

総説

## 大腸菌血清型別の“これまで”と“これから”

井口 純

宮崎大学農学部畜産草地科学科（宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1）

Tel/Fax : 0985-58-7507

iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp

### 【要約】

血清型別とは、細胞表面に発現した抗原となる物質の多様性を、免疫学的な特異性により識別する方法である。細菌学分野においては、分離株を同種内で細分類する手法として、または属種の同定をサポートする手法として、特に病原細菌を対象に血清型の整理と規格化が進められてきた。1990年代以降、ゲノム解析などによって血清型を担う抗原をコードする遺伝子（群）の特徴や全体像が明らかとなり、それに伴いその代替法となる様々な遺伝学的手法も提案されてきた。大腸菌 (*Escherichia coli*) では、現在のところ O1 から O188 までの O 血清群と H1 から H56 までの H 型が定められており、それらを組み合わせて血清型と呼んでいる。大腸菌の血清型別は分離株を細分類する標準法として調査や研究の場で広く利用されている。この総説では、ヒトや家畜の感染症にも関連する大腸菌に注目し、その血清型の抗原の特徴や判定に関する細部について振り返ってみたい。また、我々のグループで取り組んできた血清型を網羅的に判定できるマルチプレックス PCR 法についても紹介し、血清型別の今後についても考えてみたい。

**キーワード：**大腸菌、血清型、O 血清群、PCR 法

### グラム陰性菌の血清型

グラム陰性細菌では、表層に発現したり多糖 (LPS : lipopolysaccharide) (O 抗原)、鞭毛 (H 抗原)、莢膜 (K 抗原)、線毛 (F 抗原) などが血清型別の標的として用いられている (図 1)。O、H、K のアルファベットは、それぞれドイツ語の「ohne Hauch」、「Hauch」、「Kapsel」に由来する。O と H は 1917 年に Weil と Felix が論文で紹介したのが最初である [30]。O と H の由来をまとめておく。鞭毛を持ち運動性を有するプロテウス的一种 (*Proteus mirabilis*) を寒天培地に接種して培養すると、

遊走して表面全体に拡がりフィルム状の膜をつくる。それがガラスに息を吹きかけて曇る様子に似ていることから、「息」を意味する「Hauch」の頭文字をとって H-form と名付けられ、後に運動性を有する菌株のみに存在する鞭毛抗原を H 抗原と呼ぶようになった [31]。一方、鞭毛を持たないプロテウスは運動性が無く培地も曇

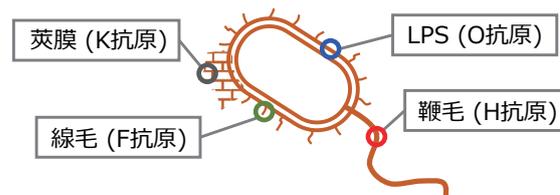


図1 グラム陰性菌の血清型に関わる抗原の概要

受付：2023年7月11日

受理：2023年7月19日

らないことから、「ohne Hauch」(ohneは「持たない」や「伴わない」を意味する前置詞)の頭文字を取ってO-formと名付けられた[31]。O-form株は、H抗原を標的とする免疫血清では凝集しないが、菌体抗原を標的とした免疫血清では識別できるため、菌体抗原をO抗原と呼ぶようになった。ちなみにKapselは莢膜(英語ではcapsule)を意味し、F抗原は「fimbria(線毛)またはfimbrial(線毛性の)」に由来する。

血清型別は、個々の菌株を系統的に近縁なグループ(同一クローン)に細分類する手法と言える。後述するように、同種内で多様な血清型が認められているが、これらは長い年月をかけて相同組み換え等により分岐したものであり、基本的には(相変異のような高頻度に抗原変換するメカニズムを除いて)、ごく稀にしか血清型の変化は起こらない。つまり、血清型が同じであれば、同じようなゲノム構造を共有し、病原性やその他の表現型も類似していると予想できる。このような特性から、血清型別は多くの病原細菌を細分類する際の標準法となり、流行クローンの動向調査、集団感染事例が発生した際の感染経路の調査、既知高病原性クローンの識別などに利用される。さらにPFGE(pulsed-field gel electrophoresis)パターン解析やマイクロサテライトDNA解析などのDNAフィンガープリンティングを行う際には、事前に血清型を決めておき、型ごとに詳細比較をするのが一般的である。

### 大腸菌とは

大腸菌は腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、哺乳類や鳥類などの温血動物の腸管に常在している。しかし一部に、病原性を獲得して特定の疾病を引き起こす大腸菌が存在し、これらを総称して病原大腸菌(または病原性大腸菌)と言う。ヒトに対して腸管感染症を引き起こす大腸菌は下痢原性大腸菌(DEC:diarrheagenic *E. coli*)と呼ばれ、患者の症状や保有する病原因子(遺伝子)によって腸管出血性大腸菌(EHEC:enterohemorrhagic *E. coli*)、腸管病原性大腸菌(EPEC:enteropathogenic *E. coli*)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC:enterotoxigenic *E. coli*)、腸管凝集性大腸菌(EAEC:enteroaggregative *E.*

*coli*)、腸管侵入性大腸菌(EIEC:enteroinvasive *E. coli*)などに分類される。また、腸管以外で感染症(尿路感染症、敗血症、髄膜炎など)を引き起こす大腸菌を腸管外病原性大腸菌(ExPEC:extraintestinal pathogenic *E. coli*)と呼ぶ。獣医学領域においては、ウシ、ブタ、ニワトリのそれぞれで、下痢症を伴う大腸菌症や、浮腫病、敗血症、乳房炎、皮下蜂窩織炎などの原因になることが知られている。また、耐性変異や耐性遺伝子の獲得により出現する薬剤耐性大腸菌は、今後、上記感染症や日和見感染症の抗菌薬治療を困難にする恐れがあるため、世界的に注視すべき対象となっている[1]。

