

研究課題名:「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

## 分担研究報告書

分担研究者 泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部

**研究要旨** 本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主としてサルモネラを対象に遺伝子解析をベースとした疫学指標の開発、有用性の検討を主眼としている。近年、新たな疫学解析の手法として Multiple Locus Variable-number-tandem-repeat Analysis (MLVA)が注目されており、本研究でもサルモネラについて MLVA に利用可能と考えられるいくつかの遺伝子座に対して *Salmonella* Enteritidis および *S. Typhimurium* を対象に検討を行った。また、最近、豪州の志賀毒素産生性大腸菌にて報告された新規細胞障害性因子 Sub について、我が国における分布状況を調べた。

### A. 研究目的

腸管感染症起因菌、中でもサルモネラ、大腸菌を中心に、生化学性状、血清型、薬剤耐性、遺伝子型別等の比較を行うことで、広域にわたる感染事例の探知および国を越えた流行解析を可能にするシステムの構築に寄与する。

### B. 研究方法

PCR 等に関しては基本的に標準法による。マルチプレックスPCRは Qiagen 社の Multiplex PCR キットを使用した。PFGE は Pulsenet US の方法に従って実施した。ファージ型別には英国 HPA から提供された型別用ファージおよびスキームを使用した。

### C. 研究結果と考察

#### 1. MLVA

現在サルモネラ分離株の型別としては血清型別があり、同じ血清型の菌株をさらに型別するためにファージ型別、パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別などがある。近年、細菌の遺伝子型別の新たな着目点として VNTR (variable-number tandem repeat)が提唱され、これを複数の遺伝子座に対して適用した MLVA (multi-locus variable-number tandem repeat analysis)が各菌種において開発、検討がなされている。サルモネラでは既に血清型 Typhimurium、Enteritidis、Typhi、Paratyphi A などにおいてゲノ

ム解析が完了しており、MLVA が開発可能な状況にある。昨年度、構築したプログラムから MLVA の候補となりうる遺伝子座を選択していた(図 1-1 および図 1-2)。Typhimurium では Enteritidis では見られないリピートを有する遺伝子座がいくつか同定されており、さらに多剤耐性 Typhimurium DT104 のゲノムに特異的なリピート遺伝子座も同定されている。

上記の計 22 遺伝子座に関する PCR 反応を 2 本にまとめられるよう、マルチプレックス PCR の系を設計した。図 1-3 には本マルチプレックス PCR を行い、これをアクリルアミドゲル電気泳動した場合の泳動像(例)を示す。Typhimurium および Enteritidis においてほぼ良好な DNA 増幅が観察された。

MLVA は 6 塩基から数十塩基からなるリピート配列のリピート数の差を識別するため、シークエンサーによる電気泳動を必要とする。このため、上記マルチプレックス PCR の結果をもとに蛍光ラベルプライマーを作製し、同様の条件でマルチプレックス PCR を行った。図 1-4 には増幅産物をシークエンサーにて泳動した場合の泳動像(例)を示す。アクリルアミドゲル電気泳動をした場合と同様に良好な結果が得られた。

上記 MLVA の系を使用して *S. Typhimurium* および *S. Enteritidis* 分離株 40 株ずつを試験した。その結果、Enteritidis においてはバリエーションが観察される遺伝子座が少なかった。一方、Typhimurium では約半数の遺伝子座においてバリエーションが観察され、本 MLVA が有用であることが示唆された(図 1-5)。

## 2. Sub

Sub (subtilase-like cytotoxin) は 1998 年に豪州

で発生した集団事例の原因となった STEC O113 株において初めて同定、報告された、新規の細胞障害性因子である。Sub は本株では 166kb のプラスミド上にコードされており、その構造はいわゆる AB5 毒素様のものである。A サブユニットは subtilase 様のセリンプロテアーゼと相同性があり、宿主細胞の BiP を切断して小胞体ストレスを惹起することが知られている。

*subA* 遺伝子のセリンプロテアーゼに保存された残基をコードする領域を基にプライマーを設計し、我が国で分離された STEC 株を対象にスクリーニングを行った。その結果、試験した 951 株中 64 株 (6.7%) が陽性を示した。その血清型の内訳を図 2-1 に示す。血清群 O91 が多く見られ、OUT、O8、O128 などがそれに続いた。*subA* 陽性株は全て *eae* 陰性株であった。試験した 951 株中 *eae* 陰性株は 175 株であり (O157、O26 および O111 は試験せず)、これと併せると *eae* 陰性株の 37% が *subA* を保有していることが明らかとなった。

