

24. 腸管出血性大腸菌 O157 の分離同定の過程で

見つかった血清型別不能株の分子遺伝学的解析

○平井 佑治 (地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

腸管出血性大腸菌 O157 は、重篤な下痢症を引き起こし、ヒトからヒトへの二次感染のリスクもあることから、公衆衛生上重要な病原菌である。今回、典型的な O157 の生化学的性状を示すが、O 抗原の血清型別で型別不能となった腸管出血性大腸菌を分離した。本研究では、分子疫学解析およびゲノム比較解析を行うことにより、本菌が血清型別不能となった要因を検証し、腸管出血性大腸菌の検査技術の向上の一助とする。

【研究の必要性】

腸管出血性大腸菌は、汚染された食品を経口摂取したヒトに感染し、無症候から軽度の下痢、激しい腹痛、頻回の水様便、血便と様々な症状を引き起こす。合併症として溶血性尿毒症症候群や脳症などを発症した患者の致死率は 1~5%とされる。その他の重要な感染経路として、ヒトからヒトへの二次感染が知られている。感染症法および学校保健安全法では、有症保菌者に対して、就業制限や出席停止ように、本菌は、公衆衛生上重要な病原菌に位置付けられている。腸管出血性大腸菌の主要な病原因子としてベロ毒素が知られている。また、日本の患者および保菌者から検出される腸管出血性大腸菌の O 抗原による血清型は、O157 が最も多い。

行政検査の現場では、生化学的検索、血清学的検索および遺伝学的検索を併用し、さらにベロ毒素の産生に関わるベロ毒素遺伝子と O157 に注目した検査技術も用いて、腸管出血性大腸菌の分離同定の効率化を図っている。今回、報告者の所属する地方衛生研究所では、市中病院から腸管出血性大腸菌 O157 が搬入され、その菌株の性状確認のための分離同定の過程で、典型的な腸管出血性大腸菌 O157 の性状を示した株と、生化学的に典型的な O157 の性状を示し、ベロ毒素遺伝子も保有するが、血清学的に O157 と同定されない株を分離した。O 抗原の血清型を同定できない株のことを血清型別不能株と呼ぶ。腸管出血性大腸菌の中にも血清型別不能株が存在することが報告されており、同定作業が煩雑になることが報告されている。そのため、腸管出血性大腸菌の検査技術の向上に寄与するため、病原遺伝

子を持った血清型不能株の遺伝学的特徴を明らかにすることは重要である。

【研究計画】

当所で分離した 2 株が、菌株として搬入された後の分離同定の過程で分枝したのであれば、2 株のゲノム情報は酷似していると予測される。そのような 2 株のゲノム情報の比較を行い、ゲノム配列の変異が認められれば、その差異は、血清型別不能に寄与する可能性が高いと考えられる。そこで本研究は、血清型別不能株と、同一患者から分離された腸管出血性大腸菌 0157 を用いて、分子疫学的解析およびゲノム比較解析を行うことにより、血清型別不能となった要因を明らかにする。また、ベロ毒素の産生量を含む表現型への影響を検証する。まず、パルスフィールドゲル電気泳動法および反復配列多型解析法により、二つの株の近縁性を確認する分子疫学解析を行う。また、次世代シーケンサーを用いて 2 株のゲノム配列を決定、比較することにより、血清型別不能となった要因になりうるゲノム配列の変異がないか検証する。最後に、血清型別不能株が有するヒトへの病原性を推定するため、ベロ毒素産生性試験を行う。

【実施内容・結果】

1) 血清型別試験、抗原遺伝子およびベロ毒素遺伝子を標的とした遺伝子学的解析

a) 典型的な腸管出血性大腸菌0157 の性状を示した株、b) 生化学的に典型的な0157 の性状を示すが、血清学的に0157 と同定されない株、および、c) これらと同時期に分離された0157 の 3 株について、血清型別、井口らが報告したE. coli O-genotyping PCR¹⁾、番上らが報告したE. coli H-genotyping PCR²⁾、および0157&ベロ毒素遺伝子同時検出キット(タカラ)を用いてO抗原型、H抗原型、およびベロ毒素型を解析した。それぞれ、a) 0157:Hg7, VT2+、b) Non-0157:Hg7, VT2+およびc) 0157:H23, VT-となった。以下、これらの結果を 3 株の菌株名として扱う。