### 大腸菌の血清型

大腸菌では、O抗原およびH抗原を標的とした免疫学的な分類結果を、それぞれO血清群(O-serogroup)およびH型(H-type)とし、それら2つを組み合わせたものを血清型(serotype)と呼んでいる。大腸菌の血清型はデンマーク国立血清学研究所(SSI;Statens Serum Institut)が管理しており、現在のところ、O血清群はO1からO188(185種類)、H型はH1からH56(53種類)、K型はK1からK103(67種類)が認められている。シリーズ番号と種類の数に違いがあるが、これは欠番やO血清群においては亜型が存在するためである。試験株と免疫血清による凝集試験の結果がO157とH7であれば、その血清型は間をダブルコロンで区切ってO157:H7と表記する。血清型の組み合わせパターンは計算上約9,800種類となり、細分類法として適度な分解能を有していると言える。血清型にK抗原型の結果を加える場合もあり、その場合はO157:K20またはO157:K20:H7のように示す。これら全ての抗原型に対する免疫血清およびそれぞれの参考株は、SSI Diagnostica社(2016年にSSI本体から切り離された、微生物学検査試薬等を提供する会社)から販売されており、日本では株式会社ベリタスを介して購入できる。また、国内メーカーであるデンカ株式会社からは、病原大腸菌に関連する主要なO血清群(混合血清に含まれる50種類と、単味血清のみで提供されているO45とO104を加えた計52種類)およびH型(22種類)を対象とした免疫血清が販

売されている。

大腸菌 O 血清群を判定する際の抗原には、濃い菌液を 121℃ で 20 分間または 100℃ で 60 分間加熱し、遠心して上清を取り除いた後に、新しい生理食塩水で再懸濁したものを使用する。加熱処理によりタンパク質は変性し、莢膜が発現している場合には菌体表面から剥離して上清とともに除去されるため、耐熱性である O 抗原多糖のみを標的とした凝集反応を観察することができる。軟寒天培地で運動性を有することが確認された菌株は、H 型判定試験へと進むことができる。ただし、免疫血清との凝集試験で明瞭な結果を得るためには、クレイギー管を 3 から 5 回通過させて運動性を強化した（鞭毛が十分に発現した）菌体が必要となるため、抗原液の調整に 2 日程度が必要となる。

O 血清群において、免疫血清との凝集試験では判定できない（いずれの免疫血清とも凝集しない、または複数の抗血清と凝集するために特定できない）場合は OUT (untypeable)、O 抗原を発現していないために rough 型である場合は Orough と表記する。H 型においては、運動性が無い場合は H- (マイナス) または HNM (non-motile)、運動性はあるがいずれの免疫血清とも凝集しない、または複数の免疫血清と凝集するために特定できない場合は HUT (untypeable) と表記する。

大腸菌血清型別の優れた点として、国際標準化されている、適度な分解能がある、情報共有しやすい表記法である、判定に特別な機器を必要としない、などが挙げられる。加えて、これまでに蓄積された血清型に紐付けられた疫学情報は、新たに分離された菌株の病原性などを推測する上で貴重な参考情報となる。このような背景から、病原大腸菌に関する報告書や論文では、分離株に血清型（または O 血清群）の情報を付けることが習慣化している。

### O 抗原の構造と特徴

グラム陰性菌の外膜表面の約 4 分の 3 は LPS で覆われている [23]。LPS は内側からリピド A、コア多糖、O 抗原多糖の 3 つの構造からなる (図 2)。LPS は内毒素とも呼ばれるが、その活性中心は糖脂質であるリピド A が担っており、ヒトなどに感染した際には免疫システムを強く

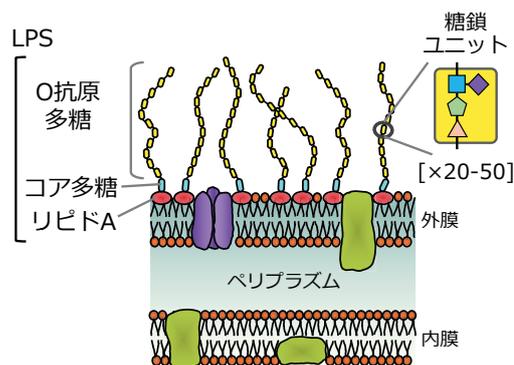


図2 グラム陰性菌表層の模式図

刺激する。大腸菌のコア多糖は、R1 から R4 そして K12 と名付けられた異なる構造の 5 種類が見つかっている [15]。O 抗原多糖は、複数の単糖が規則正しく結合した O 抗原糖鎖ユニットを形成し、それらが数珠状に連なった構造をとる。細胞質で O 抗原糖鎖ユニットを合成し、それをペリプラズムに輸送して連結させるまでのステップは、O 抗原合成遺伝子群によってコードされている。この遺伝子群には、構成単糖の合成系、糖転移、糖鎖ユニットの輸送と連結に関わる遺伝子が含まれる。現在、全ての O 血清群における O 抗原合成遺伝子群の塩基配列が明らかとなっており、O 血清群によって遺伝子の数や構成も大きく異なることが分かっている [9]。また、全ての O 血清群において糖鎖ユニットの構造も明らかとなっている [20]。これまでに分かっている糖鎖ユニットを構成する単糖は 48 種類で、1 つのユニットには 2 から 7 個の単糖が使われており、この構造の違いが異なる抗原性を生み出している。糖鎖ユニットの連結数は 10 から 25 個で、この長さは O 抗原合成遺伝子群にコードされた Wzz タンパク質によって調整されている [4]。大腸菌やその他のグラム陰性菌の研究において、連結数が多いと抗菌ペプチドやマクロファージの貪食に対して抵抗性が高くなり、少ないと抵抗性が低く、その傍ら培養細胞などへの接着性が増すことが分かっている [22, 24, 28]。このように、O 抗原多糖の長さは物理的に病原性の発揮に関与していると考えられている。一方で、それぞれの O 抗原に特異的な病原性を含む機能性は見つかっていない。例えば、O157 は EHEC における主要な O 血清群であり、O157 抗原多糖に何らかの病原性があるように

