC においては、系統解析により同じ O 血清群でも H 抗原が異なる場合には必ずしも近縁ではないことが示され、血清型により病原性等も異なる可能性が考えられた。網羅的な遺伝子検出により重症例由来株から *cdiAB*, *gad*, *katN*, *rgdR*, *stx2* が有意に高率に検出され、*stx2* は全ての血清型から検出された。LEE(+)マイナー血清群 EHEC においては、系統解析により O76 および O109 の一部の H 抗原型で LEE 非保有系統も確認されたが、そのうち LEE 保有系統のみ重症例由来株が含まれていた。また、HUS 症例由来株の全株から *stx2* が検出され、非メジャー血清群 EHEC においても *stx2* は重症化に寄与している可能性が示唆された。網羅的な病原遺伝子検出により重症例由来株から高率に検出された遺伝子のうち、*katP* は重症率の高い O 血清群からのみ検出され、LEE(-)血清群 EHEC の重症例から高率に検出された *katN* においても、重症率が高い複数の血清型が高率に保有していることが明らかとなり、抗酸化に関与する因子は非メジャー血清群 EHEC のうち特定の血清型において重症化に寄与している可能性が示唆された。

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、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。

国内で分離される EHEC の 90% 以上は、主要 7 血清群（O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165）であるが、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、非メジャー血清群の EHEC についても着目していく必要

性がある。

非メジャー血清群 EHEC は病原性遺伝子領域 locus of enterocyte effacement (LEE) を保有しない血清群 (LEE(-)血清群) と、LEE を保有するが主要ではない血清群 (LEE(+))マイナー血清群) の EHEC に分類することができる。

本研究では、国内で分離された過去 15 年分の非メジャー血清群 EHEC について LEE(-)血清群および LEE(+))マイナー血清群に分けて全ゲノム配列(whole-genome sequence: WGS)の取得を行う。さらに取得した WGS を用いてゲノム解析を行い系統解析による高病原性系統の抽出、および網羅的な病原性関連遺伝子の検出等により重症例と関連する遺伝子の特定を試みる。

B. 研究方法

1. LEE(-)血清群 EHEC の解析

1-1. WGS 解析

2007-2021 年に国内で分離された 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.genomicpidemiology.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。

1-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

1-1 で取得した WGS データを使用して Multilocus sequence typing (MLST) による ST の特定、および SNP 抽出による系統樹の作製を行った (表 1)。さらに、重症化に関与する可能性のある遺伝子を特定するため、HUS 症例由来株と同じ血清型 (O74:H20, O113:H21, O183:H18, OX18:H2, OX19:H19, OX21:H19, OgN13:H19) であることが確認された 92 株 (表 2) を重症例から分離された 13 株 (重症株) とそれ以外の 79 株 (非重症株) に区分して遺伝子保有状況の比較解析を行い、カイ二乗検定において重症例から有意に高率に検出される遺伝子の抽出を行った。抽出された各遺伝子については、解析対象とした 92 株の血清型別保有率も確認した。

1-3. ゲノム解析による *katN* 保有状況調査

1-2 で重症例から高率に検出された *katN* について、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保有状況調査

を行った。

1-4. 完全長ゲノム配列の取得

HUS 症例由来株 9 株のうち 4 株について PacBio Sequel IIe による解読を行い (表 3)、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ケンスを Tricycler および Unicycler を用いたハイブリッドアセンブリで完全長ゲノム配列の決定を行った。取得した完全長ゲノム配列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. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の解析

2-1. WGS 解析

2007-2021 年に国内で分離された主要 7 血清群以外の O 血清群に属する LEE(+)血清群 EHEC で HUS を起こした 7 種類の O 血清群 (O51, O70, O76, O80, O109, O172, O177) に属する 103 株を解析対象株とし、HiSeqX (illumina) を用いて WGS 解読を行った。さらに、対象株のうち HUS 症例由来株である 11 株についてはゲノム解析により EHEC の主な毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *ehxA*, *cdt*, *sub*) の保有状況の確認を行った。

