

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
「食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究」

研究分担報告書

分担研究課題

「病原大腸菌の付着性の解析」

研究分担者 窪村亜希子（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 李 謙一、伊豫田淳

（国立感染症研究所 細菌第一部）

地方衛生研究所等

研究要旨

astA 保有大腸菌の病原性解明のため 9 件の食中毒等集団下痢症事例由来株を含む 16 株を対象に保有するプラスミドの比較解析、および O166:H15 株が示す細胞付着性の付着因子特定のための莢膜遺伝子（*kps*）クラスターに着目した解析を行った。*kps* クラスターの解析結果から、*kps* クラスター領域 2 に含まれ、*kfoC* および *kfoG* と高い相同性を示す 2 つの糖転移酵素遺伝子が細胞付着性に関与していることが明らかとなった。プラスミドの解析では 16 株のうち 14 株からプラスミドが検出されたが、そのうち *astA* 事例由来株からのみ IncFII の類似したプラスミドが検出された。当該プラスミドに着目した解析を行っていくことは、集団下痢症の起因菌となる *astA* 保有大腸菌の病原性解明に繋がる可能性があると考えられる。

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。既存の下痢原性大腸菌分類には属さないが、集団下痢症事例の起因菌として分離されることなどから病原性が示唆される大腸菌も存在し、その 1 つとして EAEC heat stable

toxin をコードする遺伝子（*astA*）を保有する *astA* 保有大腸菌が知られている。食中毒等下痢症集団発生（集発）事例の起因菌として分離される *astA* 保有大腸菌には特定の複数の血清型が知られており、そのうち O166:H15 は最も多く報告されている。一方で、健康者からは多様な血清型の *astA* 保有大腸菌が分離されることも知られており、*astA* の病原性は未だ不明瞭である。

我々のこれまでの研究により、異なる 2 つの血清型（O7:H4 および O166:H15）の集発事例由来 *astA* 保有大腸菌が類似の

プラスミドを保有していることを明らかにした。さらに、O166:H15に着目した解析により4件の集発事例由来大腸菌 O166:H15 が培養細胞に付着性を示し、その細胞付着性には莢膜遺伝子 (*kps*) クラスターが関与していることも明らかにした。本研究では、対象株数を増やしてプラスミドの解析を行うとともに、O166:H15 株の細胞付着性に寄与する遺伝子特定に向けた解析も行った。

B. 研究方法

1. 大腸菌 O166:H15 株の MLST および系統解析

5 件の集発事例から分離された 10 株の *astA* 保有株に加え、5 株のその他ヒト由来株および 4 株の動物由来の大腸菌 O166:H15 (合計 19 株) について whole genome sequencing (WGS) によりゲノム配列の取得を行った。取得したゲノム配列を使用して、コアゲノムから抽出した SNP により系統樹を作製した。さらに Center for Genomic Epidemiology (CGE) (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>) の MLST によりシーケンスタイプ (ST) の特定も行った。

2. *astA* 事例等由来株が保有するプラスミドの比較解析

9 件 (9 株) の集発事例由来 *astA* 保有大腸菌 (O166:H15, O7:H4, O169:H45, OgGp9:H18)、4 株のその他ヒト由来および 3 株の動物由来大腸菌 O166:H15 (合計 16 株) のうち完全長ゲノム配列が未決定である 11 株についてロングリードシーケンス解析を行い、WGS とのハイブ

リッドアッセムブリによりプラスミドゲノム配列決定を行った。検出されたプラスミドのうち各株の主要なプラスミドを解析対象とし、CGE の PlasmidFinder および VirulenceFinder により Inctype の特定と病原性関連遺伝子の検出を行った。さらにプラスミドゲノムから DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>) により作製したアノテーションファイルを用いて clinker によるアミノ酸配列比較解析も行った。

3. 蛍光二重染色法による集発由来大腸菌 O166:H15 の細胞付着および侵入菌体の検出

集発由来 *astA* 保有大腸菌 O166:H15 のうち細胞付着性株 (JNE21-003) および細胞非付着性株 (JNE22-005) を CHO 細胞に感染させたサンプルについて、異なる蛍光色素により細胞外および細胞内菌体を染色することで、CHO 細胞への付着および侵入菌体の検出を行った。CHO 細胞を 24 ウェルプレートで一晩培養した後、各供試菌株をウェルに接種した。37°C で 3 時間感染させた後、PBS で洗浄、10 分間固した。細胞外細菌を可視化するため PBS で 100 倍希釈した大腸菌 O166 免疫血清を細胞に添加した。細胞を室温で 30 分間インキュベート後、PBS で洗浄し、400 倍希釈した Alexa Fluor 405 ヤギ抗ウサギ IgG (緑) で染色した。細胞内細菌を可視化するため、0.1% Triton X-100 溶液により 10 分間の細胞の透過処理を行った。前述と同じ免疫血清で細胞をインキュベートし、400 倍希釈した Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギ IgG (青) で染色した。CHO 細胞は、

