

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18439

研究課題名（和文）全ゲノム情報を活用したOutbreak関連大腸菌の下痢原性の解明

研究課題名（英文）Investigation of virulence factors based on whole genome data in Escherichia coli associated with foodborne disease outbreaks

研究代表者

原田 哲也 (Harada, Tetsuya)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：70516723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Outbreak関連大腸菌0166:H15の下痢原性を明らかにするため、全ゲノム情報を基に分子疫学解析を実施し、病原因子を調査した。集発患者由来5株、散发患者由来2株、保菌者由来2株のMLSTの結果、保菌者由来の1株以外はST349とその近縁に型別された。さらに、コアゲノム解析で、これら8株は単一系統群に属した。集発患者由来4株に共通する病原因子として、EAST1遺伝子とdispersinタンパク遺伝子が同定された。培養沈渣懸濁液を用いた乳のみマウス試験で軽度の腸管内液体貯留活性を示す株や、細胞付着性試験でHeLa細胞に対してdiffuse adherenceが観察された株が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の原因不明食中毒事例に共通して分離されるOutbreak関連大腸菌0166:H15について、供試株5株が異なるクローンでありながら単一系統群に属することが示された。本成果は、共通する病原因子の存在を示唆する可能性が高く、その公衆衛生的意義は高い。また、2016年から2019年にも本菌が分離される集団食中毒事例が相次いで報告され、報道発表により社会的注目を集めた大規模事例もみられた。それゆえ、本菌への関心度は今後ますます高まることが予想されることから、本成果を基礎データとして病原性の解明が進むことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the virulence factors in Escherichia coli 0166:H15 isolates from diarrhea patients in several foodborne outbreaks, whole genome analyses, suckling mouse assays, bacterial adherence assays, and contact-dependent hemolytic activity tests were performed with 5, 2, and 2 isolates from 5 outbreak patients, 2 sporadic patients, and 2 asymptomatic carriers, respectively. Multilocus sequence typing revealed that the 8 isolates, except for one from an asymptomatic carrier, belonged to ST349 and a single locus variant of ST349. Core genome single nucleotide polymorphism-based analyses showed that the 8 isolates belonged to a single group. The four isolates from outbreak patients were positive for enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 gene and dispersin protein genes. In suckling mouse assays with a culture pellet of an outbreak isolate, fluid accumulation was observed. Additionally, several isolates from outbreak patients showed diffuse adherence to HeLa cells.

研究分野：食品微生物

キーワード：Outbreak関連大腸菌 食中毒 下痢原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

毎年、全国で発生する 1000 件前後の食中毒のうち数十件は既知の病因物質が特定されず、原因不明として報告されている。また、行政対応から除外される有症苦情相談処理件数に至っては大阪府内だけで年間 300 ~ 700 件程度発生し、その多くは原因不明であることから、毎年国内で発生している原因不明事例は相当数にのぼると予測される。

これらには、複数の患者から同一性状を示す特定の血清型の大腸菌(以下、Outbreak 関連大腸菌)が分離され原因物質として推測されるものの、病原性や病原因子が不明あるいは不確定のため、原因不明とされる事例が含まれる。

2. 研究の目的

本研究では Outbreak 関連大腸菌である *Escherichia coli* O166:H15 について、全ゲノム情報を基に分子疫学解析を実施するとともに、下痢原性に関与する病原因子を多角的に検証し、下痢発症機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 供試株

1996 年から 2013 年に大阪府で発生した 4 事例 4 株(菌株番号 Hb15、Hb18、Hb19、Hb26) および 2017 年に他県で発生した 1 事例 1 株(Hb107)の患者由来 *E. coli* O166:H15 を Outbreak 関連大腸菌として供試した。また、2 事例の散発事例患者由来株 2 株(Hb22、Hb23) および健康保菌者由来 2 株(Hb30、Hb31) も供試株とした。非病原菌株として *E. coli* TOP10 (Invitrogen) を陰性コントロール株として用いた。