2-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

2-1 で取得した WGS データの解析により、HUS 症例由来株と関連する 7 種類の O 血清群であった 95 株 (表 4) を対象として、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 *eae* 保有状況の特定も行った。さらに、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、95 株のうち *eae* が検出された株を LEE 保有株として網羅的な病原性関連遺伝子検出を行った。病原性関連遺伝子検出は、1-1 と同様の方法で行った。さらに検出された病原遺伝子について、1-2 と同様の方法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 O 血清群別の保有率も算出した。

C. 研究結果

1. LEE(-)血清群 EHEC の解析

1-1. 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 5)。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 (図 1)。1 つの株からは 18~46 種類の付着関連遺伝子が検出され、LEE(-)血清群 EHEC に特異的な付着関連遺伝子である *saa* と *eibG* はそれぞれ 90 株 (28.8%) と 8 株 (2.6%) から検出された。さらに、検出された 53 種類の細胞付着関連遺伝子を機能的に関連する遺伝子を 1 つにまとめることで 17 の遺伝子に分類し、各遺伝子の検出状況を O 血清群別に図 2 に示した。17 遺伝子のうち 7 遺伝子は全ての O 血清群から検出されたが、一方で *paa* (O115) や *fl7* (O174) は特定の O 血清群からのみ検出され、*elf* (O183)、*lpfA* (O166)、*saa* と *iha* (O115) は特定の遺伝子でのみ不検出となった。

1-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

系統解析により高病原性が示唆される系統は確認されなかった（図 3）。しかし、各血清型の代表 1 株と代表的な大腸菌株について系統解析を行った結果、同じ O 血清群であっても H 抗原型が異なる場合は必ずしも近縁ではないことが確認され、病原性等の特徴も異なる可能性が考えられた（図 4）。HUS 症例由来株と同じ血清型に属していた株について網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行った結果、92 株から 228 種類の遺伝子が検出された。さらに重症株と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 *cdiAB*, *gad*, *katN*, *rgdR*, *stx2* が有意に ($p < 0.05$) 高率に検出された（表 6）。検出された遺伝子のうち *stx2* は全ての血清型から検出され、*cdiAB* と *katN* についてはそれぞれ O74:H20 と OX18:H19 の全株から検出された（図 5）。

1-3. ゲノム解析による *katN* 保有状況調査

5422 株を対象に保有状況調査を行った結果、21 の血清型（OUT および HUT 除く）から *katN* が検出された（表 7）。本研究対象血清型では O172:H25, O177:H25, OX18:H19 の 3 つの血清型が含まれており、重症率はそれぞれ 50.0%, 45.8%, 57.1% であった。

1-4. 完全長ゲノム配列の取得

HUS 症例由来株についてロングリードシーケンスを行い、新たに 4 株の完全長ゲノム配列を決定した。さらに、既に取

得済みの 4 株と合わせた 8 株の HUS 症例由来株の完全長ゲノム配列を使用して、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、いずれの株も巨大プラスミド (131~174kb) の保有が確認され、プラスミド上には共通して *saa* や *espP* など複数の病原性関連遺伝子が検出された（表 8）。

2. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の解析

2-1. WGS 解析

HUS 症例由来 11 株を対象に EHEC の主な毒素遺伝子を検出した結果、全ての株から *stx2* が検出され、*ehx* と *cdt* はそれぞれ 8 株および 3 株から検出されたが、*sub* はいずれの株からも検出されなかった。

2-2. 系統解析と保有遺伝子の比較解析

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 6）。また、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。*eae* 不検出株等を除いた 63 株の LEE(+)マイナー血清群 EHEC 株（表 9）を対象として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 10）。O 血