CellMask Deep Red Actin Tracking Stain を用いて染色した後、共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss LSM 900）で観察を行った。

4. 集発事例由来大腸菌 O166:H15 株の *kps* クラスター比較および K 抗原の特定

5 件（5 株）の集発事例由来大腸菌 O166:H15 の *kps* クラスターについて DFAST でアノテーションを行ったファイルを用いて *clinker* による比較解析を行った。さらに、大腸菌の *kps* グループ 2 の K 抗原データベース

（<https://github.com/rgladstone/EC-K-typing>）の各 K 抗原型と比較することで K 抗原の特定も行った。

5. 集発事例由来大腸菌 JNE21-003 株の細胞付着性に関与する遺伝子の特定

kps クラスターの比較により特定された細胞付着性株に共通する遺伝子は、JNE21-003 株を用いて λ Red-recombination システムにより破壊株を作製した。作製された遺伝子破壊株は CHO 細胞を用いて付着性の解析を行った。細胞付着性が消失した破壊株について pMW119 を用いた相補株の作製と細胞付着性の解析を行った。さらに、これらの解析により細胞付着性への関与が示唆された遺伝子については *blastx* 解析および *kps* グループ 2 の代表的な K 抗原である K1, K4, K5 抗原の *kps* クラスターの遺伝子と比較を行うことで類似する遺伝子の特定も行った。

C. 研究結果

1. 大腸菌 O166:H15 株の MLST および系統解析

19 株の大腸菌 O166:H15 について ST の特定（表 1）および系統解析を行った（図 1）。5 件の集発事例から分離された 10 株はいずれも ST2914 に分類された。集発事例以外では動物由来 1 株が ST2914 に分類されたが、他の動物由来株および EHEC はいずれも ST349 に分類された。

2. *astA* 事例等由来株が保有するプラスミドの比較解析

16 株の *astA* 事例等由来株が保有するプラスミドゲノムの配列決定を行った（表 2）。動物由来の 2 株を除いた 14 株から 1 から 6 のプラスミドが検出された。14 株がそれぞれ保有する最大サイズのプラスミドを含む 16 の主要なプラスミドを解析対象とした（表 3）。9 株の集発事例由来株と 1 株の散発事例由来株（JNE22-027）の 10 株から検出された 10 のプラスミドについて解析を行った結果、いずれも *inc type* は IncFII であり、*astA* と *aap* が共通して検出された。さらに *clinker* による比較解析では 10 株のプラスミドから多くの共通する遺伝子が検出され、*blastx* 解析および DFAST によるアノテーションなどにより 6 型分泌装置（T6SS）や 4 型線毛遺伝子クラスター等も共通因子として検出された（図 2）。一方で、EHEC または動物由来大腸菌 O166:H15 の 4 株から検出された 6 つのプラスミドの *inc type* と病原性遺伝子保有状況の検出および *clinker* による比較解析結果では、これらのプラスミドはいずれ

も *astA* 事例株から検出されたプラスミドとは異なることが示された（図 3）。

3. 蛍光二重染色法による集発由来大腸菌 O166:H15 の細胞付着および侵入菌体の検出

異なる蛍光色素により細胞外および細胞内菌体を染色した蛍光観察画像の重ね合わせ（Merge）により（図 4）、細胞付着性を示す JNE21-003 株では細胞外菌体（緑）と細胞内菌体（青）が検出されたのに対し、JNE22-005 株では主に細胞内菌体（青）のみが検出された。

4. 集発事例由来大腸菌 O166:H15 株の *kps* クラスター比較および K 抗原の特定

5 株の集発事例由来大腸菌 O166:H15 の *kps* クラスターを比較した結果、細胞付着性を示す 4 株の *kps* クラスター領域 2 において共通する 5 遺伝子が検出された（図 5）。さらに大腸菌の K 抗原データベースとの比較により、細胞付着性を示す 4 株と K131 抗原の大腸菌

（SAMEA3322059 株）の *kps* クラスターが一致したことから、これらの集発事例由来 O166:H15 の K 抗原は K131 であると特定された。

5. 集発事例由来大腸菌 JNE21-003 株の細胞付着性に関与する遺伝子の特定

4 により特定された細胞付着性株に共通する 5 遺伝子は、JNE21-003 株においては *galE*, LOCUS_07640 (L764), L765, *ugd*, L767 としてアノテーションにより示された。これら 5 遺伝子の破壊株作製および細胞付着性の解析を行った結果、

L765 破壊株 (Δ L765)および Δ L767 において細胞付着性が消失した（図 6A）。

Δ L765 と Δ L767 について相補株

（ Δ L767/pMW119-L765, Δ L767/pMW119-L767）を作製し、細胞付着性の解析を行った結果では、いずれの相補株も細胞付着性を示した（図 6B）。さらに blastx 解析および代表的な K 抗原（K1, K4, K5）の *kps* クラスターの遺伝子との比較により、JNE21-003 の L765 および L767 はいずれも糖転移酵素遺伝子であり、それぞれ K4 抗原の *kfoC* および *kfoG* とアミノ酸配列が 72% および 96% 一致した。

