

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03133

研究課題名（和文）志賀毒素2e産生性大腸菌のゲノムおよび毒素産生能の解析と高リスク系統同定法の開発

研究課題名（英文）Analysis of the genome and toxigenicity of Shiga toxin 2e-producing Escherichia coli and development of a method for the identification of the high risk strains

研究代表者

楠本 正博（Kusumoto, Masahiro）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・グループ長

研究者番号：40548210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：浮腫病は豚に深刻な被害を及ぼし、志賀毒素2e（Stx2e）を産生する大腸菌により惹起される。本研究では、国内で豚から分離されたStx2e産生性大腸菌について全ゲノム解析を行った。また、抗Stx2eモノクローナル抗体を用いたELISAによる毒素産生試験法を開発し、Stx2eの産生量が高い菌群を見出した。Stx2eプロファージは2種類（グループIおよびII）に大別され、浮腫病由来株はマイトマイシンCで誘導されないことを特徴とするグループIIのStx2eプロファージを保有していた。本研究結果より、浮腫病の高リスク系統はグループIIのStx2eプロファージにより判別できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおいて重篤な腸管感染症を引き起こす志賀毒素産生性大腸菌（腸管出血性大腸菌）が産生する志賀毒素（主にStx1、Stx2a、Stx2c）とは異なり、Stx2eはこれまで毒素産生試験法が確立されておらず、その産生機構も未解明であった。Stx2e産生性大腸菌は主に豚で問題となるが、近年、ヒトでも感染症の原因となることが知られている。本研究においてStx2e産生試験法を開発し、リスクの高い菌群について明らかにしたことは、家畜およびヒトにおける感染症の診断や制御に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Edema disease brings serious damage to swine and is caused by Shiga toxin 2e (Stx2e)-producing Escherichia coli. In this study, we analyzed the genome of Stx2e-producing E. coli isolated from swine in Japan. We also developed a method for quantitating Stx2e by ELISA using anti-Stx2e monoclonal antibody and found strains that produced a large amount of Stx2e. There were two types of Stx2e prophage (groups I and II), and the E. coli strains isolated from swine with Edema disease possessed the group II prophage that was characterized by mitomycin C-uninducible. Our data show that the high risk strains for Edema disease can be determined by the presence of group II Stx2e prophage.

研究分野：細菌学

キーワード：志賀毒素2e産生性大腸菌 全ゲノム解析 毒素産生試験 浮腫病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 豚の浮腫病は養豚に深刻な被害を及ぼす疾病であり、志賀毒素 2e (Stx2e) を産生する志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) により惹起される。ヒトにおいて重篤な腸管感染症を引き起こす STEC (血清型 O157 など) が産生する志賀毒素 (主に Stx1、Stx2a、Stx2c) とは異なり、Stx2e は毒素産生試験法が確立されておらず、その産生機構も未解明であり、また Stx2e 産生 STEC の系統分布や高リスク系統の有無なども不明のままである。

(2) 豚の浮腫病は Stx2e を産生する大腸菌が定着因子 (主に F18 線毛) により小腸に定着、増殖し、産生された Stx2e が腸管から吸収され、全身性の毒血症 (血栓形成を伴う微小血管やリンパ管の循環障害) を起こす疾病である。主に眼瞼周囲などの浮腫病変や中枢神経障害が認められ、急死することが浮腫病の典型的な症状であるが、必ずしも顕著な浮腫が認められずに発育不良や神経症状が認められ死亡する事例も多い。また、経過が甚急性であることから、浮腫病発症後の罹患豚の治療は困難と考えられている。したがって、浮腫病の被害を減らすためには、リスクの高い Stx2e 産生性大腸菌の農場への浸潤を阻止することが重要である。

(3) 1991 年から 2018 年にかけて全国の下痢および浮腫病の豚群から分離された病原性大腸菌 1,526 株を収集し、血清型や病原性関連遺伝子保有状況などを調査した結果、58.7% (896 株) が stx2e 遺伝子を保有していた (引用文献)。浮腫病由来株はその 55.2% に相当する 495 株に過ぎず、残りは下痢事例 (ほとんどの株がエンテロトキシン遺伝子を同時に保有) や、非典型的な (明瞭でない) 症状のため浮腫病と断定できなかった事例などに由来する株群であった。また、stx2e 遺伝子を保有する 896 株のうち 853 株 (95.2%) が 22 種類の O 群血清型に型別され、残り 43 株は型別不能 (OUT) であった。豚の浮腫病の病性鑑定は臨床症状に加えて分離株が保有する stx2e 遺伝子の同定に比重が置かれているが、このように Stx2e 産生性大腸菌には様々な系統が存在し、典型的な臨床症状の浮腫病を起こす菌群は約半数しかないことから、浮腫病の被害を減らすにはリスクの高い菌群を効率的に同定することが重要である。