細胞付着性試験およびコンタクトヘモライシス試験の陽性コントロール株として、当所で保存している散発下痢症患者由来の腸管凝集性大腸菌 18H281 および *Shigella flexneri* 2a 18H68 をそれぞれ用いた。さらに細胞付着性試験では、参考株として食品由来大腸菌株も供試した(文献 1)。

(2) パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析

供試株間の遺伝的関連性を明らかとするため PFGE 解析を実施した。国立感染症研究所標準プロトコールに準じ、制限酵素 XbaI (ニッポンジーン)を用いた。サイズマーカー株として *Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard strain を使用した。

(3) 全ゲノム解析

すべての供試株について、イルミナ社 Miseq プラットホームを用いて全ゲノム解析を実施した。データ解析は国立感染症研究所が提供するデータベース Genepid-J を用いた。得られたアセシブルデータは、DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST)にてアノテーションを実施し、in silico Molecular Cloning ソフトウェアを用いて比較ゲノム解析を行った。さらに、コアゲノム解析、下痢原性大腸菌病原遺伝子検索、系統関連遺伝子の比較は Arimizu らの方法(文献 2)に準じた。

(4) 乳のみマウス試験

Outbreak 関連大腸菌 O166 : H15 の下痢原性を明らかとするため、生後 4-5 日齢の ddY マウスに以下の方法で調整した培養上清液、超音波破砕液、培養沈査懸濁液 100 μ l を経胃投与し、3、4 あるいは 5 時間後に腸管腫脹の観察ならびに腸管内の液体貯留比 (FA 比) を測定した。

培養上清液

供試株をトリブチケースソイブロス (TSB ; 日本 BD) に接種し、37 $^{\circ}$ C、18 時間、110rpm で振とう培養した。培養液を 3000rpm で 20 分間遠心し、培養上清の 0.45 μ m シリンジフィルターろ液を培養上清液とした。

超音波破砕液

供試株をトリブチソイケース寒天培地にて 36 $^{\circ}$ C 一晚培養後、10 μ l エーゼでスワイプし 1.5ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁した(菌数は概ね 10 の 10 乗/ml)。懸濁液に共振棒をセットし超音波破砕装置で 10 分間処理し、その処理液の 0.45 μ m シリンジフィルターろ液を超音波破砕液とした。

培養沈査懸濁液

供試株を TSB にて 36 $^{\circ}$ C 一晚静置培養後、培養液 1ml を 5000rpm で 5 分間遠心し、その沈査を 1ml の PBS に懸濁したものを培養沈査懸濁液(菌数は概ね 10 の 9 乗/ml)とした。

(5) 細胞付着性試験

培養細胞への付着性試験は Tsukamoto らの方法(文献 3)を一部変更して実施した。HeLa 細胞、Hep-2 細胞、Caco-2 細胞、T84 細胞をそれぞれプラスチック製チャンバースライド(8 チャンバー ; LAB-TEK)で 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下で培養し、ほぼ単層とした。PBS にて 3 回洗浄後、各チャンバーに 400 μ l の 10%牛胎児血清添加ダルベッコ変法イーグル培地を加えた。これに各供試株の TSB 一晚静置培養液 20 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分、5% CO₂ 存在下で培養した。その後、PBS にて 3 回洗浄後、ギムザ染色を行い観察した。

(6) コンタクトヘモライシス試験 (簡易法)