血清群別の遺伝子保有率では、*katP* は比較的重症率の高い 3 つの O 血清群 (O177, O172, O76) からのみ保有が確認された (図 7)。

D. 考察

LEE 保有の有無により EHEC の病原性機序や遺伝子保有状況は異なることが知られているが、本研究において HUS 症例由来株を対象とした EHEC の主な毒素遺伝子の検出では、LEE(-)血清群 EHEC の 8 株から検出された *sub* が、LEE(+)マイナー血清群 EHEC の 11 株では不検出になるなど、HUS 症例由来株においても一部の遺伝子で保有状況が異なることが確認された。さらに、HUS 症例由来 LEE(-)血清群 EHEC の完全長ゲノム配列の解析により、共通して巨大プラスミドの保有が確認された。さらに巨大プラスミド上には複数の共通する病原性関連遺伝子が検出されたことから、巨大プラスミドが LEE(-)血清群 EHEC の重症化に関与している可能性がある。しかし、巨大プラスミドの保有は HUS 症例由来株以外でも確認されていることから、巨大プラスミドの重症化への寄与については、症状別にゲノム配列を比較するなどの詳細な解析が必要であると考えられた。

LEE(-)血清群 EHEC の各解析対象株から複数の細胞付着関連遺伝子が検出され、一部は O 血清群により保有状況が異なる可能性が示唆された。しかし、検出された各細胞付着関連遺伝子が発現し、実際に細胞への付着性に寄与するかについては、別の手法で検証し確認を行う必要がある。また、O 血清群別の保有状況では O115

のみ *saa* と *iha* が不検出となった。*saa* や *iha* は巨大プラスミド上にコードされている遺伝子であるため、O115 においては巨大プラスミドを保有しない可能性も示唆された。

LEE(-)血清群 EHEC の重症化に関与する因子は血清型により異なる可能性が示唆された。系統解析において、血清型により系統が異なることが示唆されたことから、重症化因子も血清型により異なる可能性が考えられる。また網羅的な遺伝子検出により重症例から高率に検出された *cdiAB* および *katN* は特定の血清型からのみ検出された。しかし、これら遺伝子が重症化に関与しているか評価するためには、各遺伝子の発現状況や表現型の確認など別の手法による解析が必要となる。一方で、*stx2* については全ての血清型から検出され、また、LEE(+)マイナー血清群 EHEC の HUS 症例由来株の全株から共通して検出されたことから、*stx2* は非メジャー血清群 EHEC においても重症化に寄与している可能性が示唆された。

同一 O 血清群では *eae* 保有系統の方が病原性は高い傾向が本研究においても示唆された。*eae* 保有株は、LEE 保有株であると考えられるため、LEE 領域内の他の複数の病原性関連遺伝子も併せて保有していることが示唆される。下痢原性大腸菌の病原性と保有する病原遺伝子数に関連性があることも既に報告されており、本研究においても LEE(+)マイナー血清群 EHEC から検出される病原性関連遺伝子の種類 (309 種類) は、LEE(-)血清群 EHEC (228 種類) よりも多い。また O76 および O109 において、HUS 症例や重症例が

eae 保有系統からのみ確認されるなど *eae* 非保有系統に比べ病原性が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 において、重症化との関連が示唆された。重症例から高率に検出されたカタラーゼ-ペルオキシダーゼをコードする *katP*、およびカタラーゼ遺伝子の 1 つである *katN* が確認された。さらに、これら遺伝子はいずれも本研究対象株のうち比較的重症率の高い O 血清群または血清型からのみ検出されることも明らかとなった。そのため、非メジャー血清群 EHEC から検出されるカタラーゼ関連遺伝子は重症化因子の 1 つである可能性も示唆されるが、実際にこれらの遺伝子が発現し酸化ストレス防御に寄与しているかについては、別の手法により解析を行う必要があると考える。

E. 結論

非メジャー血清群においても同一 O 血清群では *eae* 保有系統の方が病原性が高い傾向が示唆された。また非メジャー血清群の EHEC においても *stx2* が重症化に寄与している可能性が示唆され、さらに特定の血清型の EHEC においては酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子が重症化と関連している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

Kubomura A, Lee K, Ohnishi M, Iyoda S, Akeda Y, EHEC Working Group. Complete genome sequence of eight LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from patients with hemolytic-uremic syndrome. *Microbiol Resour Announc.* 2023 Dec 20:e0059123.

