

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21527

研究課題名（和文）病原因子不明の下痢原因疑い大腸菌からの新型下痢原性大腸菌の同定

研究課題名（英文）Identification of novel pathotypes of diarrheal Escherichia coli by analyzing clinical isolates in which representative virulence genes for known pathotypes were not detected.

研究代表者

小椋 義俊（Ogura, Yoshitoshi）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40363585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、4都道府県の衛生研究所で過去に発生した病原因子不明大腸菌が原因と疑われる集団下痢症事例の13件について調査した。これらの事例で分離された大腸菌149株について、ゲノム配列を決定し、血清型、シーケンスタイピング、系統解析などを行った結果、7事例において大腸菌が集団下痢症の原因菌であったと推察された。各事例の株は、異なる血清型に分類され、一部の株では既知の病原因子と高い相同性を示す遺伝子も検出されたが、ヒトへの病原機構は解明されておらず、さらなる検討が必要である。今後は、健康保菌者由来の常在大腸菌とのゲノム比較や多くの事例を用いたより大規模な解析が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各都道府県では、年間数件から数十件程度、病原因子不明の大腸菌が原因と疑われる下痢症事例が発生している。集団発生で複数の患者から同一血清型の大腸菌が分離されるなど、原因菌として強く疑われる事例も少なくない。そのため、まだ知られていない新規の病原因子を保有する新型の病原性大腸菌が存在すると考えられる。原因菌の同定は、原因食材の特定や感染ルートの推定に必須であり、今後の感染防止対策にも重要な情報となる。本研究で得られる成果は、感染性下痢症の臨床検査や疫学調査などに大きく貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated 13 cases of diarrhea outbreaks suspected to be caused by Escherichia coli carrying unknown virulence factor that occurred in the past in four prefectures. As a result of determining the genome sequence, serotyping, sequence typing, and phylogenetic analysis of 149 E. coli strains isolated in these cases, E.coli was presumed to be the causative agent of the outbreak in 7 cases. The strains in each case were classified into different serotypes, and genes showing high homology to known virulence factors were also detected in some strains. In the future, it will be necessary to perform genome comparisons with commensal E. coli from healthy carriers and larger-scale analyzes using many cases.

研究分野：細菌学

キーワード：大腸菌 下痢症 ゲノム 疫学

1. 研究開始当初の背景

保健所や衛生研究所における下痢症事例の一般細菌検査では、患者の便からキャンピロバクター、サルモネラ、赤痢菌、ビブリオ、エルシニア、大腸菌、ブドウ球菌、セレウス菌、ウエルシュ菌、ノロウイルス、クドアなどの分離や検出が行われる。このうち、大腸菌以外の微生物については、腸内の常在菌でないため、分離や検出がされた時点で下痢症の原因菌として確定される。しかし、大腸菌に関しては腸内の常在菌でもあるため、その分離だけでは不十分であり、各病原型の下痢原性大腸菌マーカー遺伝子の検出が必要となる。下痢原性大腸菌は、6つの病原型に分類されており、保持する病原因子や起こす症状が異なっている(表1)。下痢症患者から大腸菌が分離された際は、表1

に示したマーカー遺伝子の検出が行われ、病原型の決定により、下痢の原因菌として確定診断される。しかし、いずれのマーカー遺伝子も検出さ

病原型	主な病原因子(マーカー遺伝子)	主な症状
志賀毒素産生性大腸菌(STEC)	志賀毒素(<i>stx1</i> , <i>stx2</i>)、3型分泌装置(<i>eae</i>)	出血性大腸炎、HUS
腸管病原性大腸菌(EPEC)	3型分泌装置(<i>eae</i>)	乳幼児下痢症
腸管侵入性大腸菌(EIEC)	3型分泌装置(<i>invE</i>)	赤痢様疾患
腸管毒素原性大腸菌(ETEC)	易熱性エンテロトキシン(<i>elt1</i>) 耐熱性エンテロトキシン(<i>estA</i>)	コレラ様疾患
腸管凝集性大腸菌(EAEC)	AAF線毛(<i>aggR</i>)、耐熱性エンテロトキシン(<i>astA</i>)	サルモネラ様腸炎
分散接着性大腸菌(DAEC)	接着因子(<i>afaD</i>)	下痢症

