

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870873

研究課題名(和文)原因不明食中毒の原因物質としての新規病原細菌の解析

研究課題名(英文) Analysis of new pathogenic bacteria as a cause substance of unknown food-borne infectious disease

研究代表者

石原 朋子 (ISHIHARA, Tomoko)

国立感染症研究所・細菌第一部・客員研究員

研究者番号：30450555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：既知の病原因子が検出されない、もしくは従来の分離同定法で検出できないために、原因不明として報告された食中毒について、推定原因物質となった4種類の新規病原細菌の解析を実施した。これら4種類の細菌は培養細胞レベルにおける感染様式に類似性は見られず、ゲノム解析によって近縁関係にある可能性が低いことが示唆された。また、既知の食中毒由来細菌とは異なるメカニズムで病原性を発揮する可能性が考えられた。これらの知見は、原因不明の食中毒の解明および検査法・予防対策のための科学的基盤の構築に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 4 kinds of new pathogenic bacteria as a cause substance of unknown food-borne infectious disease. These 4 kinds of new pathogenic bacteria did not have any virulence factor for well-known food-borne infectious disease or could not be confirmed by a conventional identification test. In culture cell level, these 4 kinds of bacteria did not have the similarity of the mode of infection. Genomic analysis suggested a possibility that a close relation of these bacteria is low. These bacteria may cause the disease by a mechanism different from known pathogenic bacteria of food-borne infectious disease. These results would contribute to investigation to determine the cause of food-borne infectious disease and to prevention of their disease.

研究分野：細菌学

キーワード：食中毒 細菌

## 1. 研究開始当初の背景

### 背景および研究動向

近年、毎年100件前後の原因不明の食中毒が報告されている。これらの食中毒は、既知の原因物質が検出されない、または検出された原因物質による症状が当該食中毒症状と異なるなどの理由から原因が不明のままとなっている。日本における食中毒は1952年から統計が取られるようになり、現在までに様々な原因物質の特定が行われてきた経緯がある。原因物質には、大きく分けて化学物質、自然毒、病原体がある。その中でも、病原体が占める割合は大きく、食中毒原因病原体を特定することによって、多くの治療法・予防対策が確立されてきた。現在、ゲノム解析の進歩によって、一部の原因不明の食中毒については、次世代シーケンサを用いたメタゲノム解析により原因となる病原体の推測が可能となりつつある。もっとも最近では、ヒラメ喫食による原因不明食中毒等において、ヒラメサンプルのイルミナ網羅解読による病原体候補検索の結果、新種の寄生虫クドア・セプテンブククターが推測され、その後の病原性解析等によって原因物質であることが判明している( )。これまで、クドア属粘液胞子虫はヒトに寄生しないために公衆衛生的には無害とされてきたのだが、培養細胞・実験動物等を用いた毒性評価により、嘔吐・下痢毒性を有することが分かった。さらには、検査法・予防対策の確立にまで至っており、クドア・セプテンブククターを原因とする食中毒の発生予防に効果が出始めている。

我々はこれまでに、病原大腸菌をはじめとする様々な食中毒原因細菌について菌株の解析を行ってきた。特に、腸管出血性大腸菌、腸管病原性大腸菌、赤痢菌、サルモネラ属菌などについては、病原因子の同定と機能解析、病原性の分子生物学的解析、遺伝学的疫学解析、共同研究によるゲノム解析等を行い、検査および治療、予防対策に応用しているところである。我々の所属機関には国内で発生した食中毒関連株の多くが送付されることから、2011年5月にドイツを中心として発生した大腸菌0104:H4による大規模なアウトブレイクにおいては、日本での発生を監視する目的で、国内の大腸菌0104:H4の分離状況の把握と病原因子遺伝子の有無を調べた。この大腸菌0104:H4は腸管出血性大腸菌と腸管凝集性大腸菌のハイブリッドタイプであり、両者が保有する病原因子を併せ持つ大腸菌であったため、両病原因子の遺伝子を調べることが必要であった( )。幸いにも日本への上陸はなかったが、この調査の過程で過去には日本においても同様なハイブリッドタイプの大腸菌が分離されていたことが明らかとなった。大腸菌0104:H4はいわゆる新規の病原細菌ではあったが、2種類の既知の病原大腸菌のハイブリッドであったため、比較的早期に対策が取られたと言える。しかしながら、