さらに増幅された DNA の塩基配列から *subA* には少なくとも 2 つのマイナーバリエーション ( $\beta$  および  $\gamma$ ) が存在することが判明した。inverse PCR を併用して各バリエーション *subAB* 遺伝子のほぼ全長の構造を決定したところ、オリジナル (O113:  $\alpha$ ) の *subAB* 遺伝子と比較してアミノ酸レベルで A サブユニットにおいて 94-5% 程度、B サブユニットにおいて 92-3% 程度の相同性があることが判明した(表 2-1 および図 2-2)。

各バリエーションに対して特異的なプライマーを用いたマルチプレックス PCR を考案し(図 2-3)、*subA* 陽性株を試験したところ、 $\alpha$  および  $\gamma$  がそれぞれ優勢であることが明らかとなり、各バリエーションが単独ではなく複数保有されていることが示唆された(図 2-4 および 2-5)。

#### D. 結論

本研究のマルチプレックスPCRを用いたサルモネラ MLVA に関しては、現在のところ *S. Typhimurium* での有用性が示唆された。今後さらに検体数を増やして試験することで、個々の遺伝子座におけるバリエーションの程度や全体的な分解能について検討していくことが必要であると考えられる。

Sub に関しては、*eae* 陰性株を中心に我が国の STEC 分離株でも *sub* 陽性株があることが明らかになった。豪州のみならず他国での分布についても情報が必要となってくるであろう。さらに *sub* にバリエーションがあることや複数種の *sub* が一つの STEC 株に保有されることが本研究で示唆され、今後バリエーション遺伝子の構造および機能についてさらに解析すべきと考えられる。

#### 参考文献

1. Morita, M., Mori, K., Tominaga, K., Terajima, J., Hirose, K., Watanabe, H., and Izumiya, H.: Characterization of lysine decarboxylase-negative strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis disseminated in Japan. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46 : 381-385, 2006.

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究」

分担研究課題名：「病原性大腸菌の侵入監視に関する研究」

分担研究者	伊豫田 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	陸 彦	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	佐藤 人美	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	齊藤剛仁	国立感染症研究所	感染症情報センター

#### 研究要旨

ヒトから単離される腸管出血性大腸菌(EHEC)の大部分はLEEと呼ばれる病原性遺伝子群を保有し、これらの機能発現によって腸管上皮細胞へ強固に接着する。EHECはLEE保有型と非保有型に分けられる。今年度の研究では、LEE保有型のEHECにおいてLEE遺伝子群の発現制御に関わるGrlR-GrlA制御システムが細菌の運動器官である鞭毛の発現を制御していることを明らかにした。一方、LEE非保有型EHECでは、昨年度同定した新規の接着遺伝子*eibG*の種々の大腸菌における分布を解析すると共に、*eibG*を保有する株の系統解析をMLST(multi-locus sequence typing)法によって行った。

#### A. 研究目的

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌(EHEC)の約80%は血清群O157, O26またはO111の三大血清群に分類される。これまでの我々の研究から、三大血清群のほとんどすべてはLEE(locus of enterocyte effacement)と呼ばれる病原性遺伝子群を保有し、腸管上皮細胞へ強固に接着することが明らかとなっている。一方、LEEを保有しないEHECによる感染事例も毎年数多く報告されており、LEE以外の宿主細胞接着因子についてもその実体を明らかにする必要性が生じている。三大血清群以外のEHECの約40%はLEEを保有しないタイプ(LLEE非保有型EHEC)である。ところで、日本を除くアジア諸国では現在のところEHECによる感染事例報告はほとんどないものの、食品や食材又は環境中から分

離されるケースが増えており、邦人が海外でEHECに感染するケースは繰り返し報告されている。これらの原因菌として分離されるEHECはその多くが三大血清群以外のEHECであり、LEE非保有型EHECの割合も高い。そこで、本研究では、これらの非典型的なEHECの血清型や遺伝子型情報を基にまずEHECをLEEの保有型と非保有型に分類する。LEE保有型EHECについては病原性の初期段階に最も重要なLEE遺伝子群の発現制御ネットワークについて分子レベルで解析を進め、感染初期の分子基盤の理解に努める。一方、LEE非保有型EHECでは既知の病原性遺伝子群の分布状況および初期接着に必要な遺伝子群の同定を行い、その分布状況を解析することで、LEE非保有型EHECの疫学マーカーと