D. 考察

astA 保有大腸菌は健康者からも分離されることから、その病原性は未だ不明瞭であるが、本研究では 9 件の集発事例の起因菌として分離された *astA* 保有大腸菌株を対象に解析を行ったことで、集発事例株に共通する病原性関連遺伝子が *astA* 以外にも複数存在していることが明らかとなった。さらに O166:H15 株に着目した解析により 5 件の集発事例由来株がいずれも ST2914 に分類されることが明らかになったが、蛍光二重染色法による染色性の違いから細胞付着性が異なる病原型が含まれていることも示された。

4 つの血清型を含む 9 件の集団下痢症事例から分離された *astA* 保有大腸菌株は共通して IncFII の類似したプラスミドを保有していた。さらに同様のプラスミドは、O166:H15 株のうち EHEC ではない（non-EHEC）散発下痢症患者由来株からも検出されたが、EHEC および動物由来株からは検出されなかった。そのた

め、当該プラスミドは O166:H15 など特定の複数の血清型のうち、ヒトに病原性を有する non-EHEC から検出されるプラスミドである可能性が示唆された。さらに、当該プラスミド上には *astA* 以外にも *aap*、T6SS および 4 型線毛遺伝子クラスターなど複数の遺伝子が共通して存在していた。これらの遺伝子が機能しているかは不明であるが、プラスミド上の共通遺伝子に着目した解析を行うことは、本菌の病原性機序解明に繋がる可能性があると考えられる。

集発事例由来大腸菌 O166:H15 JNE21-003 株の細胞付着性は、*kps* クラスター領域 2 に含まれる 2 つの糖転移酵素遺伝子が関与していることが明らかになった。しかし、当該 2 遺伝子が 4 件の O166:H15 株による集発事例由来株の細胞付着性に寄与する共通因子（遺伝子）であることを示すためには、他の事例由来株を用いて同様の検証を行うことも重要であると考ええる。さらに、細胞付着性株の K 抗原型は K131 であり、細胞付着性に関与していた 2 遺伝子が K4 抗原の *kfoC* および *kfoG* と高いアミノ酸相同性を示すことも明らかとなった。K131 以外の K 抗原型においてもこれら 2 遺伝子を含む抗原型が存在するか調査を行うことや、該当する抗原型（K4 を含む）の大腸菌株について解析を行っていくことは、細胞付着性に関与する K 抗原（*kps* クラスター）を有する大腸菌の検出系開発、および *kps* クラスターによる細胞付着性の機序解明のために重要であると考えられる。

E. 結論

9 件の集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌株から共通して類似のプラスミドが検出されたことから、当該プラスミドに着目した解析を行うことにより、集団下痢症を引き起こす *astA* 保有大腸菌の病原性解明に繋がる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

Kubomura A, Lee K, Iyoda S, Akeda Y. 2025. Complete genome sequence of three atypical diarrheagenic *Escherichia coli* O166: H15 strains from foodborne outbreaks. *Microbiology Resource Announcements*, 14(11), e00746-25.

2) 学会発表

なし

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. 系統解析を行った19株の大腸菌O166:H15の由来およびシーケンスタイプ (ST)

由来	自治体等	株名	ST (MLST)	astA	CHO細胞 付着性
集団下痢症由来株 (5事例、10株)	熊本県	JNE070796	2914	+	+
		JNE070801	2914	+	+
	埼玉県	JNE21-003	2914	+	+
		JNE21-005	2914	+	+
		JNE21-007	2914	+	+
	姫路市	JNE21-009	2914	+	+
	大分県	JNE12-001	2914	+	+
		JNE12-002	2914	+	+
		JNE12-003	2914	+	+
	東京都	JNE22-005	2914	+	-
その他ヒト由来 (5株)	散発下痢症患者	JNE22-027	349	+	-
		JNE181928 (EHEC)	349	+	-
		JNE162304 (EHEC)	349	+	-
		JNE101305 (EHEC)	349	-	-
	健康者	JNE192777 (EHEC)	349	+	-
動物由来 (4株)	ウシ	23Y35	2914	-	-
		23M24	349	+	-
		24K024	349	-	-
	キョン	C123	349	+	-

表2. 集団下痢症事例由来*astA* 大腸菌およびその他由来大腸菌O166:H15のプラスミド保有状況

由来	血清型	株名	保有するプラスミドのサイズ (bp)
集団下痢症 (9事例)	O166:H15 (5事例)	JNE21-003	139k, 84k, 3k, 2k
		JNE21-009	188k, 163k, 2k
		JNE070796	138k, 91k, 5k
		JNE22-005	158k, 111k, 97k, 31k, 6k, 2k
		JNE12-001	175k, 3k, 2k
	O7:H4 (2事例)	JNE20-002	140k
		JNE22-001	116k, 2k
	O169:H45	JNE21-010	154k, 47k, 33k
	OgGp9:H18	JNE21-012	185k, 96k
散発下痢症	O166:H15	JNE22-027	134k, 7k
		JNE162304 (EHEC)	140k, 112k, 59k
		JNE181928 (EHEC)	140k, 107k
		JNE101305 (EHEC)	173k, 28k
健康者 動物	O166:H15	23Y35	107k
	O166:H15	23M24	なし
		C123	なし
			なし