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
- 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の細胞付着性と全ゲノム配列解析 第166回日本獣医学会学術集会（2023年9月5-8日）
- 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

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし

表1. SNP抽出による系統樹作製を行った株

O血清群	株数
O74	10
O113	74
O115	115
O166	10
O174	51
O183	24
OX18	14
OX21	11
OUT	1

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

血清型	株数	重症株数	重症率 (%)
O74:H20	7	2	28.6
O113:H21	41	2	4.9
O183:H18	23	1	4.3
OX18:H2	2	1	50
OX18:H19	7	4	57.1
OX21:H19	11	2	18.2
OgN13:H19	1	1	100
Total	92	13	14.1

表3. 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4. 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5. 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6. 重症例由来株から有意に検出された遺伝子

Gene	<i>p</i> -value (2-tail)
<i>cdiA</i>	0.003157
<i>gad</i>	0.003307
<i>cdiB</i>	0.004481
<i>katN</i>	0.007391
<i>rgdR</i>	0.01384
<i>stx2a</i>	0.01923

表7. 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8. 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9. 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10. 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

図 1. LEE 非保有 EHEC 312 株の各付着関連遺伝子検出状況

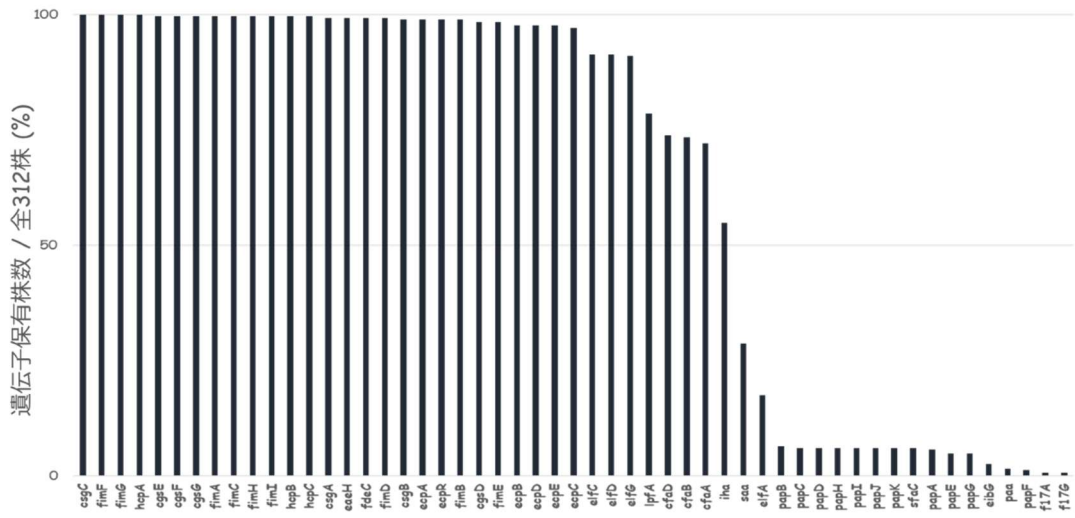
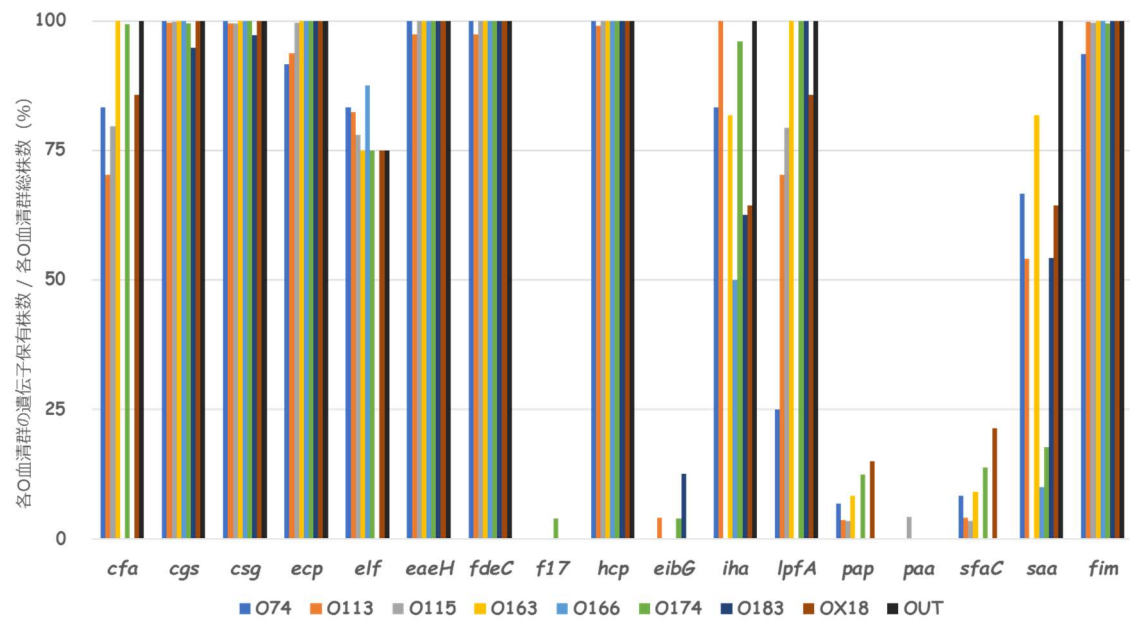