2. 研究の目的

ヒトにおいて重篤な食品媒介性感染症の原因菌として問題となっている STEC (血清型 O157 など) では、志賀毒素の抗体を用いた毒素産生試験法が開発されている。また、STEC O157 において stx1 遺伝子および stx2 遺伝子はそれぞれプロファージ上にコードされており、ファージを介して伝播することが知られている。志賀毒素の産生機構は同一ではなく、Stx1 は stx1 遺伝子上流に存在するプロモーターにより低鉄イオン条件下で産生量が増加するように制御されており、Stx2 はファージの誘導に伴って産生量が増加することなどが近年詳しく解明されている (引用文献)。Stx2 は毒素のサブタイプとして Stx2a ~ Stx2g が知られており、ヒト患者から分離された STEC の多くは Stx2a または Stx2c を産生する。Stx2e はこれらのサブタイプとは抗原性が異なるため、浮腫病由来の STEC には既存の抗体を用いた毒素産生試験法を適用することができず、その Stx2e 産生機構も未解明のままである。そこで本研究では、Stx2e 産生 STEC の系統や毒素産生性と疾病リスクとの関係を明らかにし、養豚の現場で優先的に摘発すべきリスクの高い菌群を同定する手法 (マーカー) の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 1991 年から 2018 年にかけて全国の下痢および浮腫病の豚群から分離された病原性大腸菌 1,526 株について、各都道府県で半年間に分離された株の中から O 群血清型あたり 1 株ずつの基準で 505 株を選抜し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いた全ゲノム解析を行った。得られたリードを用いて Platanus_B によるアセンブルを行い、300bp 以上のコンティグ配列について coverage (コンティグ数あたりのリード数) ≥ 5 以上、checkM を用いた contamination 評価 1.5 未満を指標にシーケンス結果を評価、選抜し、豚由来病原性大腸菌 505 株のドラフトゲノム配列を得た。また、文部科学省科学研究費新学術領域研究「先進ゲノム支援」の支援を受け、健康豚から分離した非病原性大腸菌 285 株の全ゲノム解析も同様に実施し、合計 790 株のドラフトゲノム配列を用いた系統解析を行った。

(2) 本研究グループが保有する (エピトープが異なる) 数種類の抗 Stx2e モノクローナル抗体より ELISA に最適な抗体を選抜し、通常培養および (ファージを誘導することで知られる) マイトマイシン C を添加した培養それぞれにおいて測定条件の検討を行い、毒素産生試験法を確立した。また、本試験法を用いて、Stx2e 産生性大腸菌 108 株および志賀毒素非産生性大腸菌 4 株 (陰性コントロール) について毒素産生量を測定した。

(3) 毒素産生性が特徴的な 25 株 (すべて stx2e 遺伝子保有株) を選抜し、ロングリード型シーケンサー (MinION) を用いたゲノム解析を行い、ショートリード型シーケンサー (HiSeq) で得られたドラフトゲノム配列と合わせて Stx2e プロファージの完全配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 合計 790 株のドラフトゲノム配列から抽出したコア遺伝子 1,688 個より、220,044 個の一塩基多型 (SNPs) を同定した。図 1 は内側に SNPs を用いた系統樹、外側に豚の症状 (下痢や浮腫病、健康) 各菌株の産生毒素 (Stx2e、LT、ST)、O genotype (O 抗原合成遺伝子を用いた遺伝子型) を示す。主に病豚由来株で構成される系統と、病豚および健康豚由来株が混在する系統があり、主要 O genotype (Og139、Og149、Og116、OgSB9) および Og147 は前者であった (図 1)。stx2e 遺伝子は、豚由来 STEC の主要系統 (Og139、Og116、OgSB9) 以外にも様々な系統に分布していることが明らかになった。また、健康豚由来株にも可動性遺伝子により伝達されたと思われる Stx2e (プロファージ) や LT および ST (プラスミド) の遺伝子が確認されたが、豚においてこれらの毒素産生遺伝子を保有する病原性大腸菌の健康保菌はわずかであった (図 1)。