表3. 集団下痢症等由来大腸菌14株から検出された16のプラスミドのInctypeおよび検出された病原性関連遺伝子

由来	血清型	株名	プラスミドサイズ (bp)	Inctype (Plasmid Finder)	病原性関連遺伝子 (Virulence Finder)
集団下痢症 (9事例, 9株)	O166:H15 (5事例)	JNE21-003	139k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
		JNE21-009	188k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
		JNE070796	138k	FII	<i>astA, aap, eatA</i>
		JNE22-005	158k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
		JNE12-001	175k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
	O7:H4 (2事例)	JNE20-002	140k	FII	<i>astA, aap</i>
		JNE22-001	116k	FII	<i>astA, aap</i>
	O169:H45	JNE21-010	154k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
	OgGp9:H18	JNE21-012	185k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
散発下痢症 (3株)	O166:H15	JNE22-027	134k	FII	<i>astA, aap, traJ</i>
		JNE162304 (EHEC)	140k	B/O/K/Z	<i>astA, cdt, traT</i>
			112k	FIB, FII	<i>astA, eltI, estb, traJ, traT</i>
		JNE181928 (EHEC)	140k	B/O/K/Z	<i>astA, cdt, traT</i>
			107k	FIB, FII	<i>astA, eltI, estb, traJ, traT</i>
健康者 動物	O166:H15	JNE101305 (EHEC)	173k	B/O/K/Z, FIB	<i>cia, cvaC, ehxA, epeA, espP, iha, subA, traT</i>
	O166:H15	23Y35	107k	FII, FIB	<i>ompT, traT</i>

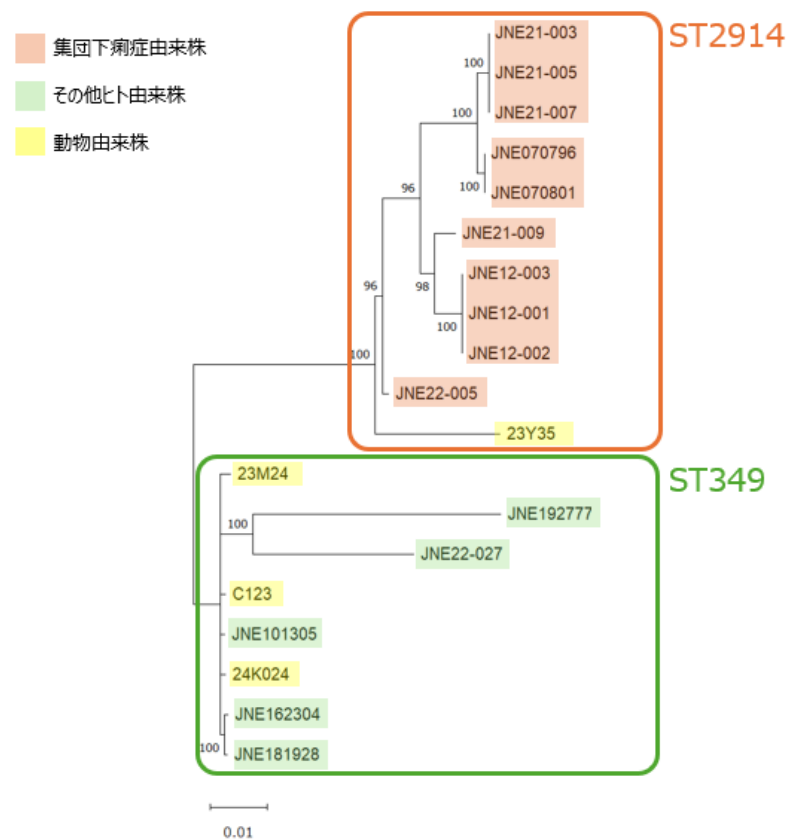


図 1. 19 株の大腸菌 O166:H15 (5 件の集団下痢症事例由来 *astA* 保有株、その他ヒト由来株、動物由来株) を用いた系統解析および MLST によるシーケンスタイプ (ST)

