

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 8月23日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790477

研究課題名（和文）既存血清型では分類できない腸管出血性大腸菌の網羅的解析

研究課題名（英文）Study of O-seogroup untypeable enterohemorrhagic *E. coli* strains

研究代表者

井口 純 (IGUCHI ATSUSHI)

宮崎大学・IR推進機構・助教

研究者番号：00437948

研究成果の概要（和文）：日本国内で分離された既存のO血清型では分類できない腸管出血性大腸菌の解析を行った。O抗原コード領域の塩基配列決定および比較解析により、少なくとも7種類の新規タイプを見つけ出すとともに、各タイプを検出する為の遺伝学的手法を開発した。広域調査により、その一つ（OSB10=O183）は複数の下痢症患者から分離されていることが明らかとなり、今後の動向に注意が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the O-antigen biosynthesis gene (O-Ag) clusters from enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O serogroup-untypeable (OUT) strains isolated in Japan. Comparative analysis of O-Ag cluster sequences from EHEC OUT strains identified that at least four O-Ag clusters were novel. To evaluate the prevalence of the novel EHEC O-serogroup, strains were screened by using the genetic method developed in this study, suggesting that a novel EHEC O serogroup (OSB10=O183) was widespread in Japan and associated with diarrhea and hemorrhagic colitis. To gain more information about trends in EHEC OUT epidemiology, further studies of global OUT isolates are needed, and the PCR-based methodologies developed in this study may help the surveillance and monitoring of the EHEC OUT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：分類

1. 研究開始当初の背景

大腸菌を含むグラム陰性菌では病原細菌を中心に、菌体表層に発現している多糖抗原（O抗原）の多様性を標的とした血清学的な分類が古くから行われており、現在でも菌株を特徴付ける重要な指標となっている。大腸菌では現在のところ O1 から O181 までの O

血清型が定められており、腸管出血性大腸菌（EHEC）の代表的な血清型としては O157、O26、O111、O103 が挙げられる。これら 4 つの血清型株についてはこれまでに多くの研究が行われており、その代表株の全ゲノム配列も決定している。加えて、現在のところ報告数は少ないものの、今後注意が必要な血

清型として O121、O91、O145 などが挙げられており、各株の特徴が調べられるとともに代表株の全ゲノム解析が各国の研究機関で進められている。

国立感染症研究所では、地方衛生研究所などから毎年 2,000 株前後の EHEC 株が集められており、詳細な O 血清型別が行われている。2000 年から 2009 年のデータをまとめるとその大半は O157 をはじめとするいずれかの O 血清群に分類されるが、一部 (1.64%) に既存 O 血清型では分類できない〔OUT (untypeable)〕株が存在する。EHEC OUT 株は毎年 30 株前後と、その分離報告数は少ないが、中には重症化事例由来株も含まれており、それら菌株の特徴や国内での動向を調べることが必要であると考えた。

2. 研究の目的

これまでに詳細な解析が行われていない EHEC OUT 株について、系統解析・ゲノム解析・血清学的解析を含めた網羅的な解析を行うことを目的とした。本研究により得られる成果は、本菌の国内または世界的な流行調査を行う上で必要であり、今後の EHEC 感染症の予防や治療に役立つと期待された。

3. 研究の方法

(1) 菌株の分類

① 血清学的試験

事前試験で OUT と判定された菌株について、SSI 製抗血清を使用して OUT であることの確認を行う。

② 進化系統解析

7 つの House keeping gene の塩基配列を用いた系統解析を行う。加えてデータベースより

網羅的に抽出した大腸菌の配列情報を加えて解析し、OUT 株内および他の大腸菌株間との進化系統的關係を明らかにする。

③ 分子疫学解析

制限酵素 XbaI 処理による PFGE パターンを比較して系統的な詳細分類を行う。

(2) 遺伝学的特徴の解明

① 病原性関連遺伝子の保有

大腸菌における既知病原性関連遺伝子 (12 遺伝子) を標的とした PCR を行い、その保有を調べる。

② O 抗原コード領域の解析

各系統群の代表株について、O 抗原コード領域の塩基配列を決定し、既知情報との比較解析を行う。

4. 研究成果

血清学的試験で OUT である事を確認した、2007 年から 2011 年に分離された EHEC 計 43 株を以下の研究に使用した。

進化系統解析を行った結果、その多くが既報ゲノム解析株とは明らかに異なる系統グループに属し、その中の 12 株が独立した系統グループを形成した (図 1)。各系統グループの代表株をいくつか選出して O 抗原コード領域の塩基配列を決定し、既報の大腸菌 O 抗原コード領域の配列と比較した結果、7 種類の新規コード領域を確認した。