誤解されがちであるが、糖鎖ユニット自体の病原性はこれまでに見出されていない。

上述したように、大腸菌のO抗原は外界ストレスに対して抵抗する機能があり、ストレス因子の多い自然環境で生残するためには必要な器官であると考えられる。ただし、実験室内でO抗原を発現したsmooth型株を連続培養すると、O抗原を失ったrough型株が派生することがある。このような菌株のゲノム配列を確認すると、大抵の場合は、O抗原合成遺伝子群上に内因的な変異〔欠失や挿入配列 (IS: insertion sequence) の挿入など〕が確認される (著者による未発表データ)。余談になるが、1922年にアメリカのスタンフォード大学で分離され、その後、分子生物学研究のモデル生物として、さらに実験用大腸菌として世界中で使われるようになった「大腸菌 K-12」はrough型として知られているが、元はO16様抗原を発現するsmooth型株で、継代培養等の過程でO抗原コード遺伝子の一つにIS5が挿入したことでrough型化したと考えられている [18, 27]。

大腸菌と同じ腸内細菌科に属するサルモネラ (*Salmonella*) の血清型は、フランスのパスツール研究所が管理している。サルモネラの一部は2つの鞭毛抗原コード遺伝子を保有し、それらをスイッチング (相変異) することで、1相および2相と呼ばれる異なる鞭毛抗原を発現する。現在のところ、少なくともO1からO67 (46種類) のO群と、1相 (56種類) と2相 (20種類) のH型が認められており、その組み合わせから2,600種類を超える血清型が認められている [6, 7, 14]。サルモネラと大腸菌のO抗原コード遺伝子群とO抗原糖鎖ユニットを比較すると、相同または類似する組み合わせが少なくとも24組見つかっている。例えば大腸菌のO157とサルモネラのO30、大腸菌のO111とサルモネラのO35、大腸菌のO55とサルモネラのO50は対応しており、それぞれの免疫血清でも凝集反応が起こる [19]。このように、異なる属種であっても相同または類似するO抗原多糖を発現することがある。

### H抗原の構造と特徴

鞭毛は細菌の運動性を担う器官であり、運動性の有無によって接着場所への到達や細胞への

侵入に違いがあることから、病原性にも深く関係していると考えられている [17]。鞭毛は、回転モーターとして働く基部、ジョイントとなるフック、プロペラとなる鞭毛繊維の3つの構造からなる。鞭毛繊維はフラジェリンと呼ばれる一種類のタンパク質がらせん状に積み重なった筒状構造をとり、このフラジェリンがH抗原となる (図3)。よく研究されているサルモネラでは、11個のフラジェリンによって一巻きすることがわかっている [21]。フラジェリンは*fliC* またはそのホモログ遺伝子によってコードされており、5' および3' 末端は鞭毛繊維の内側、中央領域は外側にあたるタンパク質をコードしている [26]。異なるH型株の*fliC* を比較すると、5' および3' 末端は保存されているのに対し、中央領域はサイズも大きく異なり (259-1,222 bp)、配列も多様化していることがわかる (図3) [3]。つまり、この違いが多様な抗原性の原因となっている。大腸菌は周毛性の鞭毛を発現するが、環境中には運動性の無い (おそらく鞭毛を発現していない) 大腸菌も多く存在する。例えば、感染者から分離されたEHEC O157の大半はH7型鞭毛を発現しているが、約1割は運動性を有しておらず、H- (またはHNM) と判定される [39]。

### 血清型を遺伝学的に判定する手法

EHEC感染症は集団感染事例を引き起こし、患者の一部が重篤化することから、特に注意が必要な腸管感染症に挙げられる。EHECに関連する主要なO血清群はO157、O26、O111、O103、O121、O145などであるが、これら以外に100種類を超えるO血清群が報告されている [32-38]。検査機関等ではこれら広域なO血清群にも対応できる体制を整えておくことが望まれる。一般的に、O血清群の予想がつかない分離株に対して、まずはデンカ株式会社の免疫血清を用いて判定する。それでも判定できない場合 (そして判定が必要な場合) は、SSI Diagnostica社が提供する完全タイピング用の免疫血清セットによる判定が必要となる。しかしこのセットは、23種類のプール血清と185種類のシングル血清からなり、種類も多くそれぞれが高価であるため、多くの検査室または研究室でこれら全てを揃えるのはコスト的に難し

