

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05966

研究課題名（和文）比較ゲノムとプロテオタイピングによる非定型下痢原性大腸菌の系統分類

研究課題名（英文）Phylogenetic classification of atypical diarrheagenic Escherichia coli by comparative genomics and proteotyping.

研究代表者

大屋 賢司（Ohya, Kenji）

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・室長

研究者番号：50402219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：非定型下痢原性大腸菌であるastA保有大腸菌は、astAを保有する株が必ず下痢原性を有するわけではなく、病原性株と非病原性株の実態は不明である。健康人由来 astA保有株と下痢症患者由来 astA保有株について、プロテオタイピングとゲノム比較解析により、非定型下痢原性大腸菌のカテゴリーを確立させることを目的とした。プロテオタイピングでは、病原性の有無、astA保有状況との明かな関連は認められなかった。ゲノム解析では、特定の病原因子群の保有パターン及びプラスミドが株の病原性へ関与することを示唆する結果を得た。ゲノム解析の観点からは、非定型下痢原性大腸菌を定義するための標的候補を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下痢原性大腸菌は、腸管病原性大腸菌、腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管凝集付着性大腸菌（EAEC）等に分類されている。astAは、EAECの約50%が保有するが病原性発現には必須ではない。また、astA陽性大腸菌は、集団食中毒の原因となることがあるが、astAの病原性への直接の関与は不明である。食中毒の原因と思われる大腸菌が分離された際は、各下痢原性大腸菌の特徴となる病原因子等の保有状況を調べるが、非定型下痢原性大腸菌は確立されたマーカーがないため、通常の検査では検出できず「原因不明」となることも多いと思われる。非定型下痢原性大腸菌の定義を明らかにすることは公衆衛生上極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：Atypical diarrheagenic E. coli harboring astA does not always show diarrheagenic properties, and the actual status of pathogenic and non-pathogenic strains is unknown. We aimed to establish the category of atypical diarrheagenic E. coli by proteotyping and comparative genomic analysis of astA-positive strains from healthy individuals and astA-positive strains from diarrhea patients. Proteotyping showed no clear association with virulence and astA carriage status. Genomic analysis showed a pattern of a specific group of virulence factors, and a specific plasmid suggesting a role of the plasmid in strain virulence. In terms of genomic analysis, candidate targets for defining atypical diarrheagenic E. coli were obtained.

研究分野：衛生微生物学

キーワード：病原性大腸菌 ゲノム 分類

1. 研究開始当初の背景

下痢原性大腸菌は、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC)、他の下痢原性大腸菌に分類されている。腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン (EAST1) をコードする *astA* は、EAEC が 50% 程度の割合で保有するが、EAEC の病原性発現には必須ではなく、「他の下痢原性大腸菌」の主要な病原因子として知られる (Dubreuil *et al.*, 2019)。定型の下痢原性大腸菌の病原因子を保有しない *astA* 保有大腸菌による集団下痢症は、1996 年大阪で発生した食中毒事例 (患者数 54 名) が初出であり (Nishikawa *et al.*, 1999)。以降、国内では、*astA* 保有大腸菌による数 10~数 100 人規模の集団感染事例が相次いで報告されている。2020 年も埼玉県において給食の海藻サラダを原因食とする *astA* 保有大腸菌 (O7) による大規模食中毒 (患者数 3,543 名) が発生した。*astA* 保有大腸菌は、環境中に広範に分布し、食品や動物から比較的高率に検出される。これらの株が、必ずしもヒトや動物に下痢原性を有するわけではない。そのため、*astA* 保有大腸菌の下痢原性大腸菌としての意義を明らかにすることは、公衆衛生上極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、*astA* 保有大腸菌の全ゲノム系統分類及びプロテオタイピングを行い、各クレードに特異的な遺伝子 (領域) を抽出し、*astA* 保有大腸菌を始めとした非定型下痢原性大腸菌のカテゴリーを確立することを最終目標とした。具体的なアプローチは以下の通りである。

- (1) 下痢症患者及び健常人から分離された *astA* 保有大腸菌を解析に用いた。
- (2) 上記株の MALDI-TOF MS によるプロテオタイピングを行う。
- (3) 上記株のゲノム配列を決定する。必要に応じて完全長ゲノムを取得する。
- (4) プロテオタイピングもしくはゲノム系統解析によるクレードについて、菌株の由来、培養細胞への付着能等を指標とした病原性との関連を検討する。

以上により、*astA* 保有大腸菌の下痢原性大腸菌としてのカテゴリーを確立させ、本菌による食中毒の予防対策及び原因調査へ貢献するための基盤となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 菌株