図 2. 各付着関連遺伝子の O 血清群ごとの保有率



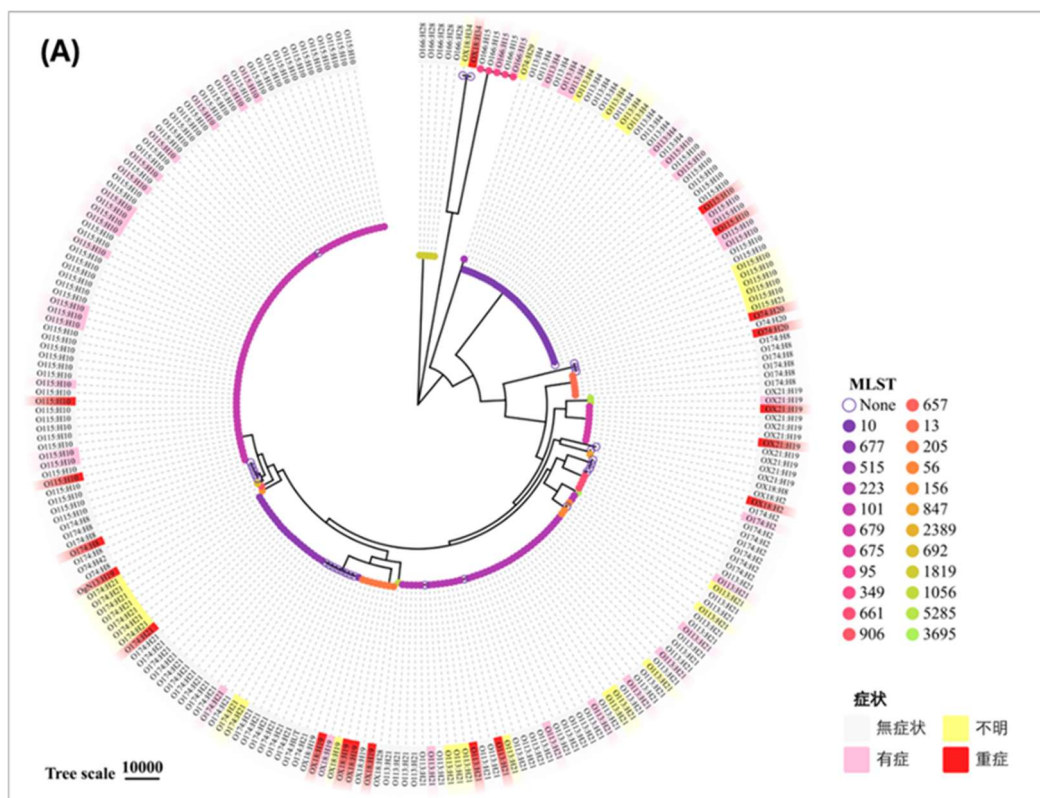


図 3. LEE 非保有 EHEC 株の SNP 抽出による系統解析
菌株ノードの色は MLST を示し、菌株番号の色は症状を示す