なりうる病原性遺伝子の同定とその検出系の構築を目指す。以上の知見から、今後アジア各国で発生した場合に国内への侵入も懸念される EHEC 感染症の侵入監視に資することを目的とする。

## B. 研究方法

1) 欠失変異体の単離: Datsenko and Wanner (P.N.A.S 97:6640-6645, 2000)らの方法によって欠失変異株を構築した。LEE保有型 EHEC O157 の野生株としては Sakai 株を用いた。

2) 培養上清中蛋白質の調製: LEEにコードされるタイプ3蛋白質の分泌量はDMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培地で振とう培養した上清12mlを0.45 $\mu$ mのフィルターで滅菌後、トリクロロ酢酸溶液(最終濃度10%)で濃縮沈殿させ、常法に従ってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロットングに供した。

3) HeLa (または HEp-2) 細胞への感染実験: DMEM(またはLB)培地で培養した菌体( $1 \times 10^7$ )を $1 \times 10^5$ 個の細胞へ感染させ、ギムザ染色液または bis-benzimide H33342 (Calbiochem) と rhodamine-phalloidin (Molecular probes) で染色し、顕微鏡観察を行った。

4) lac assay: LBで培養した菌体を用い、定法に従ってアッセイを行った。

5) 組換え DNA 技術および DNA シークエンス: 定法に従って行った。

6) MLST: ハウスキーピングな7つの遺伝子 (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, *uidA*) の塩基配列の違いから、系統学的な解析を行う。

## C. 研究結果と考察

1. LEE 遺伝子群の発現制御に関わる遺伝子の解析: LEE 遺伝子群の転写発現は、LEE 内部

にコードされる制御因子 Ler によって正に制御され、Ler の発現は同じく LEE 領域内にコードされる GrlA と GrlR によってそれぞれ正および負に制御されている。したがって、GrlR の欠失変異株では、GrlA は発現および蛋白質レベルで脱抑制を受けるため、Ler の発現上昇を介して LEE 遺伝子群の発現が上昇する。昨年度の研究から、GrlR の細胞内量をコントロールするプロテアーゼ複合体として、ClpX/ClpP を同定した。ClpXP の欠失変異体では GrlR の細胞内量が増殖期にかかわらず一定となり(野生株では LEE の発現が上昇する対数増殖期後期に GrlR の細胞内量は最少となる)、LEE の発現は低下するが、同時に、細菌の運動器官である鞭毛を構成する蛋白質(FliC)の発現が顕著に低下していることが明らかとなった(図1)。そこで、鞭毛遺伝子の発現レベルおよび菌の運動性、鞭毛数について解析を行ったところ、GrlR 欠損によって鞭毛遺伝子の発現が顕著に低下し、その結果、鞭毛形態形成および運動性が顕著に阻害されることを見出した(図2)。GrlR と GrlA の二重欠損株ではこれらの効果は見られないこと、さらに、GrlA の過剰発現株では GrlR 欠損株と同様な表現型が見られることから、GrlR 欠損下での鞭毛発現抑制は GrlA を介していると考えられる(図3)。以上の結果は、GrlA は LEE 遺伝子発現の正の制御因子として機能する一方、鞭毛発現の負の制御因子として機能することを示している(図4)。なお、GrlA による鞭毛遺伝子の発現抑制は、鞭毛レギュロンのマスターレギュレーターをコードする *flhD* オペロンの転写発現レベルで行われていることが lac assay の結果から明らかとなった(表1)。この発現制御機構の生物学的意義を探るため、鞭毛のマスターレギュレーターである FliH/FliC を構成的に発現可能なプラスミド

を導入した EHEC 株を構築し、培養細胞への接着能を解析した。その結果、鞭毛を構成的に発現した EHEC 株は野生株で見られたようなマイクロコロニー形成およびアクチンの集積に特徴付けられる細胞傷害性が見られないことが判明した(図 5)。以上の結果から、鞭毛発現は LEE の発現と協調的に制御されていることが明らかとなった。