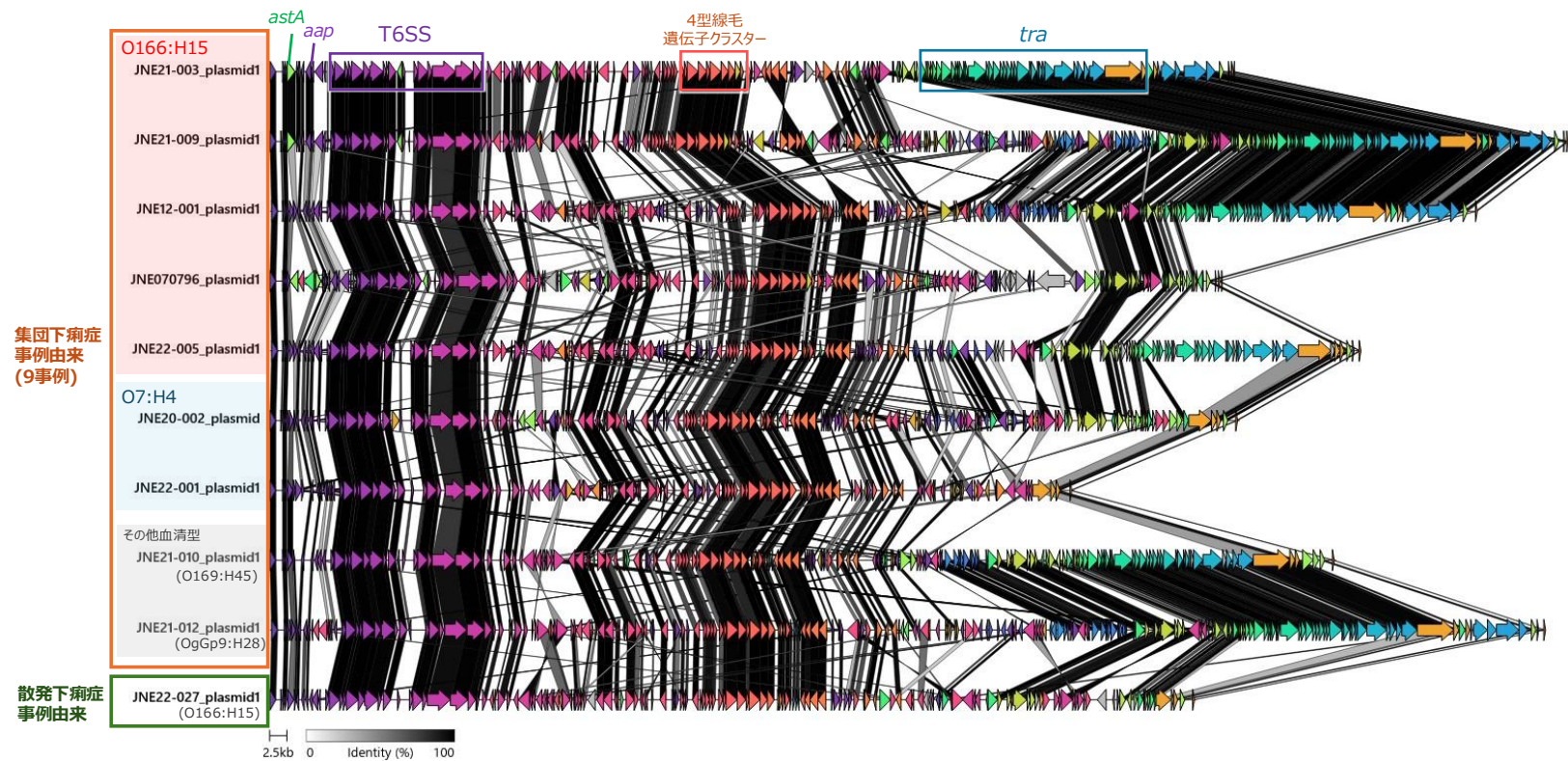


図2. 9件の集団下痢症事例および1件の散発下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌から検出された IncFII プラスミドの clinker による比較解析結果