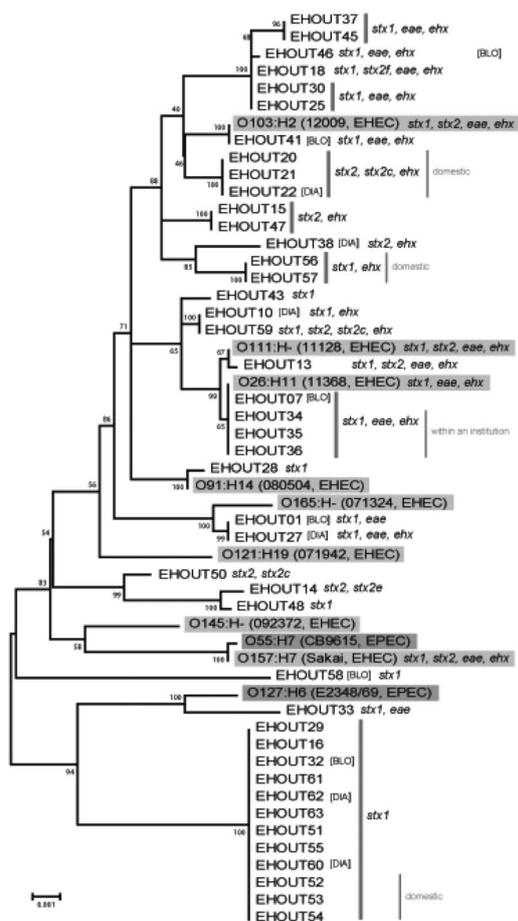


図 1. EHEC OUT 株の進化系統樹

EHEC OUT 12 株からなる系統グループ集団は、いずれも Stx1 遺伝子を保有し、O 抗原コード領域は既報大腸菌の O 抗原コード領域とは相同性は無いものの、既報 *Shigella boydii* type 10 と高い相同性を示した (図 2)。*S. boydii* type 10 検出用の抗血清を用いて凝集試験を行ったところ明らかな凝集反応が認められたことから、EHEC OUT でみられた 12 株は *S. boydii* type 10 と同じ O 抗原コード領域を保有し、同じ抗原性を示すことが明らかとなった (この集団を OSB10 と名付けた)。

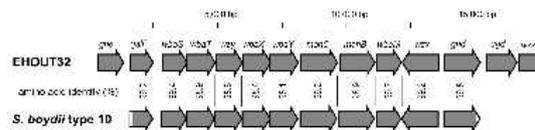


図 2. O 抗原コード領域の比較

OSB10 およびその他新規 O 抗原コード領域の特異的配列を標的とした PCR 法を開発し、大腸菌 O 抗原標準株を用いた特異性 (他では増幅しないこと) の確認を行った。

OSB10 12 株の PFGE パターン解析を行った結果、家族内で分離された 2 つのグループ内では類似したパターンを示したが、それ以外は明らかに異なるパターンであったことから、株間の疫学的な関連性は無いと判断された (図 3)。

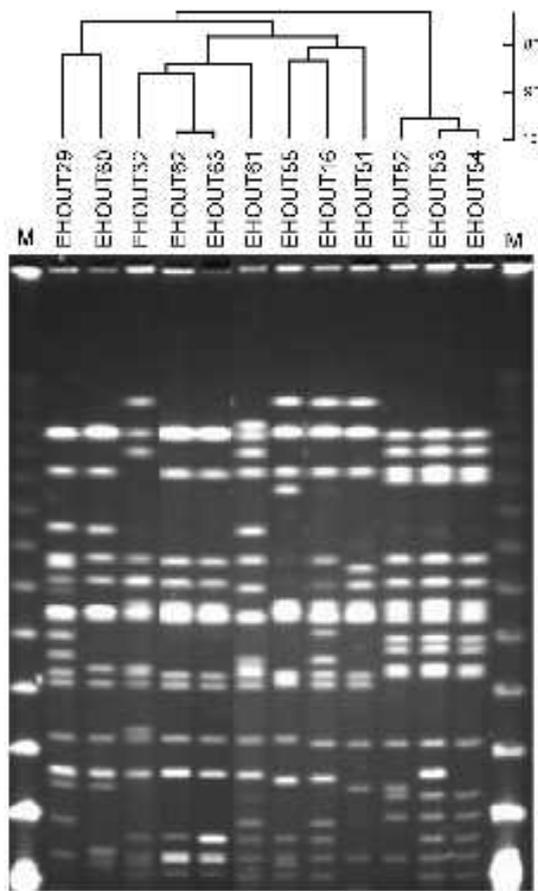


図 3. OSB10 の PFGE パターン比較

後に OSB10 は 2011 年に新しく追加された大

腸菌 O 血清群 0183 に属する (0183 と同一である) ことが確認された。他の OUT 株についても今後の動向に注意が必要であり、本研究で開発した新規抗原コード領域を標的とした遺伝学的手法が、菌株の汚染状況調査などに有効であると考えられた。

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)

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Ohnishi M, on behalf of the EHEC Study Group. Emergence of a Novel Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O-serogroup Cross-reacting with Shigella boydii Type 10. Journal of Clinical Microbiology 49(10): 3678-3680 (2011)

[学会発表] (計 2 件)

井口 純, 伊豫田 淳, 勢戸 和子, 大西 真
既存の血清型では分類できない腸管出血性大腸菌の解析、第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2011. 7. 15-16 (大阪市)

井口 純, 伊豫田 淳, 秋吉 充子, 大西 真
大腸菌の O 抗原合成遺伝子領域の網羅的解析と菌株分類法への利用の検討、第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012. 10. 26 (福岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井口 純 (IGUCHI ATSUSHI)
宮崎大学・IR 推進機構・助教
研究者番号：00437948

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

伊豫田 淳 (IYODA SUNAO)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：70300928
大西 真 (OHNISHI MAKOTO)
国立感染症研究所・細菌第一部・部長
研究者番号：10233214
勢戸 和子 (SETO KAZUKO)
大阪府立公衆衛生研究所・細菌課・主任研究員
研究者番号：70211323