LEE 遺伝子群の発現制御機構を解明することは EHEC の感染初期段階における必要遺伝子セットを知る上で重要であり、その知見は病原体の侵入監視を行う上で広く活用出来ると期待される。今後、上記の研究で明らかとなった制御遺伝子にコントロールされる新規遺伝子を同定し、これらの新規遺伝子の機能解析および疫学的マーカーとしての重要性を明らかにすることで、今後これらの知見を監視体制の強化に資する。

## 2. LEE非保有型 EHEC の病原性遺伝子の解析

国内で単離される EHEC の大部分は血清群 O157,O26 および O111 に属するが、これ以外の血清群の EHEC による感染事例も近年数多く報告されている。今年度に単離された EHEC 株(2,856 株)の血清型別の解析から、依然として O157、O26、および O111 の EHEC が数多く単離されていることが確認された。O157、O26、O111 以外の血清群に属する EHEC 株のうち、約 40% が LEE を保有しない株である。昨年度の研究から、LEE 非保有型 EHEC 株に存在する接着遺伝子の一つとして、免疫グロブリン結合蛋白質をコードする *eibG* が同定された。*eibG* を検出可能な PCR を用いて、国内外で単離された EHEC 株を含む下痢原性大腸菌および常在性大腸菌における分布を解析した。その結果、血清群 O91 の志賀毒素産生性大腸菌の約半数が *eibG* を保有することが明らかとなった。O91 以外の血清群に属

する志賀毒素産生性大腸菌のうち、*eibG* 陽性となった株の血清群は O128, O146, O38 などであった。ECOR 株(72 株)の常在性大腸菌セットと他のカテゴリーに属する下痢原性大腸菌における分布解析から、これまでのところ、*eibG* 陽性の株は存在しない。*eibG* 陽性となった志賀毒素産生性大腸菌の由来について解析するため、MLST による系統解析を行った。その結果、常在性大腸菌が数多く分布する B1 または A グループに *eibG* 陽性の O91 株が分類されることが判明した。これらの株については、H 型の違いにかかわらず、*eibG* の有無によって異なるサブグループに分類出来ることが判明した。

EibG は他の Eib 蛋白質と共通な C 末端の 9 アミノ酸に、細胞壁に局在するためのアミノ酸配列が存在する。また、中央部には、他の Eib 蛋白質あるいは Invasion 等に共通な Hep\_Hag リピート構造が見られる。そこでこれらの部位の欠失型遺伝子を作製し、IgG への結合能および宿主細胞への接着能を解析した。その結果、いずれの欠失体も Eib 蛋白質に共通な特徴である、多量体形成能は阻害されることが判明した。C 末端側の 9 アミノ酸を欠失した EibG は IgG 結合能も宿主細胞への結合能も共に失われるが、一方、内部の Hep\_Hag リピートを含む 168 アミノ酸の欠失型 EibG は宿主細胞への接着能は失われるものの、IgG への結合は保持したままであった。以上の結果は、内部の Hep\_Hag リピートを含む 168 アミノ酸は IgG 結合に必須ではないことが示唆された(図 6)。

## D. 結論

### 1. LEE 遺伝子群の発現制御に関わる遺伝子の解析

・LEE 発現の負の制御因子である GrIR の欠失株

では LEE 遺伝子発現が脱抑制される一方、鞭毛遺伝子発現が顕著に阻害される。

・GrlR 欠損株での上記の表現型は GrlR によって抑制を受ける GrlA の機能によるものである。すなわち、LEE にコードされる LEE 遺伝子発現の正の制御因子 GrlA は鞭毛レギュロンの負の制御因子として機能する。

・GrlA による鞭毛遺伝子発現抑制は鞭毛レギュロンのマスターオペロンの転写抑制に起因する。

・鞭毛マスターオペロンを構成的に発現させた EHEC 株では培養細胞への接着が阻害される。

・GrlA による鞭毛遺伝子発現抑制は EHEC が宿主の腸管上皮細胞へ効率よく定着するために必須の制御であると考えられる。

## 2. LEE非保有型 EHEC の病原性遺伝子の解析

・今年度国内で単離された EHEC 株(2,856 株)の血清型別の解析から、依然としてその大部分は O157、O26、O111 の血清群に分類される。

・血清群 O91 の志賀毒素産生性大腸菌の約半数は *eibG* を保有する。

・他の血清群に属する志賀毒素産生性大腸菌のうち、血清群 O38、O146 および O128 に *eibG* が存在した。

・ECOR 株(72 株)の常在性大腸菌セットと他のカテゴリーに属する下痢原性大腸菌での *eibG* の分布を解析したが、これまでのところ、陽性の株は存在しなかった。