Outbreak 関連大腸菌の溶血性を評価するため、緬羊、馬、牛、兔脱繊維血液および鶏保存血液を用いてコンタクトヘモライシス試験 (簡易法) を以下の方法で実施した。供試株をブレインハートインフュージョンブロス (BHI) にて 36 一晚静置培養し、培養液 10 μ l を 1ml の BHI を分取したマイクロチューブ 2 本にそれぞれ接種した。36 で 3 時間静置培養後、室温 3000rpm で 10 分間遠心し、それぞれの沈査を 50 μ l の PBS に懸濁してヘモライシス試験に用いた。各血液は 1 検体当たり 100 μ l を準備し、PBS にて 1 回洗浄後、等量の PBS で懸濁し、血球液とした。各供試株について 2 本のマイクロチューブにそれぞれ 50 μ l の血球液を加え、1 本は室温 4500rpm で 15 分間遠心後 37 で培養し、他方はそのまま 37 で培養した。2 時間後目視にて溶血を確認した。

(7) 腸管凝集性大腸菌耐熱性エンテロトキシン heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) および IS1414 transposase 遺伝子の配列比較

5 事例中 4 事例に由来する Outbreak 関連大腸菌 O166:H15 が保有する EAST1 遺伝子 (*astA*) ならびに本遺伝子とオーバーラップする IS1414 transposase 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を BioEdit software を用いて比較した。なお、GenBank accession no. AF143819 をリファレンス配列として用いた。

(8) EAST1 および IS1414 transposase 遺伝子発現解析のためのリアルタイム PCR 法の確立

AF143819 をリファレンス配列として、Primer3 および IDT OligoAnalyzer tool を用いてプライマーを設計した。設計プライマーについては、インターカレーター法によるリアルタイム PCR を 95 30 秒 (95 5 秒 60 30 秒) \times 35 サイクルの条件で実施し、特異的増幅を確認した。さらに、供試株のアルカリ抽出テンプレートの 10 倍段階希釈液を用いて検量線を作成し、増幅効率を評価した。また、リファレンス遺伝子の候補として、*cysG*、*rrsA*、*hcaT*、*idnT*、*tus* についても同様にプライマーを設計し、評価した。

4. 研究成果

(1) PFGE バンドパターン

供試株の PFGE バンドパターンを図 1 に示す。それぞれのレーンは異なるパターンを示すことから、各供試株の遺伝的関連性は低いと考えられた。

(2) 全ゲノム情報に基づく Multilocus sequence typing (MLST) およびコアゲノム解析

供試株のうち Outbreak 関連大腸菌 4 株 (Hb15、Hb18、Hb26、Hb107)、散発事例患者由来株 2 株 (Hb22、Hb23) および健康保菌者由来株 1 株 (Hb30) は ST349 であった。また、残りの Outbreak 関連大腸菌 Hb19 は、ST349 の Single locus variant である ST2914 であった。一方、健康保菌者由来株 Hb31 は、ST70 に型別された。また、3811 のコア遺伝子上の 45753 SNPs について系統解析を実施したところ、健康保菌者由来株 Hb31 を除くすべての株は、単一系統群と推定された (図 2)。

(3) 下痢原性大腸菌病原因子検索および系統関連遺伝子比較

Genepid-J による下痢原性大腸菌病原因子検索の結果、Outbreak 関連大腸菌 5 株のうち Hb26 を除く 4 株に共通する病原因子として、EAST1 遺伝子 (*astA*) と dispersin タンパク遺伝子が同定された。また、in silico Molecular Cloning ソフトウェアによる比較ゲノム解析の結果、この 4 株では III 型あるいは IV 型分泌装置に関連する遺伝子 (*ysaH* および *pilQ*) が同定された。さらに、コアゲノムによる系統解析結果に基づき、Hb31 とそれ以外の供試株について Gene presence/absence 解析を実施したところ、128 の ORF が同定された。