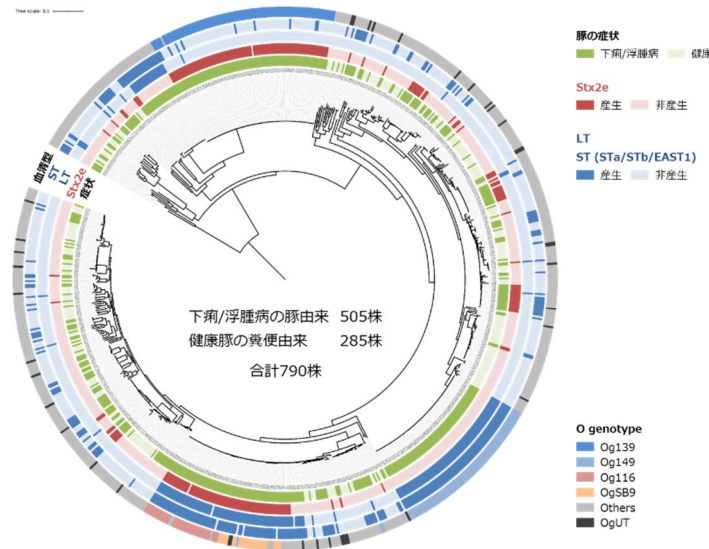


図1 豚由来大腸菌790株の全ゲノム情報を用いて作成した系統樹

(2) 毒素産生試験に関する条件検討の結果、Stx2e の測定は、菌の終夜培養液を新鮮な培地に継代し、対数増殖初期にマイトマイシン C を添加 (または不添加) して 4 時間後に ELISA を行うことに決定した。Stx2e 産生量 (培養液 1 OD あたり換算) は マイトマイシン C 添加で 0.4 ~ 5,303 ng、マイトマイシン C 非添加で 0.4 ~ 395 ng、マイトマイシン C による Stx2e 誘導能 (÷) は 1.1 ~ 314 倍とそれぞれ幅があり、同一系統であっても菌株により様々であった。また、Og116 および OgSB9 を含む系統ではマイトマイシン C 誘導後の Stx2e 産生量 () が多い傾向があることを確認した。

(3) 完全配列を解析した Stx2e プロファージの大半はその構造や染色体への挿入位置から 2 つのグループ (I および II) に大別され (図 2)、残りのプロファージの構造は多様であった。グループ I と II では stx2 遺伝子周辺は保存されていたが、その他の構造は大きく異なっていた。

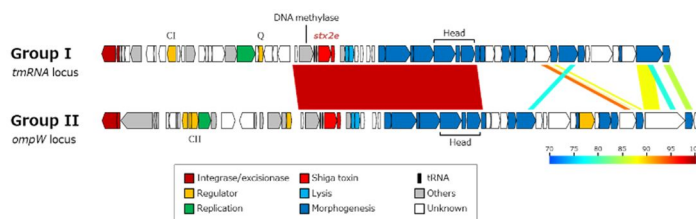


図2 主要な2種類のStx2eプロファージの構造

(4) Stx2e プロファージのグループ I と II の大きな違いはマイトマイシン C 誘導能の有無であり、浮腫病由来株は主に、マイトマイシン C で誘導されないことを特徴とするグループ II の Stx2e プロファージを保有していた (図 3)。したがって、浮腫病の高リスク系統 (菌群) はグループ II の Stx2e プロファージにより判別可能であり、たとえばインテグラーゼ遺伝子などは、その特異的遺伝子として検出対象となり得る。

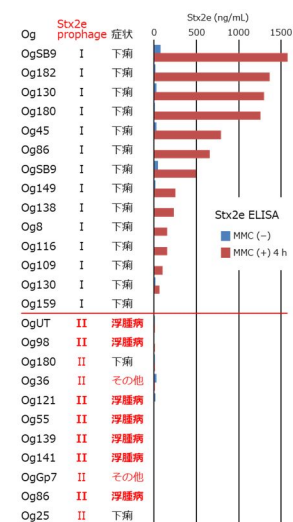


図3 Stx2eプロファージ、豚の症状、Stx2e産生量および誘導能の比較

(5) ヒトへの病原性が高い STEC (腸管出血性大腸菌) には

マイトマイシン C で誘導される Stx2 とマイトマイシン C で誘導されず鉄イオン濃度が産生に影響する Stx1 があり、一般に Stx2 の病原性が高い(引用文献)。一方、豚ではマイトマイシン C で誘導されないグループ II プロファージ保有株が浮腫病を起こしており、今後、飼料に含まれる金属イオン(亜鉛など)との関連も含め、その病原性発現機構を詳細に解析する必要がある。

(6) 以上の検討により、stx2e 遺伝子が様々な系統に分布していること、Stx2e プロファージは大きく 2 種類に大別され、マイトマイシン C で誘導されないグループ II プロファージ保有株が浮腫病を起こすことを明らかにした。また、本研究において Stx2e 産生試験法を開発し、リスクの高い菌群について明らかにしたことは、家畜およびヒトにおける感染症の診断や制御に役立つことが期待される。

<引用文献>

Kusumoto, M., Hikoda, Y., Fujii, Y., Murata, M., Miyoshi, H., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., Akiba, M. Emergence of a multidrug-resistant Shiga toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* lineage in diseased swine in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1074-1081, 2016.

Shimizu, T., Ohta, Y., Noda, M. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect. Immun.* 77, 2813-2823, 2009.

清水健. 腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素の発現様式とキンタ以外への放出機構 志賀毒素転換ファージの構造と昨日からの考察 . *日本細菌学雑誌* 65, 297-308, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arimitsu Hideyuki, Kohda Tomoko, Mukamoto Masafumi, Kusumoto Masahiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Evaluation of immunochromatographic test of Shiga toxin 2e in enrichment cultures of swine edema disease clinical samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1913-1917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有満秀幸, 幸田知子, 向本雅郁, 楠本正博
2. 発表標題 イムノクロマトグラフィーによるブタ検体一晩増菌培養液からのStx2e検出
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有満秀幸, 幸田知子, 向本雅郁, 楠本正博
2. 発表標題 ブタ検体培養上清からの志賀毒素バリエーションStx2eの迅速検出
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 哲也 (Hayashi Tetsuya) (10173014)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有満 秀幸 (Arimitsu Hideyuki) (40367701)	兵庫県立大学・環境人間学部・准教授 (24506)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関