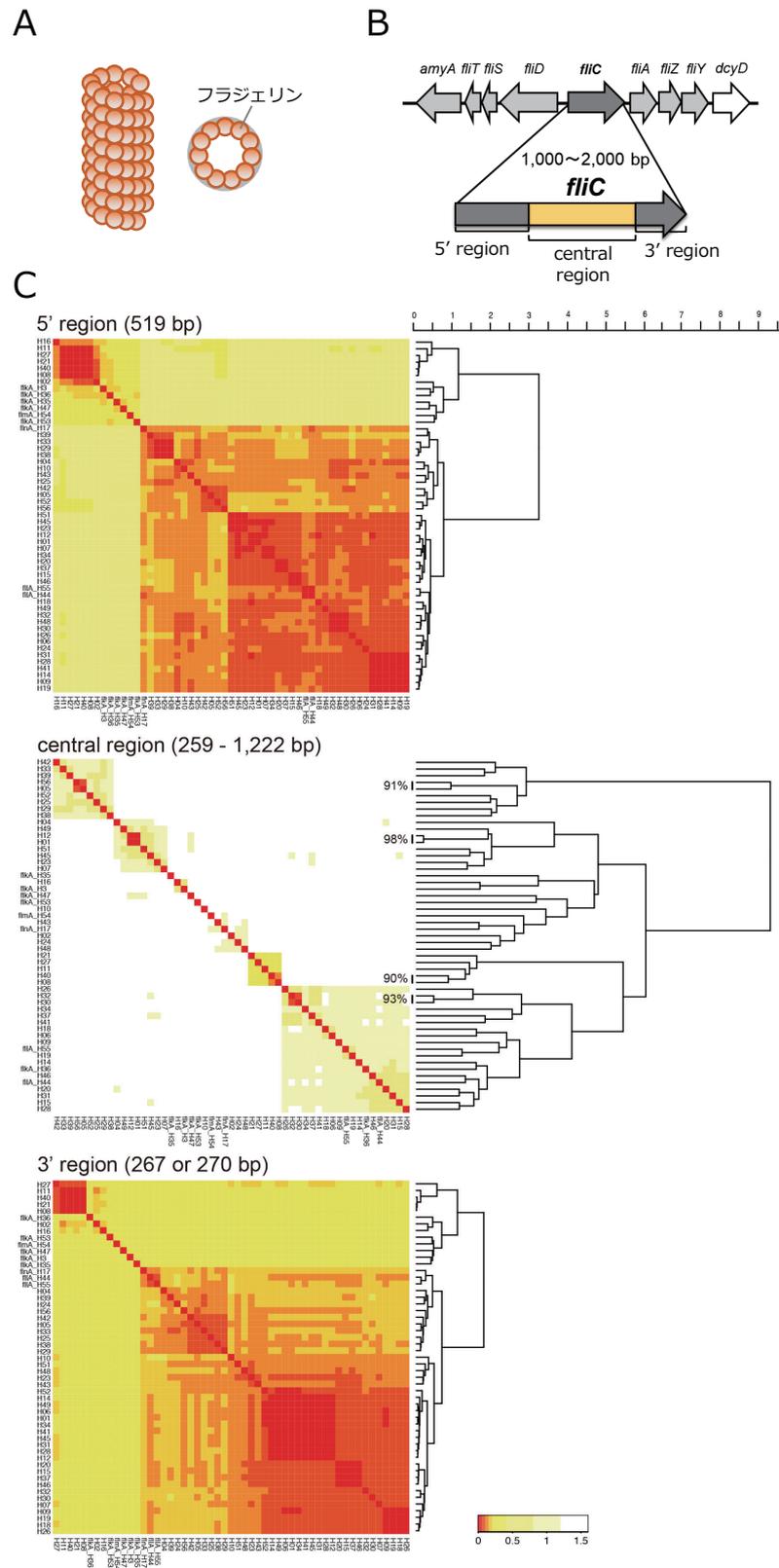


図3 鞭毛繊維の模式図

(A) 鞭毛繊維の模式図、(B) フラジェリンコード遺伝子 (*fliC*) とその周辺遺伝子の模式図[20]、(C) H1からH56の全*fliC*(およびそのホモログ)配列を用いた相同性比較[20]。Bで示す3領域に区分し、それぞれの相同性結果をヒートマップで示す(赤色は相同性が高く、黄色から白色になるにつれて低くなる)。

い。また、凝集試験では凝集性が弱かったり非特異的な凝集により判定が不明瞭となる場合もあり、抗原液（特に H 抗原）の準備には時間を要することから、これらの改善も課題として挙げられる。

細菌学における種々の検査手法が、比較的簡便で迅速な PCR などによる遺伝学的手法へと変遷する中で、血清型を遺伝学的に判定しようとする動きは自然な流れと言える。O 血清群では 1996 年に O111 と O157 を PCR 法で識別する手法が発表され、H 型では 1997 年に H7 を判定できる PCR 法が発表された [5, 25]。その後も病原大腸菌を中心に、それぞれの血清型に対する PCR 法が開発された。しかし、2012 年の時点で O 血清群を判定できる PCR 法は 34 種類と限られていた [10]。そこで我々の研究グループでは、大腸菌の血清型を網羅的に判定できる遺伝学的な手法の開発に取り組んだ。具体的には、血清型参考株の抗原コード遺伝子（群）の塩基配列情報を基に、O 血清群と H 型に対応した遺伝子型（それぞれ Og 型と Hg 型）を定義し、それらに対応したマルチプレックス PCR 法による「*E. coli* Og-typing PCR」と「*E. coli* Hg-typing PCR」（図 4）、および、ゲノム配列を用いる Web ツール「SerotypeFinder」（Center for Genomic Epidemiology にまとめ

られたゲノムベースでの解析ツールの一つ）の開発を行った（図 5） [3, 10, 16]。マーカー遺伝子の特徴と PCR 法の詳細については、発表論文や国立感染症研究所の HP で公開されている「腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル（2022 年 10 月改訂）」で紹介しているので、それらを参考にさせていただきたい。簡単に説明すると、O 血清群では O 抗原合成遺伝子群に含まれる *wzx/wzy* (O-antigen flippase /O-antigen polymerase) または *wzm/wzt* (ABC transporter) を、H 型では *fliC* の多様性領域をマーカー遺伝子（配列）として用いた。

Og および Hg-typing PCR 法を用いた完全タイプングでは、単離された菌株（コロニー）から検査を開始して 3 時間以内に判定結果が得られるため、迅速な手法と言える。また、特異性も高く比較的明瞭に Og 型と Hg 型を判定できる。プライマーや PCR 反応試薬にかかる費用も免疫血清に比べれば安価である。ただし、膨大な数のプライマーを事前に調整する必要があり、その準備には手間と時間がかかる。菌株のゲノム配列情報が取得できれば、マーカー遺伝子を用いた相同性検索により血清型を予測できる [29]。また、上記 Web ツールを用いれば、バイオインフォマティックな技術を必要とせず血清型の遺伝子型を容易に判定することがで