(4) 乳のみマウス試験

すべての乳のみマウス試験において、毒素原性大腸菌耐熱性エンテロトキシンの陽性判定基準として用いられる FA 比 > 0.083 を示す供試株は認められなかった (文献 4)。
Outbreak 関連大腸菌について各供試株の培養上清液を乳のみマウス 6 匹に投与し 4 時間後の液体貯留活性を測定したところ、Hb15 は 0.0557 ± 0.0027 (平均値 \pm 標準偏差)、Hb18 は 0.0565 ± 0.0020 、Hb19 は 0.0546 ± 0.0016 、Hb26 は 0.0562 ± 0.0020 、Hb107 は 0.0599 ± 0.0053 で、陰性コントロール株 0.0599 ± 0.0053 あるいは 0.0555 ± 0.0016 と比較し、有意差は認められなかった。
また、各供試株の超音波破砕液を乳のみマウス 6 匹に投与し 5 時間後の液体貯留活性を測定したところ、Hb15 は 0.0583 ± 0.0038 、Hb18 は 0.0594 ± 0.0058 、Hb19 は 0.0633 ± 0.0050 、Hb26 は 0.0592 ± 0.0068 、Hb107 は 0.0576 ± 0.0040 で、陰性コントロール 0.0613 ± 0.0047 あるいは 0.0614 ± 0.0045 と比較し、有意差は認められなかった。
さらに、培養沈渣懸濁液を乳のみマウス 6 匹に投与し 3 時間後の液体貯留活性を測定した。陰性コントロール株 (0.05575 ± 0.0015) と比較したところ、Hb15 は 0.0576 ± 0.0008 で有意な

差が確認された ($P<0.05$)。一方、その他の供試株では有意差は認められなかったことから、試料の投与から腸管重量測定までの時間、投与菌数についてさらなる条件検討が必要であると考えられた。

(5) 細胞付着性試験

今回実施した細胞付着性試験では、Hb107を除く Outbreak 関連大腸菌の4株を用いた。Hep-2細胞および T84 細胞では、Outbreak 関連大腸菌の付着は観察されなかった。一方、HeLa 細胞では Hb15、Hb18、Hb26 で diffuse adherence が確認された (図3)。また、Caco-2 細胞でも、Outbreak 関連大腸菌の4株で軽度の diffuse adherence が確認された。しかしながら、参考株として用いた食品由来大腸菌株でも複数の株で同程度の diffuse adherence が確認されたことから、病原性との関連については、精査が必要と考えられた。

(6) コンタクトヘモライシス試験

ゲノム解析の結果、Outbreak 関連大腸菌の4株で分泌装置に関連する遺伝子の存在が明らかとなったため、コンタクトヘモライシス試験を実施した。いずれの畜種の血球液を用いた場合も遠心の有無にかかわらず、すべての供試株で溶血反応は確認されなかった。なお、遠心後のチューブにおいて陽性コントロール 18H68 はすべての赤血球で溶血反応を示した。

(7) EAST1 および IS1414 transposase 遺伝子配列の比較

Hb26を除く Outbreak 関連大腸菌4株の EAST1 および IS1414 transposase 遺伝子のアミノ酸配列比較を実施した。レファレンス配列と比較した結果、EAST1 は97から100%相同で、IS1414 transposase は、96から98%の相同性であった (図4)。また、Hb15の IS1414 transposase では終止コドンの出現により、不完全長であることが示された。

(8) EAST1 および IS1414 transposase 遺伝子発現解析を目的としたリアルタイム PCR 法の確立

今回の検討では、Outbreak 関連大腸菌 O166:H15 について新規の病原因子は同定されず、既知の EAST1 遺伝子と dispersin タンパク遺伝子のみが同定された。患者由来株では EAST1 遺伝子とオーバーラップする IS1414 transposase も高度に保持されていることから、EAST1 および IS1414 transposase 遺伝子発現解析のため、インターカレーター法によるリアルタイム PCR 法を確立した。