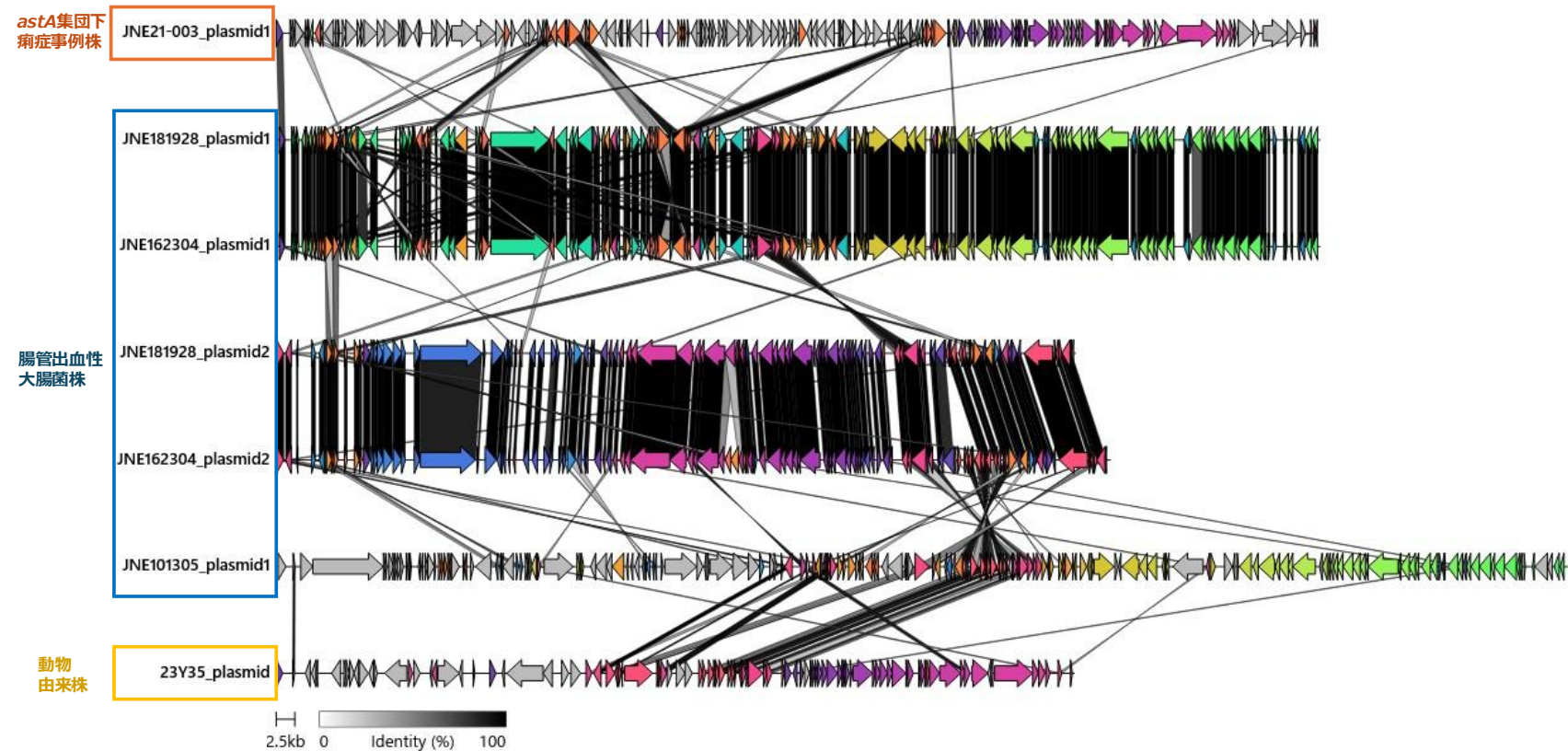


図 3. 集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌（JNE21-003）、腸管出血性大腸菌 および動物由来大腸菌 O166:H15 株から検出されたプラスミドの clinker による比較解析結果