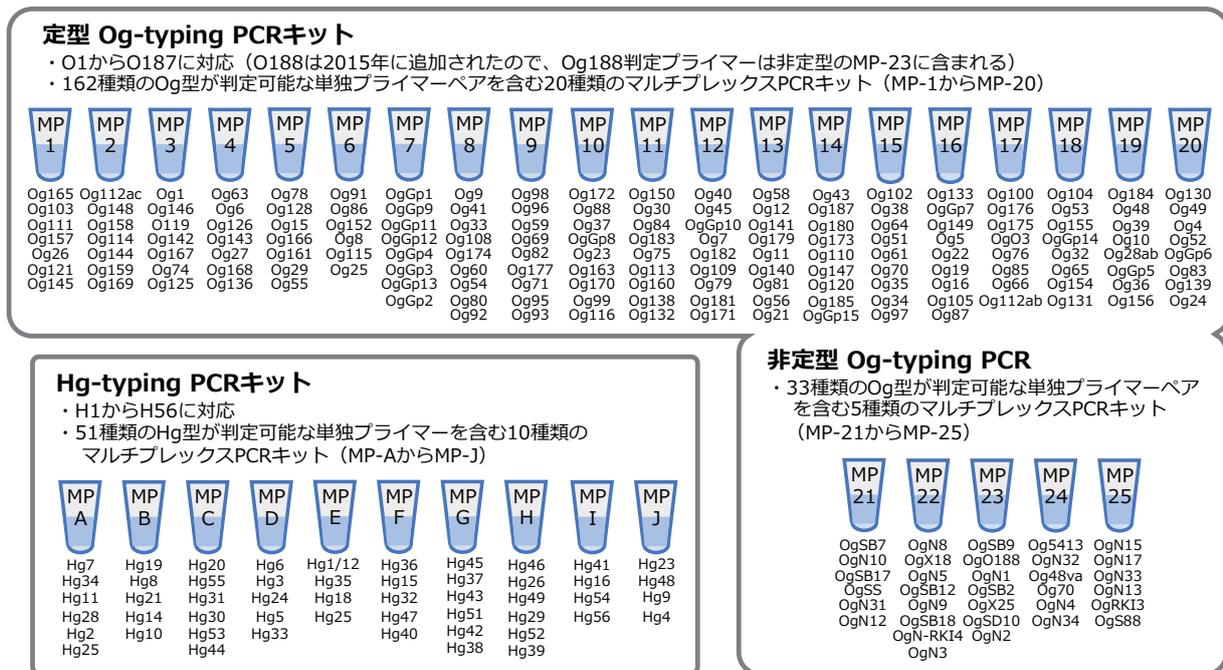


図4 Og/Hg-typing PCRに使用できるマルチプレックスPCRキットの構成

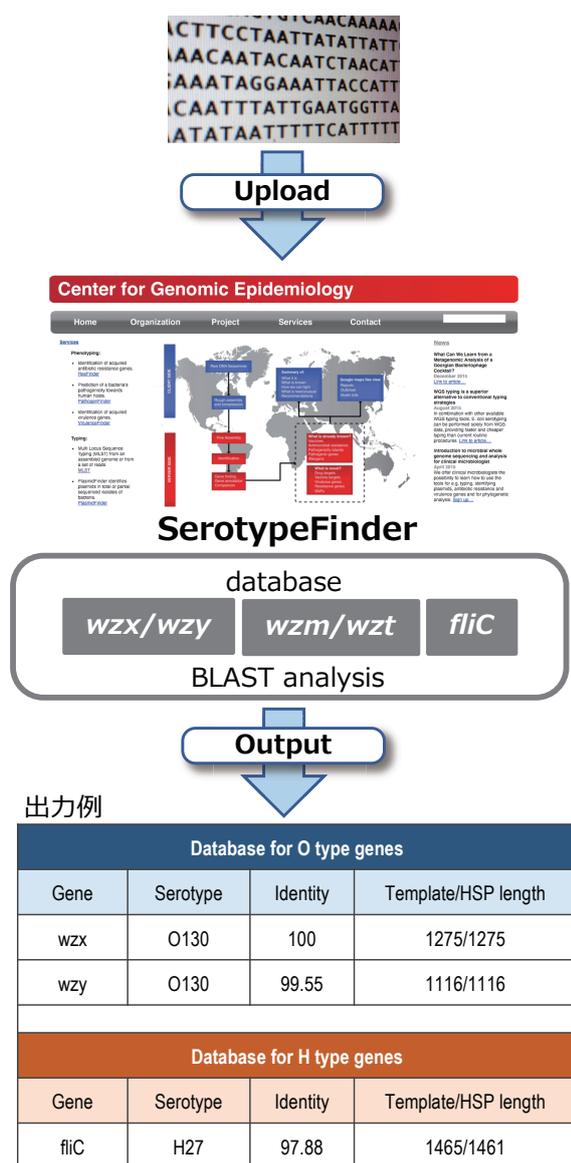


図5 Webツール「SerotypeFinder」の利用の流れ

きる。ゲノム配列決定にかかる費用は近年安くなっているが、コストと迅速性の面ではPCR法が優れている。ただし、ゲノム配列があれば病原性関連遺伝子や薬剤耐性遺伝子の有無を網羅的に判定することができ、進化系統解析等にも展開できる。そのため、O血清群を含む包括的な解析を計画する場合は、ゲノム配列の決定は有効な選択肢となる。