2) パルスフィールドゲル電気泳動法および反復配列多型解析法による分子疫学解析

パルスフィールドゲル電気泳動法は、細菌から抽出したゲノムDNAを、特定の塩基配列を認識、切断する制限酵素を用いて切断し、その切断パターンに基づき遺伝子型別する手法である³⁾。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いてゲノムDNAを抽出し、制限酵素XbaIで切断した。パルスフィールドゲル電気泳動により、切断されたゲノムDNAを分子量の違いによって分離し、エチジウムブロマイドでDNAを染色後、紫外線照射下で撮影し、切断パターンを比較した。また、分子量マーカータにはXbaI処理した*Salmonella* Braenderupを用いた。3 株を比較したところ、0157:H23, VT-が 2 株と比べ明らかに異なる切断パターンを示す一方で、Non-0157:Hg7, VT2+は、0157:Hg7, VT2+と切断パターンが酷似していたが、白枠で示す領域において、切断されたゲノムDNAが消失していた(図 1)。

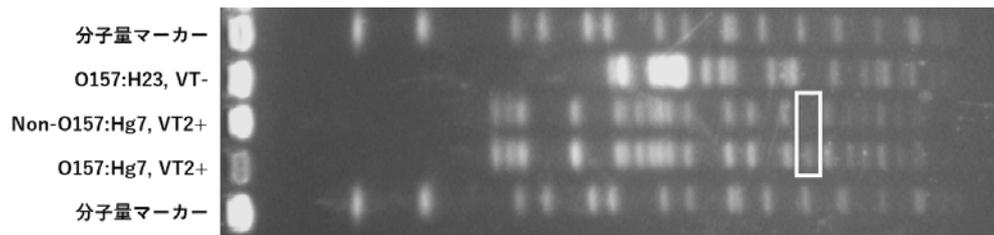


図 1. パルスフィールドゲル電気泳動法による 3 株の比較

反復配列多型解析法は、ゲノム上に存在する一定の塩基配列が複数回繰り返される領域（反復配列）の繰り返し数に基づく遺伝子型別法である³⁾。腸管出血性大腸菌では、17 の反復配列領域について繰り返し数を算出し、その数字の組み合わせによって菌株異同を判断する。抽出したゲノムDNAと 17 の反復配列領域を増幅するように設計した蛍光プライマーで増幅反応を行い、3500 series Genetic analyzer (Applied Biosystems) およびGenemapper を用いて解析した。O157:Hg7, VT2+とNon-O157:Hg7, VT2+において、17 領域の繰り返し数は一致していたが、O157:H23, VT-とは大きく異なっていた（表 1）。

表 1. 17 の反復配列領域での繰り返し数の比較

	反復配列領域名（繰り返し数*）								
	EH111-8	EH157-12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25
O157:Hg7, VT2+	1	6	15	4	-2	15	9	10	3
Non-O157:Hg7, VT2+	1	6	15	4	-2	15	9	10	3
O157:H23, VT-	-2	2	4	-2	-2	-2	3	19	2
	EH111-11	EH111-14	EH26-7	EHC-6	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	
O157:Hg7, VT2+	2	-2	-2	-2	4	7	9	8	
Non-O157:Hg7, VT2+	2	-2	-2	-2	4	7	9	8	
O157:H23, VT-	2	-2	-2	-2	-2	1	-2	3	