もし未知の病原因子を保有する新規病原細菌が出現しているとしていたら、我々にはそれを原因とする食中毒に対する早期対応は不可能である。現在報告されている原因不明の食中毒には、このような新規病原細菌が原因となっているケースが存在すると考えられる。実際、国内で発生した2件の原因不明食中毒について、メタゲノム解析により病原体候補検索を行った結果、既知の病原因子を保有しない大腸菌およびシトロバクターがそれぞれの事例の原因となっていることが推測された。行政的にはこれら2種の細菌が食中毒の推定原因細菌であることが報告されたが、病原性については評価されていない。このような食中毒の推定原因細菌については、今後の対策のためにも、クドア・セプテンブククターの解析と同様に、病原性の評価を行った後、新規病原細菌として詳細な解析が必要であると考えられる。

先述のメタゲノム解析により食中毒原因細菌と推定された大腸菌とシトロバクターについてゲノム情報を解析した結果、既知の病原因子を確認することはできなかったが、(ヒトのみならず動物、植物全般の)病原細菌に広く分布しているIII、IV、VI型分泌機構関連タンパク質をコードする遺伝子と一部類似する遺伝子配列の存在を認めた。これらの分泌機構は、菌体表層に突出した分泌装置とそれを介して菌体外へ分泌される特定の分泌タンパク質の総称であり、病原性の発揮に必須である。我々が確認できた類似配列は非常に限られた範囲であること、もしくは遺伝子の相同性が著しく低いことから、現在報告されているIII、IV、VI型分泌機構関連タンパク質として分類されるか検証が必要である。我々はこれまでに、腸管病原性大腸菌、赤痢菌、サルモネラ属菌のIII型分泌機構の機能解析を行い、感染メカニズム、病原性発揮に至るメカニズムを検証してきた。実験的には、分泌装置について構成タンパク質をコードする遺伝子の同定や電子顕微鏡による装置本体の証明、各々の分泌タンパク質の宿主への作用機序ならびにタンパク質の発現機構について培養細胞、実験動物を用いて解析している。同様の手法を用いて新規病原因子の解析を進めることは十分可能であり、新たな分泌機構の発見につながる可能性もある。メタゲノム解析により推定された新規病原細菌はすでに大部分のゲノム情報が得られていることから、III、IV、VI型分泌機構関連タンパク質以外にも病原因子の候補となり得る遺伝子配列の詳細な検索が行える。病原性の評価とゲノム情報の利用、この両者を並行して行うことにより新規病原細菌の解析は飛躍的に進むと考えられる。また、ここで得られる解析結果は、原因不明食中毒の他の事例においてすぐに確認することができる。例えば、病原因子のうち1つでも特定することができれば、菌種の同定を行った後、即座にPCR等による遺伝子保

有の有無が確認可能である。さらに、嘔吐・下痢に関連する細胞毒性および細胞付着・侵入など感染様式が同じであることが確認できれば、新規病原細菌として特定することができ、検査法・治療・予防対策の確立が進められるだろう。

## 2. 研究の目的

現在、原因不明として報告される食中毒の推定原因細菌は、既知の原因因子が検出されない、または検出された細菌による症状が当該食中毒症状と異なるなどの理由から病原細菌としては特定されない。一部の原因不明食中毒については、メタゲノム解析により従来の分離同定法で検出できない原因細菌が推測できるが、病原性評価および病原因子の同定・解析にまで至る事例は少ない。そこで、メタゲノム解析等により推定された原因細菌について、病原性の評価を行うことによって新規の病原細菌として位置づけ、病原因子の同定・解析、新規病原細菌感染メカニズムの解明および検査法・予防対策に向けた基盤的情報を整備することを目的とした。