大阪市立環境科学研究所で健常人から分離された *astA* 保有大腸菌 18 株 (Wang *et al.*, 2011)、1997 年から 2000 年にかけて大阪市内の散发性下痢症患者から分離された *astA* 保有大腸菌 21 株 (Nishikawa *et al.*, 2002) を用いた。これら菌株は、予め、Hep-2 細胞を用いた試験で培養細胞への接着能を検証されているものを用いた。

(2) MALDI-TOF MS によるプロテオタイピング

プロテオタイピングは、AXIMA 微生物同定システム (島津製作所) を用いて行った。標準寒天上に生育したコロニーを 4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) もしくはシナピン酸をマトリクスとして用いて前処理し、MALDI-TOF MS 解析に供した。得られたスペクトルデータをシステム付属のソフトウェア ZARAMIS でクラスター解析を行った。

(3) ゲノム配列の決定と解析

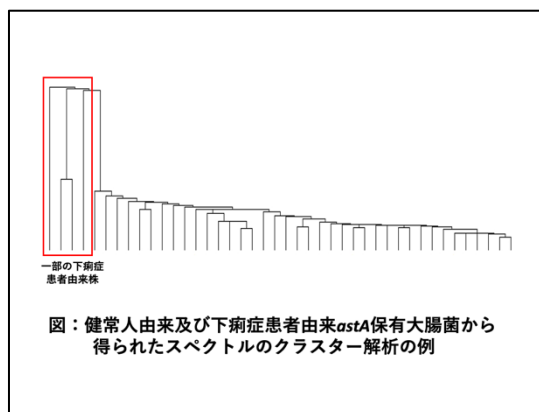
短鎖配列は、Illumina MiSeq プラットフォームで取得した。長鎖配列取得用の高分子 DNA は、Mag Attract HMW DNA kit (Qiagen) を用いて調製した。調製した高分子 DNA からライブラリーを作製し PromethION プラットフォーム (Oxford Nanopore) で長鎖配列を取得した。Unicycler (version 0.5.0) もしくは Flye (version 2.9.2) で短鎖配列と長鎖配列のハイブリッドアセンブルを行い、Pilon (version 1.24) でポリッシング後、完全長ゲノムを取得した。Clement の分類に従い phylogroup を決定した (Beghain *et al.*, 2018)。アノテーションは DDBJ fast annotation tool (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp>) で行い、プラスミド構造の検索は PLSDB (<https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb>) にて行った。病原因子等の解析は、Center for Genome Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org>) 上のプログラムを用いて行った。

4. 研究成果

(1) *astA* 保有大腸菌のプロテオタイピング

MALDI-TOF MS により健常人及び下痢症患者由来 *astA* 保有大腸菌のプロテオタイピングを試みた。定法に従い、サンプルを処理するマトリクスとして CHCA を用いて得られたマススペクトルのクラスター解析を行ったところ、供試株は大きく 2 つのクラスターに分かれた (図 1)。図 1 赤枠で囲ったクラスターは下痢症患者由来かつ培養細胞への付着陽性の株からなったが、この

ような株は一方のクラスターにも健常人由来株と混在して存在していた。そこで、CHCA よりも高分子領域の検出感度が高いとされるシナピン酸をマトリクスとして用いたが、クラスターの形成状況に変化は特に認められなかった。また、図1赤枠で囲ったクラスターと、他のクラスターに存在する株の間で、実際のマススペクトルを比較したが、健常人、下痢症患者由来株を識別できるピークを同定することはできなかった。以上により、プロテオタイピングでは、患者由来株の一部は、健常人由来株と異なるクラスターに分けることができたが、両者を厳密に識別できるピークの同定には至らなかった。ただし、一定の傾向が認められたことから、検体前処理方法やピーク検出方法を改良することによって、両者の鑑別ができるピークを同定できる可能性も示唆された。



(2) astA 保有大腸菌のゲノム解析

astA 保有大腸菌について、健常人由来 15 株と下痢症患者由来 9 株について完全長ゲノムを取得した。今回ゲノムを決定した計 24 株は、Clemont の phylogroup 分類では A、B1、B2、C、D、F に分類され、健常人由来株、下痢症患者由来株に関わらず、幅広く分類された。これらの株が保有するプラスミド数および astA 遺伝子数を表にまとめる。astA 遺伝子は、染色体上、プラスミド上いずれにも存在するとされているが、今回の供試株でも同様の結果であり、染色体上では 0~6 コピー、プラスミド上には 0~3 コピーの幅で認められた。プラスミド数及び astA 遺伝数いずれも健常人由来株、下痢症患者由来株の間で明らかな差は認められなかった。astA 以外の病原因子に着目すると、ファミリーを構成する特定の病原因子のクラスターのうち、下痢症患者由来株もしくは細胞附着能を有する株にのみ認められるクラスターのタイプがあることが明らかとなった。また、この病原因子をプラスミド上にもつ株が複数存在し、このプラスミド上には、他の病原因子のクラスターも存在することが明らかとなった。2 種類の病原因子クラスターをもつプラスミドは、分子量 (100 k~150 k) を始めとした構造が非常に似通っており、astA 保有大腸菌以外の他の非定型下痢原性大腸菌も類似のプラスミドを保有していた事例が幾つか確認された。