EAST1 および IS1414 transposase 遺伝子を標的とした forward プライマーは、それぞれ astA-823F (5'-CCC GCATCCAGTTATGCATC-3') と AF143819astA_788F (5'-GCTTCGTGTCATGGAAGGAC-3') とし、reverse プライマーは astAR (5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3') を用いた (文献5)。また、対照とするハウスキーピング遺伝子 (*rrsA*、*hcaT*、*idnT*、*tus*、*cysG*) については、*rrsA*-123F (5'-TCTGGGAACTGCCTGATG-3') および *rrsA*-198R (5'-CTTTGGTCTTGCACGTTATG-3')、*hcaT*-28F (5'-GCGCTCGGCTATTTACATAC-3') および *hcaT*-135R (5'-CAATAACAGGCCGATGGTTTC-3')、*idnT*-28F (5'-GTCGCGCTGCTTCTTATCC-3') および *idnT*-102R (5'-GACGGCAGCTACCAGAAC-3')、*tus*-82F (5'-CTTGAGCAACACAAGCTATTGG-3') および *tus*-157R (5'-GCGGATTATGCTCATCCTCT-3')、*cysG*-123F (5'-TGCATTAGCGTTTATTCCACAG-3') および *cysG*-222R (5'-CAGCAGGTGTGAGAAGG-3') をそれぞれのプライマーペアとした。Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (Takara) および SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) を用いて検量線を作成し、その傾きに基づいて増幅効率を算出したところ、EAST1 および IS1414 transposase 遺伝子については、それぞれ 100.9% および 101.3% となり定量性の高い検出系が確立された。また、*rrsA*、*hcaT*、*idnT*、*tus*、*cysG* については、それぞれの増幅効率は 100.9%、102.2%、97.6%、83.3%、100.1% となり、*tus* を除く4つのハウスキーピング遺伝子については、定量性の高いリアルタイム PCR 法が確立された。

引用文献

1. Harada et al., J Food Prot. 2018; 81:1450-1458.
2. Arimizu et al., Genome Res. 2019; 29:1495-1505.
3. Tsukamoto T, et al. Kansenshogaku Zasshi. 1995; PMID: 7751741
4. Giannella RA., Infect Immun. 1976; 14:95-9.
5. Yamamoto et al., FEMS Microbiol Lett. 1997; 147:89-95.

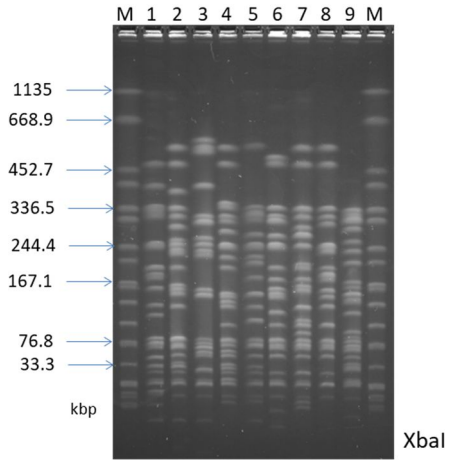


図1. PFGEバンドパターン
Lane 1; Hb15, 2; Hb18, 3; Hb19, 4; Hb26, 5; Hb107, 6; Hb22, 7; Hb23, 8; Hb30, 9; Hb31, M; サイズマーカー