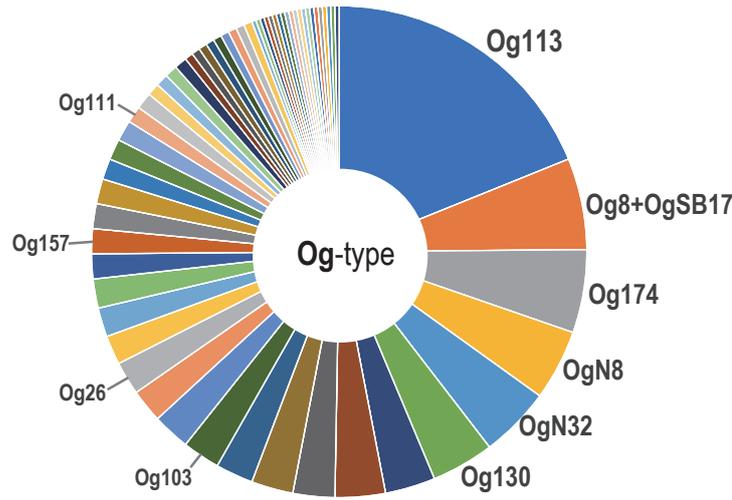
#### 不定型な血清型への対応

血清型が判定できない菌株の詳細な解析や、大規模なゲノム解析などを通して、定型Og型(O1からO188)には該当しない60種類以上の

非定型Og型が認められている [2, 29, 36-38]。これらは抗原的にも新規である可能性があり、O189以降のO血清群候補と言える。しかし、新たなO血清群を追加するには、SSIによるシングル血清やプール血清の大掛かりな再調整と整備が必要となるため、現在のところ新しいO血清群の追加は予定されていない。一方で、遺伝学的な判定法であれば柔軟に対応することができる。我々のグループでは、臨床由来株を中心に、2015年に追加されたO188 (Og188)を含む32種類の非定型Og型を判定できる単独PCR法とマルチプレックスPCR法を開発し、調査などに利用している [38]。ここでは定型と非定型を含むOg-typingおよびHg-typing PCRを使用した2つの調査例を紹介する。ウシの便から亜テルル酸塩を含まない培地で分離したEHEC 366株では、60種類のOg型（このうちの13種類は非定型Og型）と22種類のHg型が確認され、Og:Hgの組み合わせは71種類であった (図6) [8]。Og型は主要なものからOg113 (19%)、Og8+OgSB17 (大腸菌O8と赤痢菌ボイドtype 17のデュアル型) (6%)、Og174 (5%)、OgN8 (5%)、OgN32 (5%)、Og130 (4%) となり、非定型Og型株が全体の26% (94株) を占めた。ちなみにOg157、Og26、Og103はそれぞれ2%、Og111は1%であった。Og8+OgSB17株のゲノム解析を行ったところ、2つのO抗原合成遺伝子群がタンデムに挿入していることが明らかとなり、凝集試験によりどちらの抗原も発現していることが確認された (図7)。下痢症を呈していない健康なヒトから分離した大腸菌452株では、67種類のOg型と33種類のHg型が確認された (図8) (未発表データ)。Og:Hgの組み合わせは112種類で、OgGp10 (O13/O129/O135) :Hg4、Og1:Hg7、Og25:Hg4などが、ヒトに常在する主要なクローンであると示唆された。このように、これまで詳細な解析の対象とはならなかった大腸菌集団 (分離株セット) の、Og/Hg-typing PCRによる細分類により、血清型と生態的特徴の新たな関連性の一端が明らかとなった。

#### おわりに

大腸菌の血清型に基づく分類は、免疫血清に



Og113	OgN4	Og84	Og91	Og182	Og45	OgGp6
Og8+OgSB17	Og6	Og157	Og177	OgN5	Og55	OgGp8
Og174	Og103	Og163	Og187	OgN-RK14	Og82	OgN1
OgN8	Og153	OgX25	OgGp9	Og116+OgN31	Og88	OgN10
OgN32	Og22	Og116	Og74	Og5	Og98	OgN13
Og130	Og26	Og175	Og132	Og9	Og145	OgG5413
Og178	Og8	OgGp2	Og139	Og15	Og146	OgUT
OgX18	Og109	Og111	Og171	Og23	Og168	
Og156	Og179	OgGp7	Og181	Og43	Og185	

図6 ウシから分離したEHEC (366株) のOg型分布

60種類のOg型と22種類のHg型を含む71種類のOg:Hg型が確認された(OgUTまたはHgUTを含むものは除く)。黄色セルは非定型Og型、赤文字は2種類のOg型を含むもの、青文字は臨床的に主要なOg型を示す。OgUTは1株で確認された。(参考文献8のデータより作成)

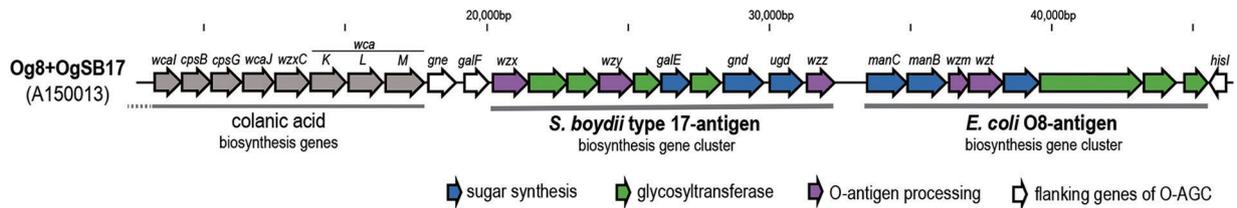


図7 A150013株(Og8+OgSB17)のO抗原コード領域周辺の遺伝子構造

PCR法により大腸菌Og8と赤痢菌OgSB17(*Shigella boydii* type 17)が検出された腸管出血性大腸菌A150013株の、O抗原コード領域周辺の遺伝子構造(参考文献8より引用・一部改変)

よる凝集法とPCR法などの遺伝学手法が共存しながら、今後も利用され続けるのではないかと予想する。一部の例外はあるものの、凝集試験とPCR法によって得られた結果には高い互換性があり、それぞれの手法によって得られた結果を持ち寄った場合でも、同じテーブル上で比較や議論することができる[32]。非定型Og型については遺伝学的な手法による対応が主体となるため、今後も情報を収集しながら、

緊急時に対応できるような検査基盤を構築しておくことが望まれる。

### 参考文献

- [1] Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Di Ilio, C. 2013. Escherichia coli in Europe: an overview. Int. J. Environ. Res. Public Health. 10:6235-6254.
- [2] Arimizu, Y., Kirino, Y., Sato, M. P., Uno, K., Sato, T., Gotoh, Y., Auvray, F., Brugere, H., Oswald, E., Mainil, J. G., Anklam, K. S., Döpfer, D., Yoshino, S.,