表：完全長ゲノムを決定した株のプラスミド保有状況及び astA 遺伝子数

由来	株名	プラスミド数			astA 遺伝子数	
		< 50 k	50-100 k	100 k <	染色体	プラスミド
健常人由来	A	2	1	2	0	1
	B	4	1	2	0	3
	C	0	0	1	2	2
	D	1	0	1	1	0
	E	0	0	0	1	0
	F	3	0	1	0	1
	G	1	0	1	0	1
	H	0	1	1	0	1
	J	0	2	0	4	1
	K	0	0	0	2	0
	L	3	1	1	1	0
	M	1	1	1	1	0
	N	1	1	1	1	0
	O	1	1	1	1	0
下痢症患者由来	P	0	1	0	1	0
	I	1	1	1	0	2
	II	0	1	0	1	0
	III	3	0	1	6	0
	IV	1	1	2	0	0
	V	3	1	1	0	1
	VI	1	1	1	0	2
	VII	0	1	0	0	1
	VIII	4	0	2	0	1
IX	3	1	0	1	0	

以上のように、本課題では、astA 保有大腸菌を始めとした非定型下痢原性大腸菌のカテゴリーを確立させることを目的に研究を行った。研究開始当初の状況通り、astA と病原性との直接の関係を示すことはできなかったが、astA とは別の病原因子クラスターが非定型下痢原性大腸菌の病原性の一部に関わっている可能性が示唆された。この病原因子ファミリーは、EPEC、EHEC、EAEC、ETEC など定型の下痢原性大腸菌検査の際には検出対象となっていない場合が多く、原因不明であった事例の中に、このような病原因子をもつ大腸菌が原因となっている可能性がある。

<引用文献>

Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for Escherichia genus strain phylotyping. Microb Genom. 2018 Jul;4(7):e000192.

Dubreuil JD. EAST1 toxin: An enigmatic molecule associated with sporadic episodes of diarrhea in humans and animals. J Microbiol. 2019 Jul;57(7):541-549.

Nishikawa Y, Ogasawara J, Helander A, Haruki K. An outbreak of gastroenteritis in Japan due to Escherichia coli O166. Emerg Infect Dis. 1999 Mar-Apr;5(2):300.

Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Kitase T, Abe N, Nakamura H, Wada T, Ishii E, Haruki K; Surveillance Team. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. Jpn J Infect Dis. 2002 Dec;55(6):183-90.

Wang L, Wakushima M, Kamata Y, Nishikawa Y. Exhaustive isolation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by a colony hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. Lett Appl Microbiol. 2011 Sep;53(3):264-70.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 大屋賢司, 池内隼佑, 林谷秀樹, 工藤由起子	4. 巻 65
2. 論文標題 乾燥きくらげからのサルモネラ属菌の検出および衛生指標菌数の測定	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 食品衛生学雑誌	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Shouhei, Ohya Kenji, Yoshinari Tomoya, Ohnishi Takahiro, Mizukami Katsumi, Suzuki Tomikatsu, Takinami Kenji, Suzuki Takayoshi, Lee Kenichi, Iyoda Sunao, Akeda Yukihiro, Yahata Yuichiro, Tsuchihashi Yuuki, Sunagawa Tomimasa, Hara-Kudo Yukiko	4. 巻 151
2. 論文標題 Atypical diarrhoeagenic <i>Escherichia coli</i> in milk related to a large foodborne outbreak	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Epidemiology and Infection	6. 最初と最後の頁 e150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0950268823001395	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 -
1. 著者名 Arai Sakura, Ooka Tadasuke, Shibata Mizuha, Nagai Yuhki, Tokoi Yuki, Nagaoka Hiromi, Maeda Rika, Tsuchiya Akihiko, Kojima Yuka, Ohya Kenji, Ohnishi Takahiro, Konishi Noriko, Ohtsuka Kayoko, Hara-Kudo Yukiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Development of a Novel Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay to Detect <i>Escherichia albertii</i> in Chicken Meat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Foodborne Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 823 ~ 829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/fpd.2022.0042	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 -
1. 著者名 SASAKI Y, IKEDA T, YONEMITSU K, KURODA M, OGAWA M, SAKATA R, UEMA M, MOMOSE Y, OHYA K, WATANABE M, HARA-KUDO Y, OKAMURA M, ASAI T	4. 巻 85
2. 論文標題 Antimicrobial resistance profiles of <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Salmonella</i> spp. isolated from enteritis patients in Japan.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 463 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0424	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 -