れない場合は、原因菌としては確定できず、原因不明事例として処理される。このような事例は各地で度々報告されているが、感染源や感染ルートの特定制などの原因究明が困難となるため、公衆衛生上の問題となっている。検査対象外の微生物が原因であった可能性もあるが、分離された大腸菌がまだ知られていない新規の病原因子を保持する新型の下痢原性大腸菌であることも考えられる。事実、我々は、以前に4事例の集団下痢症事例から分離された病原因子不明大腸菌のゲノム解析を行ったところ、2事例について易熱性エンテロトキシン LT2 (遺伝子名: *elt2*) を保持する非典型的な ETEC が原因であったことを見出した。LT1 は ETEC の主要な病原因子であるため(表1)、病原性大腸菌マーカー遺伝子に含まれるが、LT2 はヒトへの病原性が未知であったため検査対象外である。また、LT1 と LT2 は 50%程度の相同性しかなく、LT1 検出プライマーで LT2 は検出できない。本事例は、LT2 産生大腸菌が原因となった初めての集団下痢症事例として論文報告した。しかし、他の2事例の分離株では、既知病原因子との相同性検索では病原因子を見つけることができなかつたため、全く新規の病原因子を持つ新規病原型の下痢原性大腸菌である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、集団下痢症から原因菌として分離されながらも病原因子が不明な大腸菌について、新規病原因子の同定を行うことを目的とする。各地衛生研究所から原因不明事例で分離された大腸菌を収集し、ゲノム解析を行うことで原因遺伝子の特定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 原因不明集団下痢症事例の調査と菌株の収集

国内4つの衛生研究所において、過去に集団下痢症の患者から原因菌として大腸菌が分離されながらも病原遺伝子が不検出のため原因不明となった事例を調査する。それらの事例から原因菌として分離された大腸菌を収集する。各株からゲノム DNA を抽出し、ライブラリーの調整と illumina MiSeq によるシーケンスを行う。

(2) 病原因子不明大腸菌のゲノム解析

ドラフト配列の取得と系統解析:リードデータをアセンブルし、遺伝子アノテーションを行う。パンゲノム解析でコア遺伝子を抽出して、コアゲノム系統樹を作成し、各菌株の系統的特徴を明らかにする。

病原遺伝子候補の抽出:病原因子データベース(VFDB)を用いて、各菌株に対して相同性検索を行い相同性のある遺伝子(アミノ酸配列で identity 30%程度の弱い相同性も含める)を抽出する。その際、動物や植物に対する病原因子も検索対象とする。

4. 研究成果

(1) 原因不明集団下痢症事例の調査と菌株の収集

4都道府県の衛生研究所で過去の原因不明下痢症事例の記録調査を行った。原因菌として大腸菌が分離されながら既知の病原因子が検出されなかった事例が合計13事例存在した。この内、7事例(No.1, 7, 8, 9, 11, 12, 13)については、多数の患者から同一O血清群を示す株が分離されており、原因菌として強く疑われた。しかし、事例No.1では、性状の異なる株が2株存在したため2株

を、No.7では他のO血清群株も含めた8株を各衛生研究所から収集した。その他の5事例では1株のみを収集している。また、残りの6事例では(事例No.2, 3, 4, 5, 6, 10)、分離株のほと

表2 解析対象とした原因不明集団下痢症事例

事例No.	分離年	患者数	分離株数	主な分離大腸菌のO血清群	シーケンス株数	シーケンス後のin silico血清型別
1	2003	不明	23	O26	2	O26:H32
2	2005	16	21	OUT	20	多数
3	2005	18	12	OUT	10	多数
4	2005	不明	30	OUT	30	多数
5	2005	不明	4	OUT	4	多数
6	2006	20~30	57	OUT	57	O81:H27
7	2006	146	27	O128	8	O128:H12
8	2006	不明	2	O148	1	O148:H30
9	2011	85	6	O146	1	O146:H28
10	2012	不明	15	OUT	13	多数
11	1996	92	12	O159	1	O159:H38
12	2003	67	14	O6	1	O6:H10
13	2003	162	39	O25	1	O25:H10