*: "-2"は反復配列が認められなかったことを示す

3) 次世代シーケンサーを用いたゲノム比較解析

Qiaseq FX DNA Library (Qiagen) を用いて、ゲノム DNA を 500 塩基程度に断片化したライブラリを作製した。イルミナ社の次世代シーケンスシステムを用いて、DNA 断片の両端 150 塩基の塩基配列を取得するペアエンドシーケンスにより、ライブラリの塩基配列を取得した。取得したライブラリの塩基配列は Web 上の解析ツール Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) を用いて、大腸菌が共通して保有しているとされる遺伝子群（core genome 遺伝子）の塩基配列の異同に基づく遺伝子型別（cgMLST、使用アプリケーション cgMLSTFinder 1.1）及び 0 抗原規定遺伝子の検出（使用アプリケーション SerotypeFinder 2.0）を行った。2,513 ある core genome 遺伝子のプロファイルと比較すると、O157:Hg7, VT2+と Non-O157:Hg7, VT2+で一致していたのは、2,504 遺伝子であった（99.6%）。一方で、O157:H23, VT-の core genome 遺伝子のプロファイルと一致していたのは、O157:Hg7, VT2+で 149 遺伝子（5.9%）、Non-O157:Hg7, VT2+で 147 遺伝子であり（5.8%）、その内訳は、2 株間で概ね一致していた。次に、O157:Hg7, VT2+と Non-O157:Hg7, VT2+で異なっていた 9 遺伝子について、精査した。特徴的であったのは、

連続する3つの core genome 遺伝子(大腸菌標準株 K12 における gene accession ID; b2007, b2014, b2016)が、Non-0157:Hg7, VT2+でのみ遺伝子保有を認めなかった。

一方、SerotypeFinder では、Non-0157:Hg7, VT2+でのみ、O 抗原規定遺伝子(*wzy*, *wzx*)が認められなかった。上記の3つ core genome 遺伝子と *wzy*, *wzx* と相同な遺伝子を、腸管出血性大腸菌 0157 の代表株である sakai 株における gene accession ID を検索したところ、b2007, b2014, b2016 は ECs2809, ECs2816, ECs2818, *wzy* および *wzx* は ECs2842 および ECs2844 であることが分かった。これらが約 4,000 塩基の領域に集中していたことから、この領域について、詳細に解析するため、以下の解析を行った。

次世代シーケンス解析用ソフトウェア CLC genomic workbench を用いて、取得したライブラリの塩基配列が、参照配列上のものと尤も適合する部位を検索するリファレンスマッピングを行った。今回は、参照配列として、sakai 株の全ゲノム配列を用いた。Non-0157:Hg7, VT2+で保有を認めなかった3つの core genome 遺伝子とこれらの上流と下流に位置する、最も近傍な core genome 遺伝子 (sakai 株における gene accession ID; ECs2787 および ECs2872) が位置する領域 (sakai 株におけるゲノム位置 2,733,000~2,820,000) へのライブラリの分布数を比較した(図2)。0157:Hg7, VT2+が概ね一様な分布を示していたのに対し、Non-0157:Hg7, VT2+では、ゲノム位置 2,750,000~2,785,000 付近にライブラリがほとんど分布しておらず、上述の5遺伝子はこの領域に位置していた。