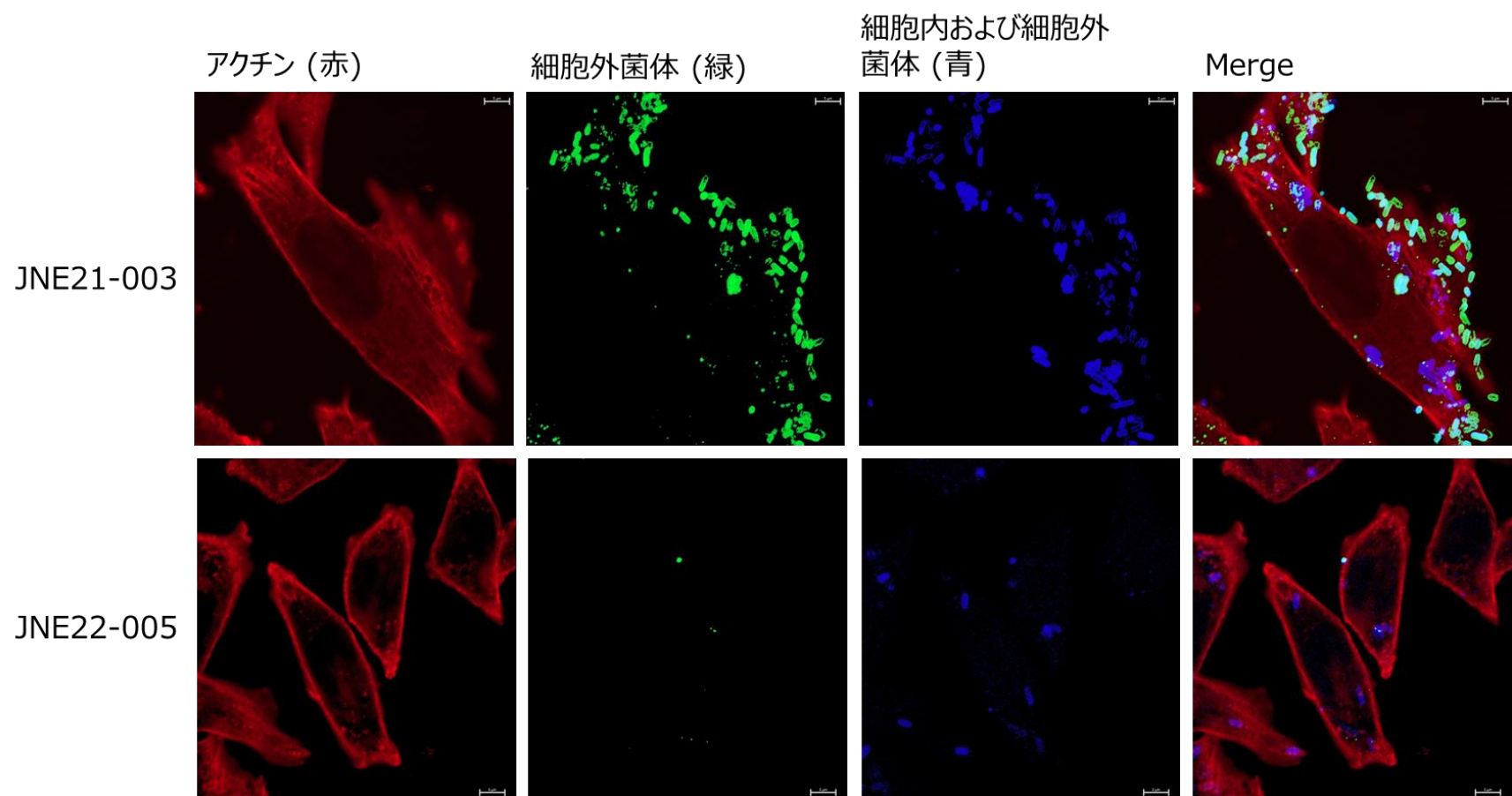


図 4. 集団下痢症事例由来大腸菌 O166:H15 の細胞付着性株 (JNE21-003) および細胞非付着性株 (JNE22-005) を感染させた CHO 細胞について蛍光二重染色を行った後の共焦点顕微鏡による蛍光観察像

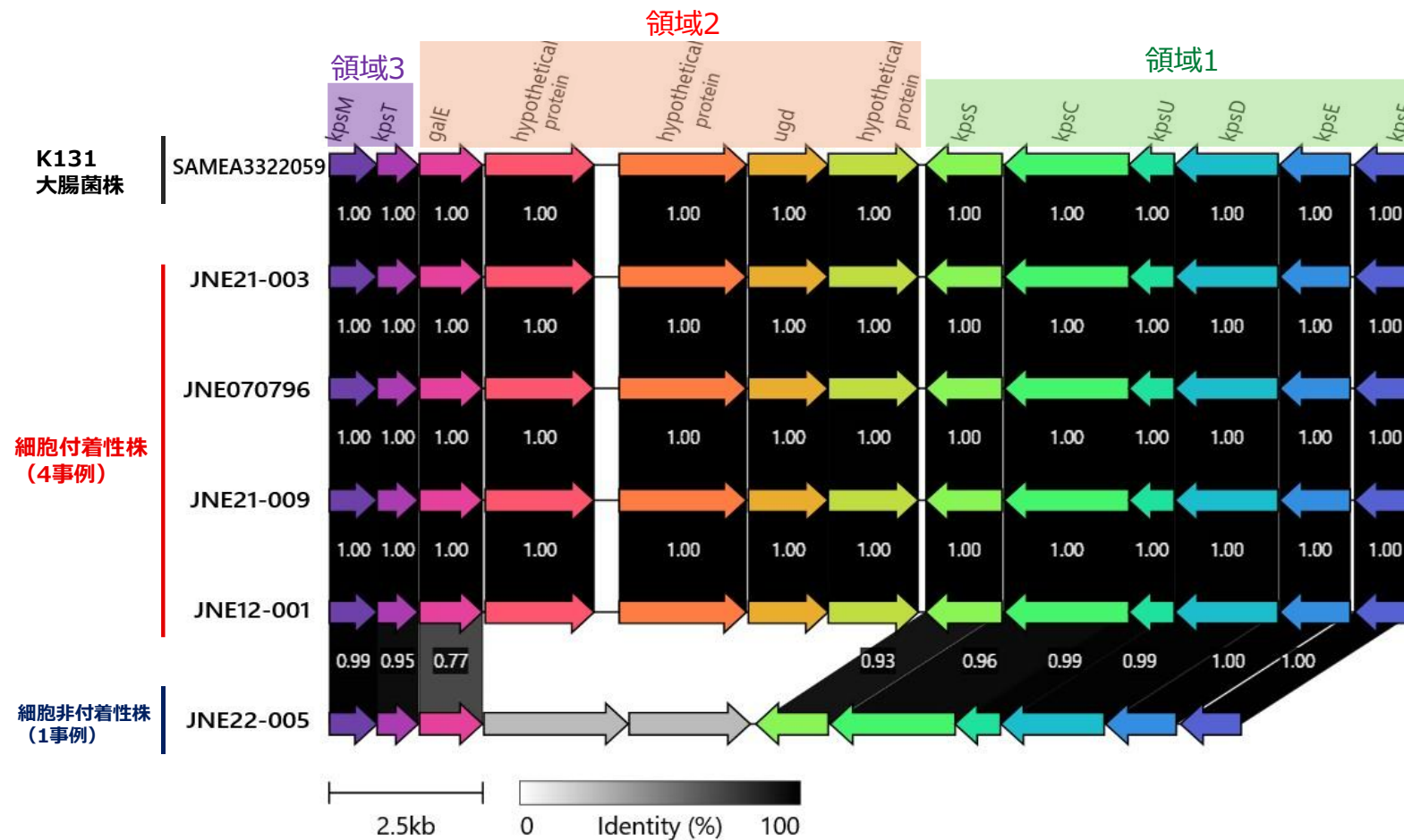


図 5. 5 件の集団下痢症事例由来大腸菌 O166:H15 および大腸菌 K131(SAMEA3322059 株)の莢膜遺伝子クラスターの clinker による比較解析結果
表示されている数値は各遺伝子間のアミノ酸配列の同一性を示す