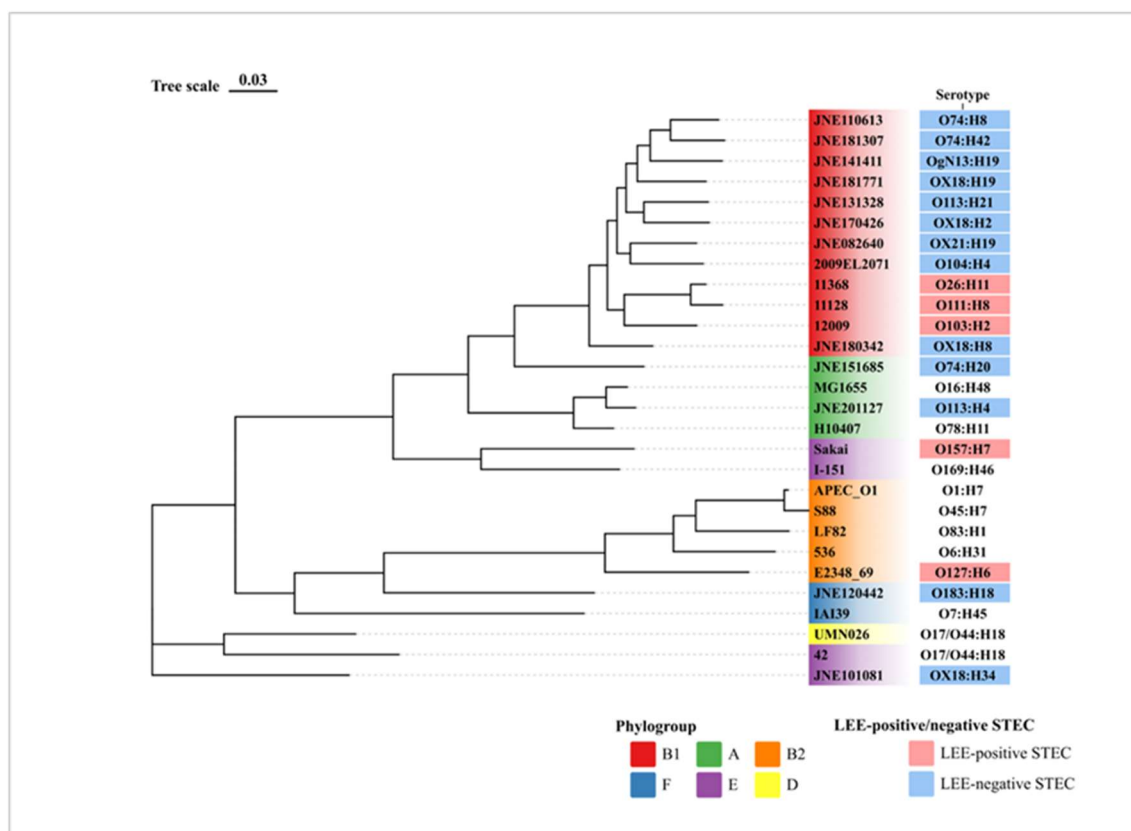


図 4. 各血清型大腸菌の SNP 抽出による系統解析

菌株番号の色は Phylogroup を示し、Serotype の色は LEE 保有の有無を示す