・MLST によって *eibG* 陽性となった志賀毒素産生性大腸菌の系統解析を行った。その結果、常在性大腸菌が数多く分布する B1 または A グループに分類されることが判明した。

・血清群 O91 の志賀毒素産生性大腸菌については、H 型の違いにかかわらず、*eibG* の有無によって異なるサブグループに分類された。

・C 末端の 9 アミノ酸を欠失した EibG は IgG 結合能も宿主細胞への結合能も共に失われた。

・内部の Hep\_Hag リピートを含む 168 アミノ酸の欠失型 EibG は宿主細胞への接着能は失われるものの、IgG への結合は保持したままであった。

・内部の Hep\_Hag リピートを含む 168 アミノ酸は IgG 結合に必須ではないことが示唆された。

## 参考文献

1) Iyoda, S., Kozumi, N., Satou H., Lu Y, Saitoh, T., Ohnishi, M and Watanabe, H.: The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 188: 5682-5692, 2006.

2) Lu, Y., Iyoda, S., Satou, H., Satou, H., Itoh, K., Saitoh, T. and Watanabe, H. A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Infect. Immun. 74, 5747-5755, 2006.

3) Leotta, G., Deza, N., Origlia, J., Toma, C., Chinen, I., Miliwebsky, E., Iyoda, S., Sosa-Estani, S. and Rivas, M. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. Vet. Microbiol. 118, 151-157, 2006.