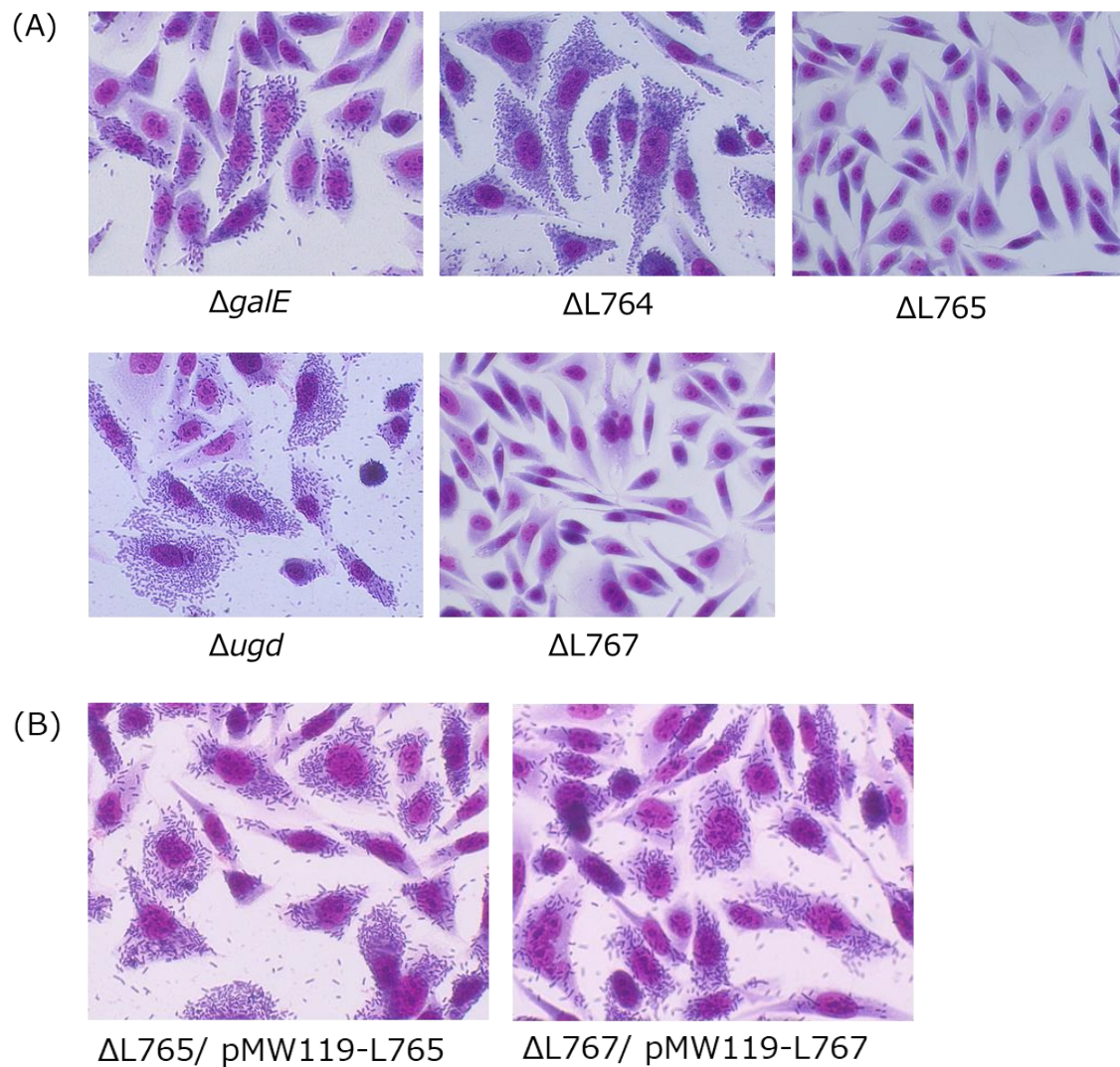


図 6. 集団下痢症事例由来大腸菌 O166:H15 JNE21-003 株の莢膜遺伝子クラスター領域 2 を構成する 5 つの遺伝子の各遺伝子破壊株を用いた CHO 細胞付着性の解析結果 (A)、および細胞非付着性を示した $\Delta L765$ および $\Delta L767$ の相補株の CHO 細胞付着性解析結果 (B)