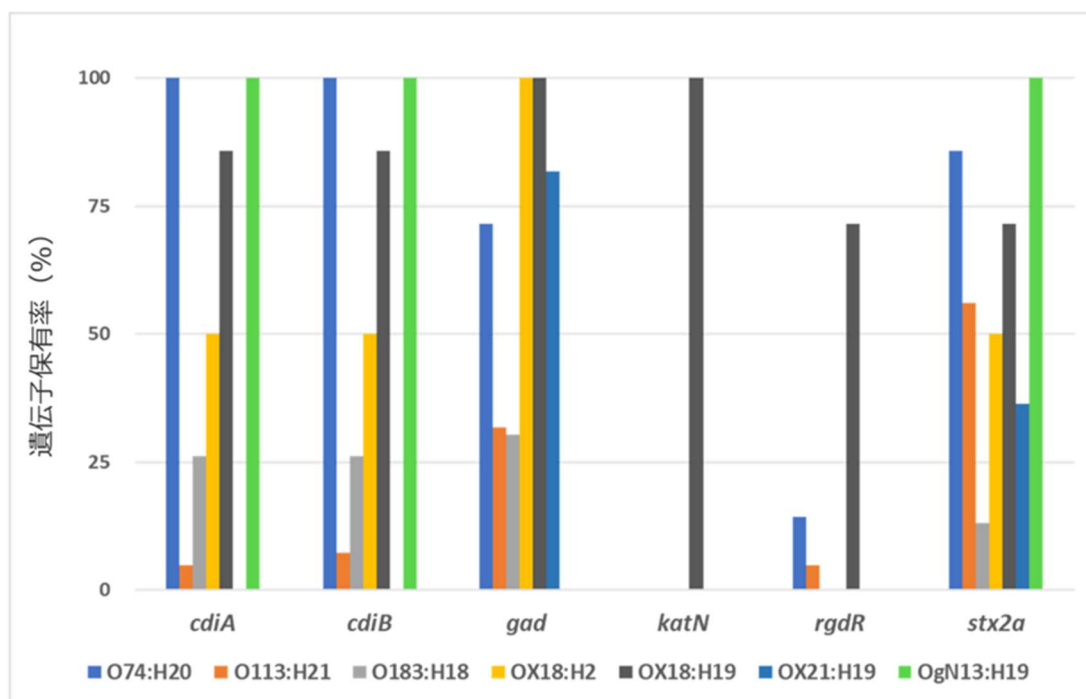


図 5. LEE 非保有 EHEC における血清型別の各遺伝子保有率

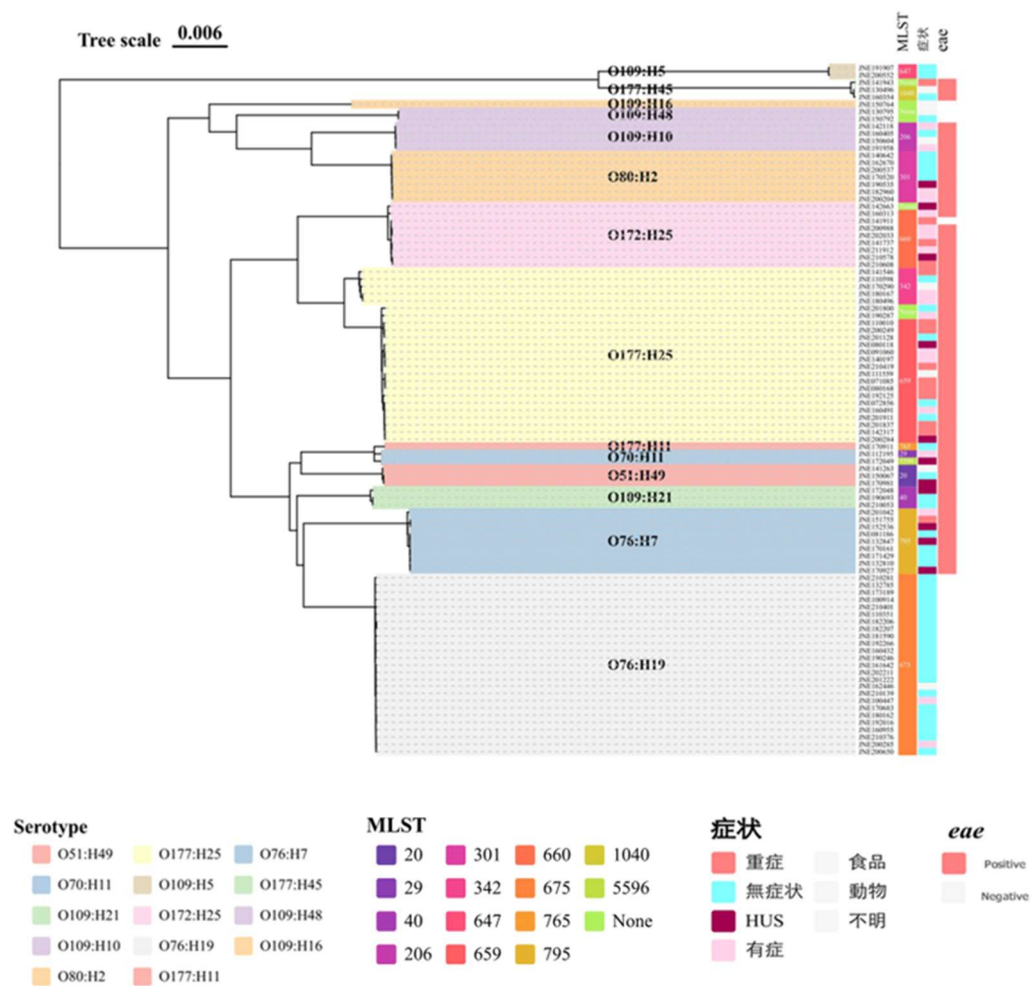