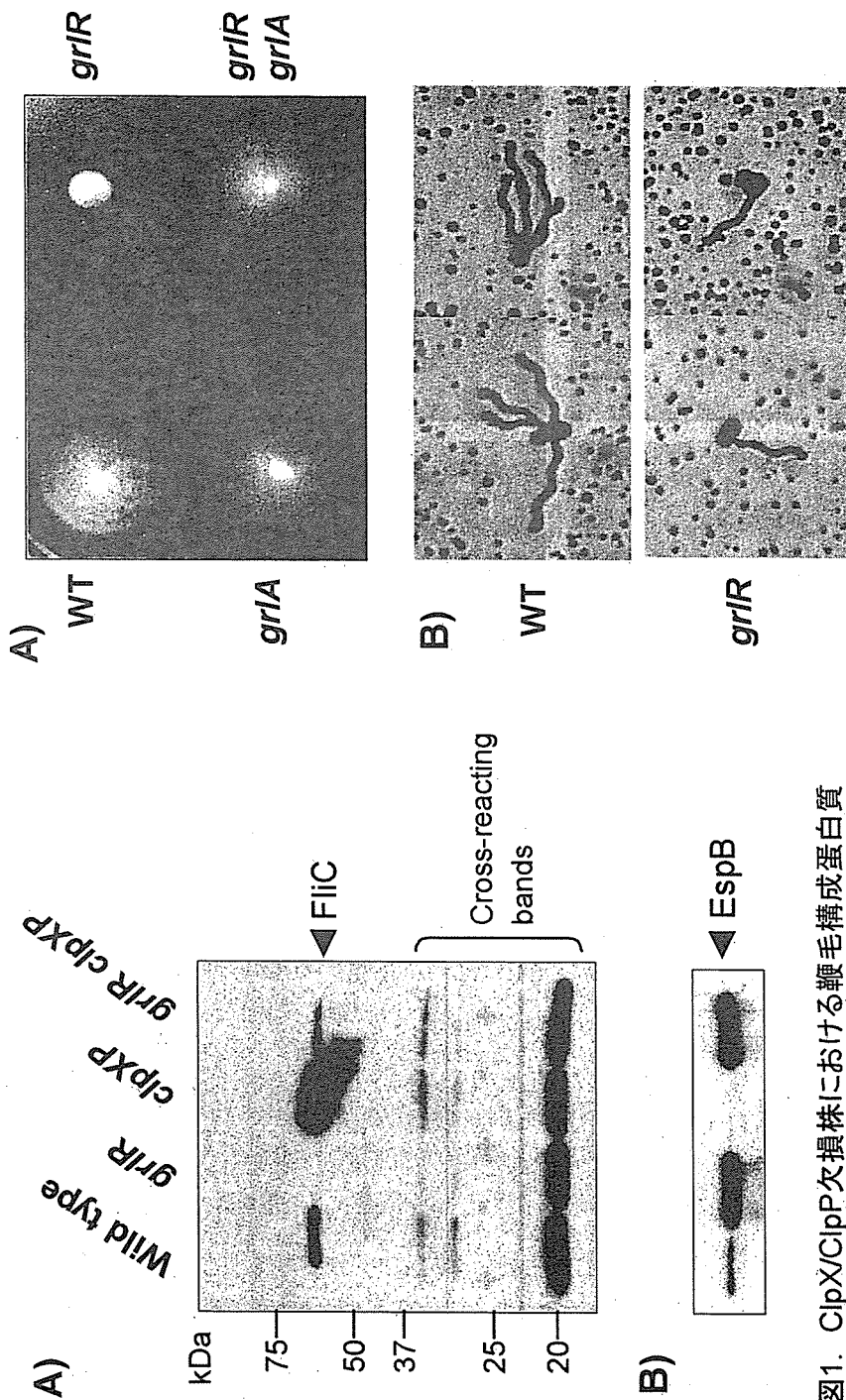


図1. ClpX/ClpP欠損株における鞭毛構成蛋白質 FliCの過剰発現とGrIR欠損株における FliCの発現抑制効果。A) LB培地中で培養した全菌体蛋白質の抗FliC抗体を用いたウエスタンブロットティング、B) A)と同じサンプルを抗EspB抗体でウエスタンブロットティング

図1. GrIR-GrlAシステムによる運動性および鞭毛形態形成の制御

- A) 軟寒天平板培地上でのスウォーム形成
- B) GrIR欠損株での鞭毛数の変化



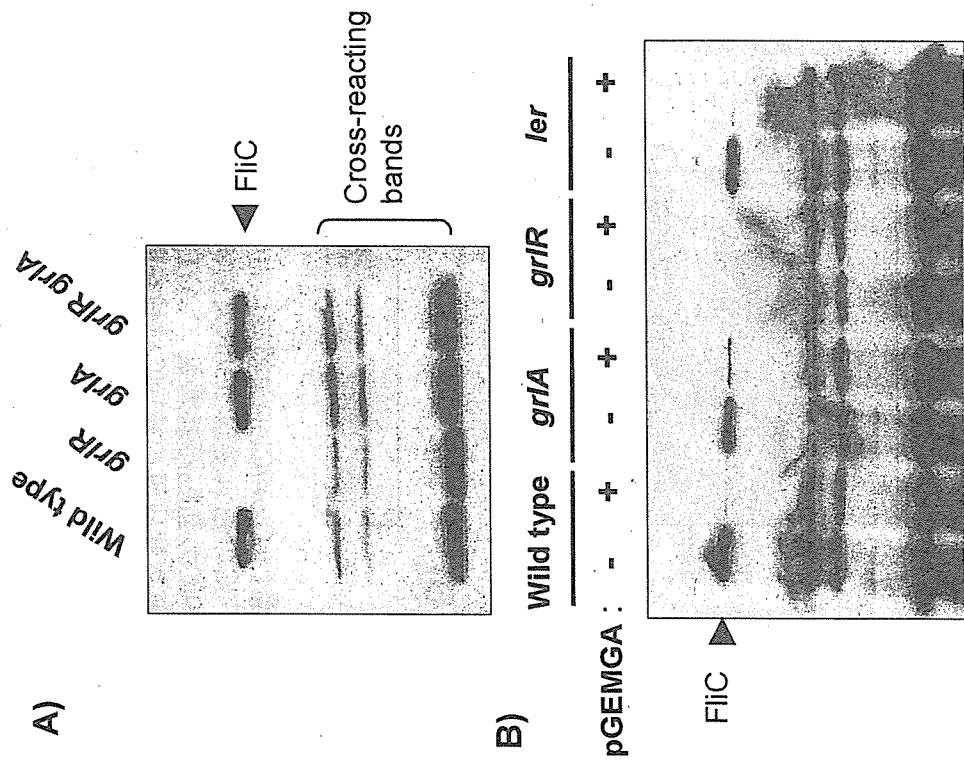


図3. GrIR欠損株でのFliC発現抑制はGrIAの効果による。  
 A) 図1A)と同様. B) GrIAの過剰発現によるFliCの発現抑制効果.