## 3. 研究の方法

推定原因細菌について病原性の評価、評価方法の確立、ゲノム解析を実施した。

1) 病原性の評価：メタゲノム解析および従来の分離同定法で推定された原因不明食中毒の原因細菌について、実際に病原性を保有するか検証するため、病原性の評価を行う。臨床症状として食中毒を引き起こすことから、宿主細胞に何らかの影響を与えることが推測された。したがって、ヒト由来の培養細胞を用いて感染実験を行い、原因細菌の細胞毒性および細胞付着・侵入性を検討した。細胞毒性の評価としては、感染細胞の細胞死および形態異常が認められるか調べた。細胞毒素の保有・分泌については、菌培養上清および菌体内物質をヒト由来培養上皮細胞各種に添加し影響を調べることにより確認を行った。培養上清中の細胞毒素の分泌が認められない場合においては、腸管上皮細胞に対する付着・侵入を行う過程あるいはその後の増殖によって、腸管上皮細胞を死に至らしめる可能性が考えられる。したがって、ヒト由来培養細胞各種に推定原因細菌を感染させ、細胞付着・侵入性などの感染様式を調べることとした。病原性評価方法の確立については、上記2つの評価から、病原性評価に適した評価を選択し、その評価方法を最適化した。

2) ゲノム解析：メタゲノム解析により推定された原因細菌については大部分のゲノム情報が得られているが、既知の病原因子は認められない。既知の病原因子の遺伝子配列との類似性が低い可能性もあるため、部分的な類似配列も探索の対象とした。ゲノム情報がないものについては、ゲノム解析を行い、病原因子の探索を行った。

## 4. 研究成果

本研究には、原因不明食中毒事例由来 *E. coli* 4 株 (*E. coli* 0146 (2011)、*E. coli* 078 (2012)、*E. coli* 08 (2014)、*E. coli* OUT (2015)) を用いた。

1) 病原性の評価：推定原因細菌は宿主細胞に何らかの影響を与えることが推測されることから、まず始めにヒト由来の培養上皮細胞を用いて感染実験を行い、原因細菌の細胞毒性および細胞付着・侵入性を評価した。その結果、これらの原因細菌はこれらの原因細菌は既知の病原性大腸菌で確認されるような特徴的な付着様式 (localized adhesion、localized adherence、microcolony formation) は認められないが、細胞付着・侵入能を有しない非病原性の大腸菌に比較すると有意に細胞付着することが認められた (図1)。一方、有意な感染細胞の細胞死および形態異常を認めず、実施した実験条件においては細胞毒性を認めなかった (図1)。

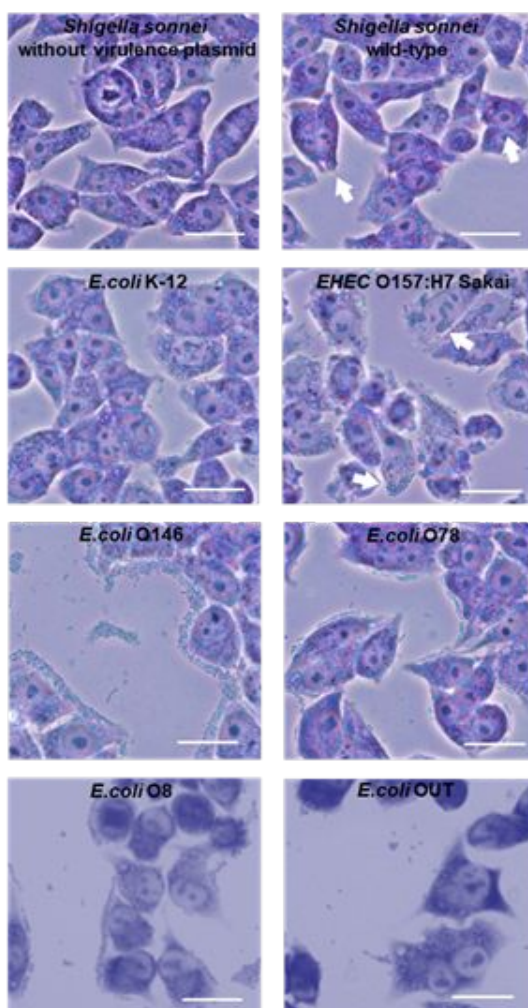


図1 *E. coli* 0146 (2011)、*E. coli* 078 (2012)、*E. coli* 08 (2014)、*E. coli* OUT (2015) を HEp-2 細胞に 2 時間 40 分感染させた後、ギムザ染色した。Bars=25 μm