図 6. LEE 保有マイナーEHEC 株の SNP 抽出による系統解析
系統樹の枝の色は血清型を示している

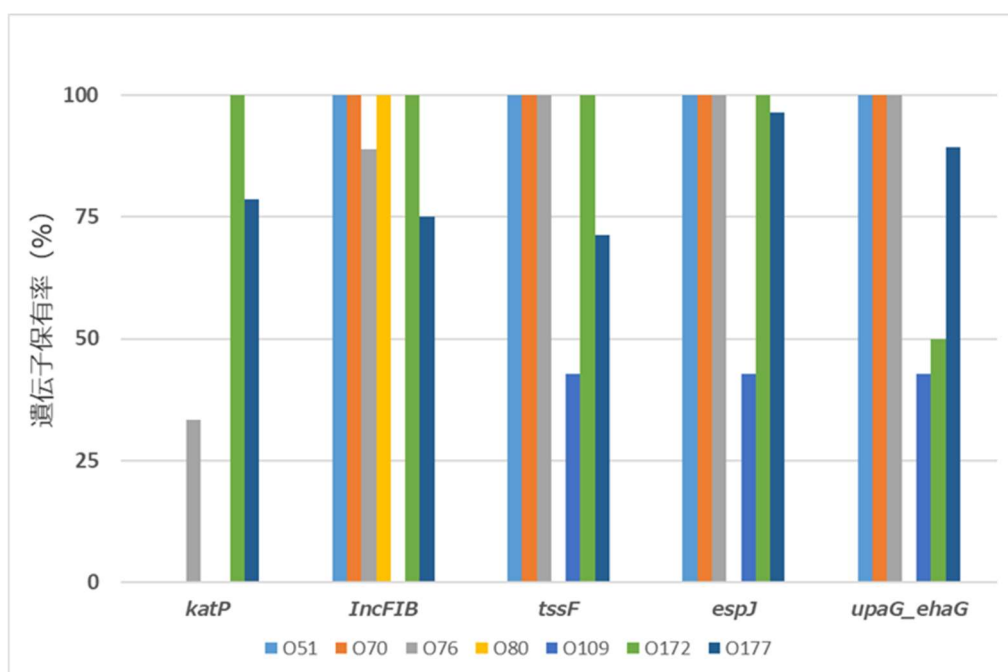


図 7. LEE 保有マイナー血清群 EHEC における血清型別の遺伝子保有率