Core genes: 3,811 (>90% identity)
Informative SNPs: 45,753

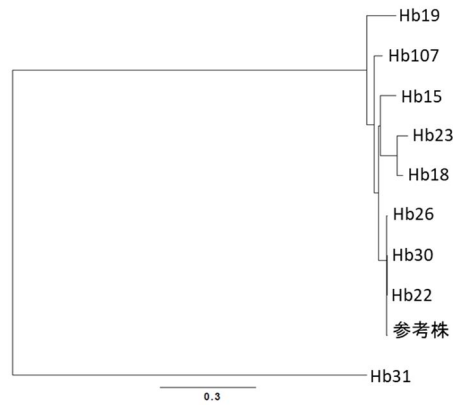


図2. コア遺伝子SNPsに基づく系統樹解析

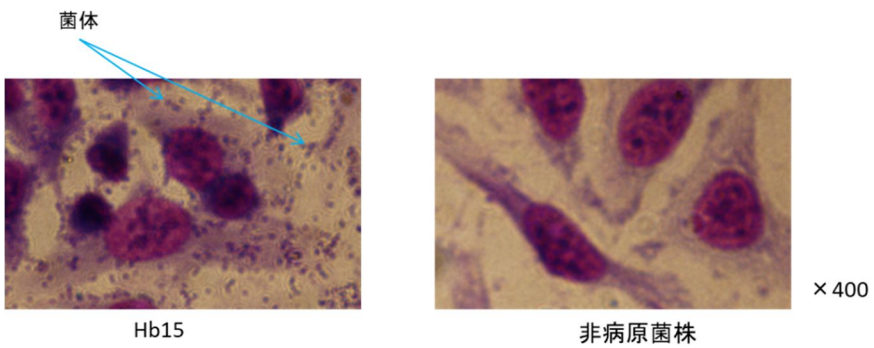


図3. 細胞付着性試験 (HeLa細胞)

(A)

AF143819.1:796-912	1	MPSTQYIRRPASSYASCIWCATACASCHGRITTKPSLAT*	39
Hb15astA	1G.....	39
Hb18astA	1	39
Hb19astA	1	39
Hb107astA	1	39

(B)

AF143819.1:81-1289	1	MDEKQLQQLANELAKNLRTPEDLSQFDRLLKLSVEAALNAEMTHHLGYEKNQSRFGANS	60
Hb15astA	1E.....	60
Hb18astA	1G.....	60
Hb19astA	1P.....	60
Hb107astA	1P.....	60
AF143819.1:81-1289	61	RNGYSTRTVITGDGPLELRTFDRDGTFFEQLVKKNQTRITGMNDQILSLYAKGTTREI	120
Hb15astA	61R.....	120
Hb18astA	61G.....	120
Hb19astA	61R.....	120
Hb107astA	61R.....	120
AF143819.1:81-1289	121	AAAFKELYDADVSPALISKVTDVMEQVVEWQNRFLDAVYPIVHLDCIVLKVQDSRVIN	180
Hb15astA	121E.....	180
Hb18astA	121G.....	180
Hb19astA	121G.....	180
Hb107astA	121G.....	180
AF143819.1:81-1289	181	KSVFLALGINIEGQKELLMWLAENEGAKFWLNVITELKNRGLNDLLACVDGLKGFDA	240
Hb15astA	181G.....	240
Hb18astA	181G.....	240
Hb19astA	181G.....	240
Hb107astA	181G.....	240
AF143819.1:81-1289	241	INTVYPAKRIQLCIVHMVNRSLRFVSWKDYKAVTRDLKAIYQAPTEAGQALEFAAAN	300
Hb15astA	241R.....	300
Hb18astA	241G.....	300
Hb19astA	241G.....	300
Hb107astA	241E.....	300
AF143819.1:81-1289	301	DSRYPQISRQWQANPNLATFFAYPTDIRKVIYTTNAIESLNSVIRHAIKKRVFTDDS	360
Hb15astA	301E.....	360
Hb18astA	301G.....	360
Hb19astA	301A.....	360
Hb107astA	301A.....	360
AF143819.1:81-1289	361	VKKVWLAIQASRRKWTMPLKDRMAMSRFIEFGDRLDGHF*	403
Hb15astA	361G.....	403
Hb18astA	361G.....	403
Hb19astA	361G.....	403
Hb107astA	361R.....	403

図4. EAST1 (A) およびIS1414 transposase (B) のアミノ酸配列

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 0件）

1. 著者名 HARADA TETSUYA, TAGUCHI MASUMI, KAWAHARA RYUJI, KANKI MASASHI, KAWATSU KENTARO	4. 巻 81
2. 論文標題 Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Pathogens in Ready-to-Eat Foods Retailed in Osaka Prefecture, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Food Protection	6. 最初と最後の頁 1450 ~ 1458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4315/0362-028X.JFP-18-035	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----