1. 著者名 Koga Maika, Nogami Yumi, Nakano Asami, Matsunaga Norihisa, Ohya Kenji, Hara-Kudo Yukiko, Hidaka Chie	4. 巻 38
2. 論文標題 An Outbreak of Food Poisoning Caused by Enteroaggregative Escherichia coli O15 : H1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本食品微生物学会誌	6. 最初と最後の頁 153 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5803/jsfm.38.153	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 -

1. 著者名 Sasaki Yoshimasa, Kakizawa Hiromi, Baba Youichi, Ito Takeshi, Haremaki Yukari, Yonemichi Masaru, Ikeda Tetsuya, Kuroda Makoto, Ohya Kenji, Hara-Kudo Yukiko, Asai Tetsuo, Asakura Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Antimicrobial Resistance in Salmonella Isolated from Food Workers and Chicken Products in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1541 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10121541	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 -

1. 著者名 Modupe Sawyerr Louisa, Yaa Ntiamao-Baidu, Henaku Owusu Erasmus, Ohya Kenji, Masato Suzuki, Opere Odoi Justice, Baboreka Kayang Boniface	4. 巻 15
2. 論文標題 Protected but not from Contamination: Antimicrobial Resistance Profiles of Bacteria from Birds in a Ghanaian Forest Protected Area	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Health Insights	6. 最初と最後の頁 7.86302E+14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/11786302211017687	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 -

1. 著者名 Yossapol Montira, Yamamoto Miku, Sugiyama Michiyo, Odoi Justice Opere, Omatsu Tsutomu, Mizutani Tetsuya, Ohya Kenji, Asai Tetsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Association between the blaCTX-M-14-harboring Escherichia coli Isolated from Weasels and Domestic Animals Reared on a University Campus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 432 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10040432	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenji Ohya, Christine Dale Ajero, Yo Sugawara, Koji Yahara, Katsuhiko Hayashi, Norikazu Kitamura, Motoyuki Sugai, Yukiko Hara-Kudo, Kanako Ishihara
2. 発表標題 Surveillance of Salmonella, Campylobacter and antimicrobial resistant Enterobacteriaceae in retailed chicken meat in Japan.
3. 学会等名 The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大屋賢司、廣瀬昌平、西角光平、大西貴弘、李謙一、伊豫田淳、窪村亜希子、明田幸宏、水上克己、鈴木富勝、瀧波賢治、高橋祐次、桑形麻樹子、北嶋聡、工藤由起子
2. 発表標題 富山市の大規模食中毒事例の原因食品から分離された非定型大腸菌OUT (OgGp9):H18の病原性解析
3. 学会等名 第167回 日本獣医学会学会集會
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大屋 賢司、Ajero Christine、菅原 庸、矢原 耕史、北村 徳一、林 克彦、菅井 基行、工藤 由起子、石原 加奈子
2. 発表標題 市販国産鶏肉におけるサルモネラ属及びカンピロバクター検出状況と薬剤耐性
3. 学会等名 第45回日本食品微生物学会学会総會
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大屋賢司、工藤由起子
2. 発表標題 富山市の学校給食を原因とする大規模食中毒事例の病因物質調査
3. 学会等名 第45回日本食品微生物学会学会総會（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林克彦, 芦田龍太, 森田雄二, 大屋賢司, 工藤由起子
2. 発表標題 日本薬局方無菌試験法の培地による微生物検出の検証
3. 学会等名 第60回全国衛生科学技術協議会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大屋賢司, 林克彦, 工藤由起子
2. 発表標題 買取による製剤の無菌試験実施並びに市販の無菌試験用培地における試験用菌株の増殖性の確認
3. 学会等名 第60回全国衛生科学技術協議会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大屋賢司, 池内隼佑, 林谷秀樹, 吉富真理, 工藤由起子
2. 発表標題 輸入乾燥きくらげ由来サルモネラ属菌の血清型別及び汚染菌数測定
3. 学会等名 第43回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤由起子, 齋藤明美, 大屋賢司, 渡辺麻衣子, 吉富真理, 土屋禎
2. 発表標題 サルモネラ汚染乾燥きくらげによる食中毒発生防止のための加熱条件の検討
3. 学会等名 第118回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木優希、谷本佳彦、陳彦霖、中村寛海、大屋賢司、西川禎一、和田崇之
2. 発表標題 astA保有大腸菌におけるF4相同性接着因子の検出
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------