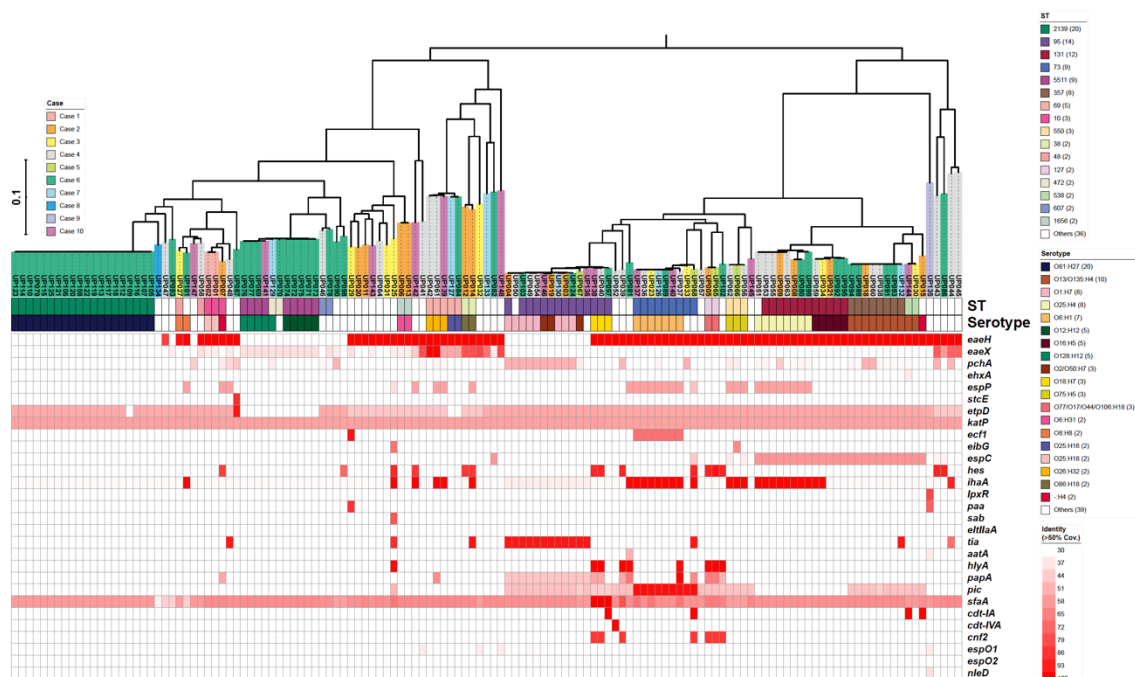
んどがO血清群型別不能(OUT)であったため、分離株すべてを収集した。合計で149株を収集し、ゲノムDNAを抽出後、イルミナシーケンサーで全ゲノムシーケンスを行った。

(2) 病原因子不明大腸菌のゲノム解析

まず、各株についてゲノムデータを用いてin silico血清型別を行った。抗血清を使った型別でO血清群が決定されていた株については、いずれも同一のO血清群が同定され、さらにそのすべてでH血清群も型別することができた(表2)。主な分離株のO血清群がOUTであった6事例のうち、事例No.6においては、シーケンスを行った57株中20株がO81:H27を示し、残りの株は多様な血清型に分類されたため、O81:H27がこの事例の原因菌株であったと推定された。しかし、その他の5事例(No.2, 3, 4, 5, 10)については、まとまって同じ血清型を示す株が存在せず、原因菌株は血清型からは推定できなかった。

下図に事例No.1~10の株について全ゲノム系統解析と既知病原因子との相同性検索を行った結果を示す(事例No.11~13については解析中)。事例No.1の株は、2株ともO26:H32の血清型でST10に分類された。既知の病原因子である*eaeH*(Putative attaching and effacing protein homolog)と高い相同性を示す遺伝子が検出された。事例No.2, 3, 4, 5, 10の株は、同一事例内の株でも異なるSTや系統群に分類されており、ほとんどが常在性の大腸菌と考えられたため、原因菌株の推定は困難であった。事例No.6の株では、O81:H27の20株がST2139に分類され、1つの系統群を形成したが、既知病原因子と高い相同性のある遺伝子は同定されなかった。また、

ST5591 に分類される株が 9 株存在していた。事例 No. 7 では、O128:H12 (UP129) 株が原因菌株と推定されるが、既知病原因子と相同性の高い遺伝子は存在しなかった。事例 No. 8 の株は単独の ST に分類され、既知病原因子は検出されなかった。事例 No. 9 の株は他の複数の事例の株とともに ST69 に分類され、*eaeh* と *ihaA* (adhesin) が検出された。