2) ゲノム解析：これら大腸菌 4 株について、MiSeq、HiSeq、PacBio にてゲノム情報を取得した。既知の病原性大腸菌 (EHEC、EPEC、EAEC、

UPEC、ExPEC)ならびに推定病原大腸菌間における近縁関係を明らかにするため、既知の病原性大腸菌のゲノム情報と共に SNP 解析を行い、得られた SNPs 情報を元に UPGMA 法によるクラスター解析を行った。その結果、推定病原細菌間における SNP は 40,000SNPs 以上あり、近縁関係が低い可能性が示唆された。また、これらの大腸菌は2つの大きなクラスターに分けられ、本研究における新規の推定病原細菌は同一クラスターに属した。新規の推定病原細菌は EPEC、UPEC、ExPEC 等が多く存在するクラスターに属し、ほとんどの EHEC および EAEC が存在するクラスターとは異なることが明らかとなった。また、CLC を用いて ORF 予測および BLAST 解析を実施し、新規の推定病原大腸菌間の比較解析を実施した。しかしながら、現在のところ、既知のならびに新規の病原因子は確認されなかった。原因不明食中毒の推定原因細菌について、病原性の評価ならびにゲノムレベルにおけるクラスター解析によって各推定原因大腸菌の新規病原細菌としての位置づけを行うことができた。

原因不明食中毒の推定原因細菌について、病原性の評価ならびにゲノムレベルにおけるクラスター解析によって各推定原因大腸菌の新規病原細菌としての位置づけを行うことができた。解析を実施した4種類の新規病原細菌はいずれも食中毒の推定原因物質となった可能性が高かったが、培養細胞レベルにおける感染様式に類似性は見られず、ゲノム解析によって近縁関係にある可能性が低いことが示唆された。これらの知見は、新規病原細菌の感染メカニズムの解明および検査法・予防対策のための科学的基盤の構築に寄与することが期待される。

#### <引用文献>

- Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin Infect Dis*. 54:1046-52. 2012
- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G; HUS Investigation Team. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 365:1771-80. 2011

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Tomoko Morita-Ishihara, Sunao Iyoda, Atsushi Iguchi, Makoto Ohnishi, Secondary Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection, Japan, 2010-2012, *Emerging Infectious Diseases*, 査読有, Vol. 22, 2016, pp. 2181-2184, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5189154/pdf/16-0783.pdf>

〔学会発表〕(計7件)

石原朋子、健常者糞便由来の腸管出血性大腸菌についての解析、第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2014年

石原朋子、日本における健常者由来の腸管出血性大腸菌の解析、第88回日本細菌学会、2015年

石原朋子、O157、O26、O111以外の腸管出血性大腸菌2014年分離株におけるPFGE解析、第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2015年

Tomoko Morita-Ishihara, Potential risk of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) infection: investigation of STEC isolates from asymptomatic carrier in Japan, VTEC 2015 The 9th Triennial International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* Infections, 2015

石原朋子、Trend of enterohemorrhagic *E. coli* O146 in Japan、第89回日本細菌学会、2016年

石原朋子、2015年のNon-O157/O26/O111腸管出血性大腸菌における分子疫学解析、第37回日本食品微生物学会学術総会、2016年

石原朋子、2015-2016年EHEC広域PFGE型の発生動向、第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-bac1.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石原 朋子 (ISHIHARA, Tomoko)  
国立感染症研究所・細菌第一部・客員研究員  
研究者番号：30450555

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

勢戸 和子 (SETO, Kazuko)