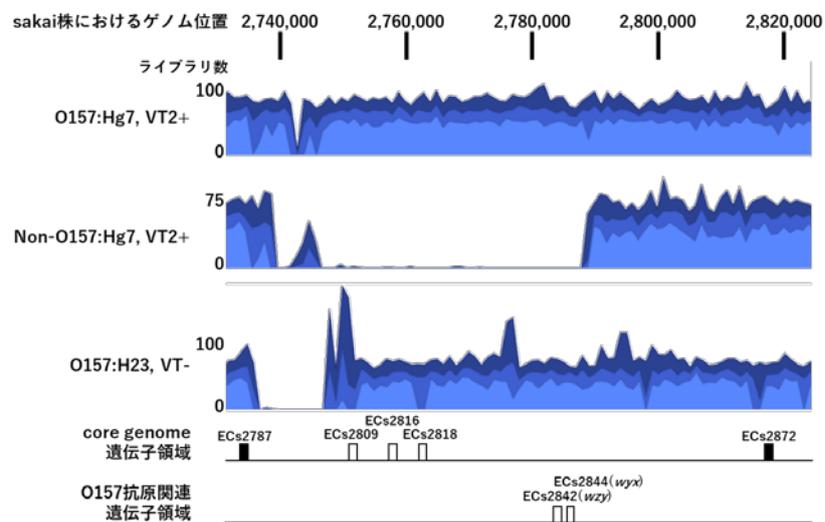


図2. 0157 抗原関連遺伝子領域周辺へのリファレンスマッピングの結果

4) ベロ毒素産生性試験

VTEC-RPLA「生研」(デンカ)を用いて、ベロ毒素産生能を評価した。ブレインハートインフュージョン寒天培地に試験菌株を播種し、37°Cで20時間培養した。培養後の培地表面を掻き取り、0.5mLのポリミキシンB液に菌塊を浮遊させた。この時、試験菌株間で、浮遊後の濁度が同程度になるように菌量を調整した。37°Cで30分間振盪させながら反応させ、遠心分離後の上清を反应用試料とした。以下のVTEC-RPLA「生研」の具体的な操作手順は取扱説明書に従った。抗ベロトキシン2型ウサギポリクローナル抗体感作ラテックスに対

してのみ、0157:Hg7, VT2+では凝集価 400 : 1、Non-0157:Hg7, VT2+では凝集価 800:1 となった。当該 2 株は、ベロ毒素産生能を認めたが、0157:H23, VT-では、認められなかった。

【考察と今後の課題】

今回、典型的な 0157 の性状を示した株 (0157:Hg7, VT2+) と、生化学的に典型的な 0157 の性状を示すが、血清学的に 0157 と同定されない株 (Non-0157:Hg7, VT2+) の近縁度を検証するとともに、Non-0157:Hg7, VT2+の遺伝学的特徴を明らかにする目的で実験を行った。2 株は、同等のベロ毒素産生能を有し、反復配列多型解析法で完全一致した。一方で、パルスフィールドゲル電気泳動法では 1 か所違い、cgMLST では 2,513 遺伝子中 9 遺伝子が異なっていたため、ほぼ同一の遺伝学的背景を持つ 2 株であることが示唆された。一方で、次世代シーケンス解析で取得したライブラリを用いた sakai 株のゲノム配列への分布様式から、元株である 0157:Hg7, VT2+のゲノムから、0157 抗原規定遺伝子を含む約 3,500 塩基の領域が欠落したために、血清型別不能に陥ったことが強く疑われた。どのような機構で欠落が起こったかを特定するためには、予想される変異領域の近傍にプライマーを設計し、塩基配列解析を行うか、より長鎖の塩基配列解析が可能な次世代シーケンス解析データも組み合わせて、完全ゲノム配列を作製することが必須と考えられる。

【参考文献】

- 1) *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. Iguchi A et al. J Clin Microbiol. 2015, 53: 2427-2432.
- 2) *Escherichia Coli* H-Genotyping PCR: A Complete and Practical Platform for Molecular H Typing. Banjo M et al. J Clin Microbiol. 2018, 56: e00190-18.
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター (2014). 腸管出血性大腸菌の分子型別. 病原微生物検出情報 (IASR) Vol. 35 p. 129-130: 2014 年 5 月号

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費-計 16 品	300,000 円
(次世代シーケンス解析用試薬-iSeq 100 i1 Reagent など計 7 品)	(177,276 円)
(遺伝子解析用プラスチック用品-Qiavac 24 Plus など計 5 品)	(79,409 円)
(細菌培養用プラスチック消耗品-アズノールシャーレなど計 3 品)	(29,070 円)
(大腸菌 0157 検出キット UNI)	(14,245 円)
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円