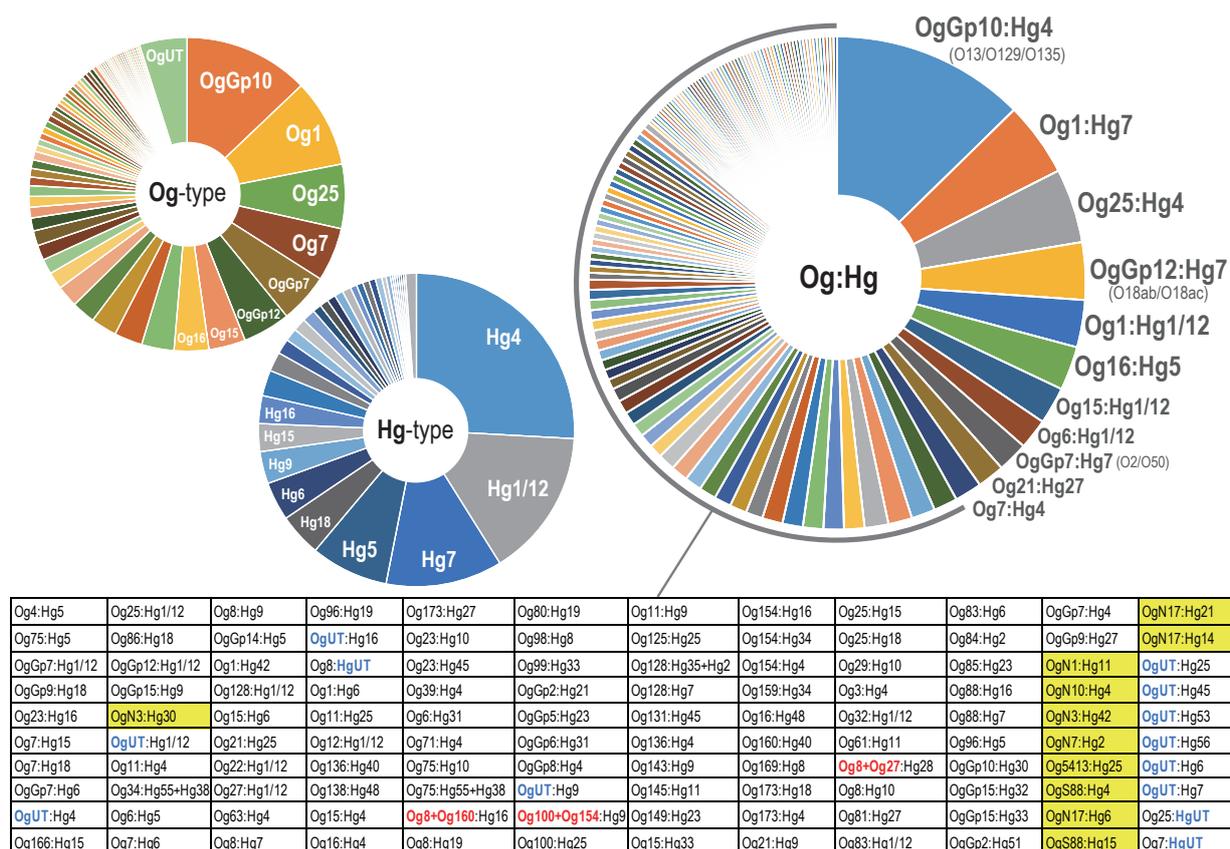


図8 健康なヒトから分離した大腸菌 (452株) のO:G:Hg型分布

67種類のO:G型と33種類のHg型を含む112種類のO:G:Hg型が確認された(OgUTまたはHgUTを含むものは除く)。黄色セルは非定型O:G型を含むO:G:Hg型、赤文字は2種類のO:G型を含むデュアル型、青文字はOgUTまたはHgUTを示す。OgUTは28株(6.2%)、HgUTは5株(1.1%)で確認された。

- Ooka, T., Tanizawa, Y., Nakamura, Y., Iguchi, A., Morita-Ishihara, T., Ohnishi, M., Akashi, K., Hayashi, T., Ogura, Y. 2019. Large-scale genome analysis of bovine commensal *Escherichia coli* reveals that bovine-adapted *E. coli* lineages are serving as evolutionary sources of the emergence of human intestinal pathogenic strains. *Genome Res.* 29:1495-1505.
- [3] Banjo, M., Iguchi, A., Seto, K., Kikuchi, T., Harada, T., Scheutz, F., Iyoda, S.; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. 2018. *Escherichia coli* H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing. *J. Clin. Microbiol.* 56:e00190-18.
- [4] Franco, A.V., Liu, D., Reeves, P. R. 1998. The wzz (cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain length specificity. *J. Bacteriol.* 180:2670-2675.
- [5] Gannon, V. P., D'Souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K., Read, S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 35:656-662.
- [6] Giannella, R. A. 1996. *Salmonella*, Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology* (4th edit.), Galveston (TX).
- [7] Grimont, P. A., Weill, F. X. (2007) *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.
- [8] Huong, T. T. N., Iguchi, A., Ohata, R., Kawai, H., Ooka, T., Nakajima, H., Iyoda, S. 2021. Distribution of novel O:G-types in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 59:e02624-20.
- [9] Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M., Hayashi, T., Thomson, N. R. 2015. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.* 22:101-107.