(3) 結果のまとめと今後の展望

本研究で解析した 13 事例の集団下痢症事例のうち、事例 No.1, 6, 7, 9, 11, 12, 13 大腸菌が原因の集団下痢症である可能性が高いと推察された。それぞれ O26:H32, O81:H27, O128:H12, O146:H28, O159:H38, O6:H10, O25:H10 の血清型に分類され、ST や系統樹上での位置も異なる大腸菌であった。既知の病原因子としては、*eaeh* と *ihaA* が一部の株で検出されたが、これらの病原因子のヒトへの病原性は解明されておらず、さらなる検討が必要である。今後は、今回の 7 事例由来の菌株と健康保菌者由来の常在大腸菌とのゲノム比較などを行い、下痢症由来株に偏って分布する遺伝子を抽出し、その機能解析を進める必要があると考えられる。また、さらに多くの事例を収集し、より大規模な解析に展開することも重要である。

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 6件）

1. 著者名 Xie Hui、Ogura Yoshitoshi、Suzuki Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Persistence of Antibiotic-Resistant Escherichia coli Strains Belonging to the B2 Phylogroup in Municipal Wastewater under Aerobic Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 202 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics11020202	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 Suzuki Yoshihiro、Hiroki Hayate、Xie Hui、Nishiyama Masateru、Sakamoto Shinsuke H.、Uemura Ryoko、Nukazawa Kei、Ogura Yoshitoshi、Watanabe Toru、Kobayashi Ikuo	4. 巻 240
2. 論文標題 Antibiotic-resistant Escherichia coli isolated from dairy cows and their surrounding environment on a livestock farm practicing prudent antimicrobial use	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hygiene and Environmental Health	6. 最初と最後の頁 113930 ~ 113930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijheh.2022.113930	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 Nishida Ruriko、Nakamura Keiji、Taniguchi Itsuki、Murase Kazunori、Ooka Tadasuke、Ogura Yoshitoshi、Gotoh Yasuhiro、Itoh Takehiko、Toyoda Atsushi、Mainil Jacques Georges、Pi?rard Denis、Seto Kazuko、その他19名	4. 巻 7
2. 論文標題 The global population structure and evolutionary history of the acquisition of major virulence factor-encoding genetic elements in Shiga toxin-producing Escherichia coli O121:H19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mgen.0.000716	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 Nakae Koji、Ooka Tadasuke、Murakami Koichi、Hara-Kudo Yukiko、Imuta Naoko、Gotoh Yasuhiro、Ogura Yoshitoshi、Hayashi Tetsuya、Okamoto Yasuhiro、Nishi Junichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversification of Escherichia albertii H-Antigens and Development of H-Genotyping PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 737979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.737979	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 Nakamura Keiji, Tokuda Chikashi, Arimitsu Hideyuki, Etoh Yoshiki, Hamasaki Mitsuhiro, Deguchi Yuichiro, Taniguchi Itsuki, Gotoh Yasuhiro, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of a homogeneous time-resolved FRET (HTRF) assay for the quantification of Shiga toxin 2 produced by <i>E. coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 11871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.11871	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 Auvray Frédéric, Perrat Alexandre, Arimizu Yoko, Chagneau Camille V., Bossuet-Greif Nadège, Massip Clémentine, Brugère Hubert, Nougayrède Jean-Philippe, Hayashi Tetsuya, Branchu Priscilla, Ogura Yoshitoshi, Oswald Eric	4. 巻 7
2. 論文標題 Insights into the acquisition of the pks island and production of colibactin in the <i>Escherichia coli</i> population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mgen.0.000579	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 Nakamura Keiji, Ogura Yoshitoshi, Gotoh Yasuhiro, Tetsuya Hayashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1009073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009073	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 Okuno Miki, Arimizu Yoko, Miyahara Seina, Wakabayashi Yuki, Gotoh Yasuhiro, Yoshino Shuji, Harada Tetsuya, Seto Kazuko, Yamamoto Takeshi, Nakamura Keiji, Hayashi Tetsuya, Ogura Yoshitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 <i>Escherichia</i> cryptic clade I is an emerging source of human intestinal pathogens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-023-01584-4	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小椋義俊
2. 発表標題 感染制御基盤の構築を目指した病原性大腸菌の大規模比較ゲノム研究
3. 学会等名 感染症学会、化学療法学会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋義俊
2. 発表標題 大腸菌の宿主適応と病原性進化
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋義俊
2. 発表標題 Escherichia属細菌の動物適応がもたらすヒト病原性
3. 学会等名 第96回日本細菌学会
4. 発表年 2023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
---------	---------