- [10] Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheutz, F., Ohnishi, M., and Pathogenic E. coli Working Group in Japan. 2015. Escherichia coli O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *J. Clin. Microbiol.* 53:2427-2432.
- [11] Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Nishii, H., Ohnishi, M., Mekata, H., Ogura, Y., Tetsuya, H. 2016. Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing Escherichia coli. *Front. Microbiol.* 7:765.
- [12] Iguchi, A., von Mentzer, A., Kikuchi, T., Thomson, N. R. 2017. An untypeable enterotoxigenic Escherichia coli represents one of the dominant types causing human disease. *Microb. Genom.* 3:e000121.
- [13] Iguchi, A., Nishii, H., Seto, K., Mitobe, J., Lee, K., Konishi, N., Obata, H., Kikuchi, T., Iyoda, S. 2020. Additional Og-Typing PCR Techniques Targeting Escherichia coli-Novel and Shigella-Unique O-Antigen Biosynthesis Gene Clusters. *J. Clin. Microbiol.* 58:e01493-20.
- [14] Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., Weill, F. X. 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 165:526-530.
- [15] Jansson, P. E., Lindberg, A. A., Lindberg, B., Wollin, R. 1981. Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from Enterobacteriaceae. *Eur. J. Biochem.* 115:571-577.
- [16] Joensen, K., Tetzschner, A., Iguchi, A., Aarestrup, F., Scheutz, F. 2015. Rapid and easy in silico serotyping of Escherichia coli using Whole genome sequencing (WGS) data. *J. Clin. Microbiol.* 53:2410-2426.
- [17] Josenhans, C., Suerbaum, S. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:605-614.
- [18] Kuhnert, P., Nicolet, J., Frey, J. 1995. Rapid and accurate identification of Escherichia coli K-12 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4135-4139.
- [19] Liu, B., Knirel, Y. A., Feng, L., Perepelov, A. V., Senchenkova, S. N., Reeves, P. R., Wang, L. 2014. Structural diversity in Salmonella O antigens and its genetic basis. *FEMS Microbiol. Rev.* 38:56-89.
- [20] Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., Widmalm, G. 2020. Structure and genetics of Escherichia coli O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 44:655-683.
- [21] Mimori, Y., Yamashita, I., Murata, K., Fujiyoshi, Y., Yonekura, K., Toyoshima, C., Namba, K. 1995. The structure of the R-type straight flagellar filament of Salmonella at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* 249:69-87.
- [22] Murray, G. L., Attridge, S. R., Morona, R. 2006. Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of Salmonella enterica serovar Typhimurium with macrophages and complement. *J. Bacteriol.* 188:2735-2739.
- [23] Nikaido, H., Vaara, M. 1987. Outer membrane, in: Neidhardt, F. C. et al., (Eds.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium; cellular and molecular biology, ASM, Washington DC, pp. 7-22.
- [24] Osawa, K., Shigemura, K., Iguchi, A., Shirai, H., Imayama, T., Seto, K., Raharjo, D., Fujisawa, M., Osawa, R., Shirakawa, T. 2013. Modulation of O-antigen chain length by the wzz gene in Escherichia coli O157 influences its sensitivities to serum complement. *Microbiol. Immunol.* 57:616-623.
- [25] Ramos Moreno A. C., Cabilio Guth, B. E., Baquerizo Martinez, M. 2006. Can the fliC PCR-restriction fragment length polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing the H antigen of enterotoxigenic Escherichia coli strains? *J. Clin. Microbiol.* 44:1453-1458.
- [26] Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Namba, K. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature.* 410:331-337.
- [27] Stevenson, G., Neal, B., Liu, D., Hobbs, M., Packer, N. H., Batley, M., Redmond, J. W., Lindquist, L., Reeves, P. 1994. Structure of the O antigen of Escherichia coli K-12 and the sequence of its rfb gene cluster. *J. Bacteriol.* 176:4144-4156.
- [28] Tran, E. N. H., Papadopoulos, M., Morona, R. 2014. Relationship between O-antigen chain length and resistance to colicin E2 in Shigella flexneri. *Microbiology (Reading).* 160:589-601.
- [29] von Mentzer, A., Connor, T., Wieler, L. H., Semmler, T., Iguchi, A., Thomson, N. R., Rasko, D. A., Joffre, E., Corander, J., Pickard, D., Wiklund, G., Svennerholm, A., Sjöling, A., Dougan, G. 2014. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) clades with significant long-term global distribution. *Nat. Genet.* 46:1321-1326.
- [30] Weil, E., Felix, A. 1917. Weitere Untersuchungen über das Wesen der Fleckfieber agglutination. *Wien. Klin. Wochensh.* 30:1509-1511.
- [31] Williams, F. D., Schwarzhoff, R. H. 1978. Nature of the swarming phenomenon in Proteus. *Annu. Rev. Microbiol.* 32:101-122.
- [32] 腸管出血性大腸菌感染症 2016年4月現在、

- 国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 37 p85-86: 2016 年 5 月号
- [33] 腸管出血性大腸菌感染症 2017 年 4 月現在、国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 38 p67-68: 2017 年 5 月号
- [34] 腸管出血性大腸菌感染症 2018 年 3 月現在、国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 39 p71-72: 2018 年 5 月号
- [35] 腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 3 月現在、国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 40 p71-72: 2019 年 5 月号
- [36] 腸管出血性大腸菌感染症 2020 年 3 月現在、国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 41 p65-66: 2020 年 5 月号
- [37] 腸管出血性大腸菌感染症 2021 年 3 月現在、国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 42 p87-89: 2021 年 5 月号
- [38] 腸管出血性大腸菌感染症 2022 年 3 月現在、国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 43 p103-104: 2022 年 5 月号
- [39] 腸管出血性大腸菌感染症 2023 年 3 月現在、国立感染症研究所所 病原微生物検出情報 Vol. 44 p67-68: 2023 年 5 月号

## “Past” and “Future” of *Escherichia coli* serotyping

Atsushi Iguchi

Department of Animal and Grassland Sciences,  
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki  
1-1 Gakuen-kibanadai-nishi, Miyazaki, Miyazaki  
Tel/Fax: +81-985-58-7507  
iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp

### **[Abstract]**

Serotyping is a method for distinguishing the diversity of antigenic substances expressed on the cell surface based on immunological specificity. In the field of bacteriology, serotyping system have been organized and standardized, especially for pathogenic bacteria, as a method for subclassifying isolates within the same species or as a method to support identification of genus or species. Since the 1990s, genome analysis and other methods have clarified the characteristics and overall picture of genes (clusters) that encode antigens responsible for serotypes, and based on these, various genetic methods have been proposed as alternatives.

In *Escherichia coli*, O-serogroups from O1 to O188 and H-types from H1 to H56 have been defined so far, and these combinations are called serotypes. *Escherichia coli* serotyping is widely used in research and investigations as a standard method for subtyping isolates. In this review, I will focus on *E. coli*, which is also associated with infectious diseases in humans and domestic animals, and review the details of antigenic characterization and determination of its serotypes. In addition, I would like to introduce the multiplex PCR method that can comprehensively determine serotypes that our group has been working on, and consider the future of serotyping methods.

**Keywords:** *Escherichia coli*, serotype, O-serogroup, PCR