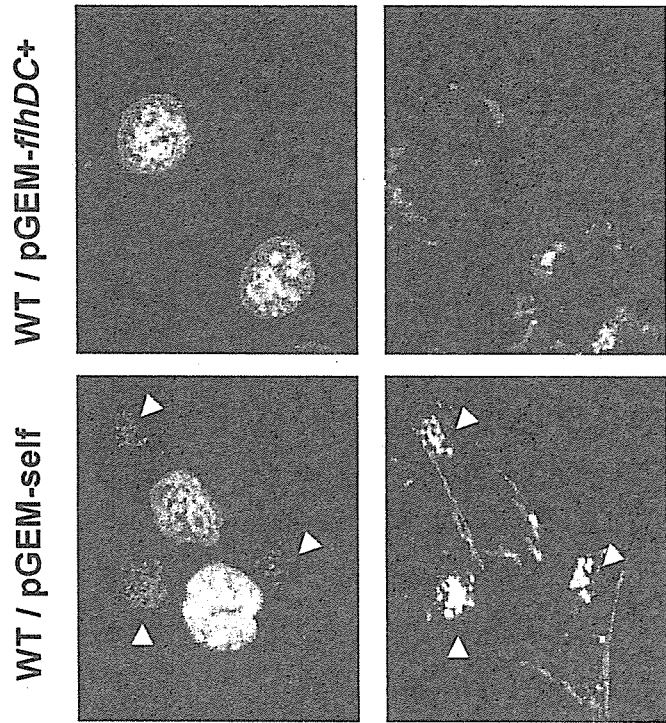


図5. コントロールベクターを持つ野生株(左側2パネル)とFlhD/FlhCを構成発現する野生株(右側2パネル)のマイクロコロニー形成(上段2パネル)とアクチン凝集塊(下段2パネル).

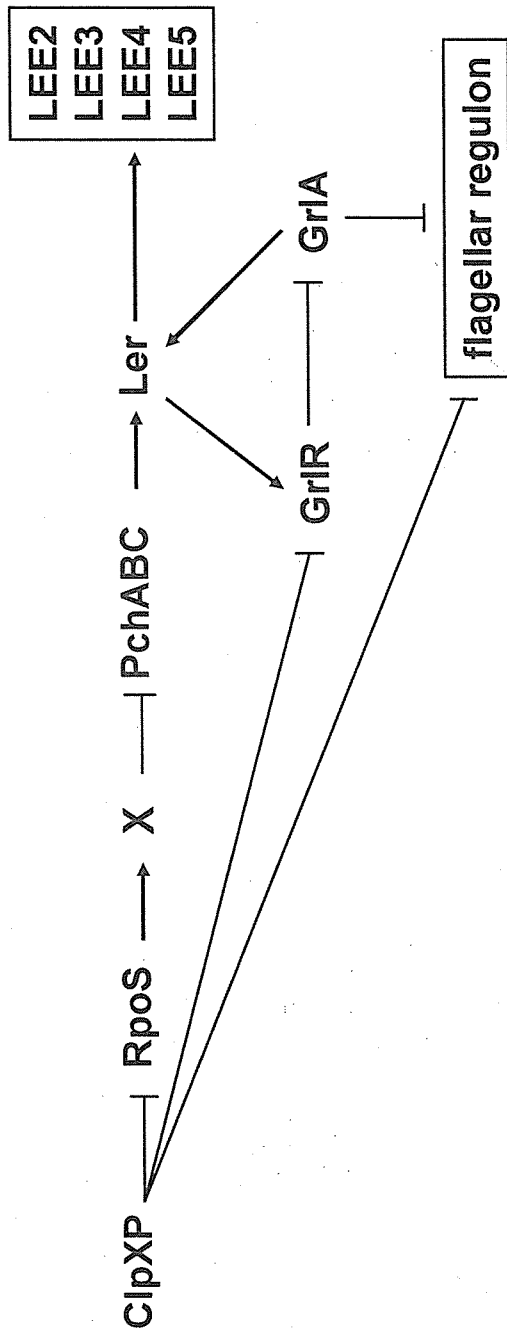


図4. GrlR-GrlA制御システムのLEE発現および鞭毛レギュロンの発現制御カスケード

表 1. GrlR-GrlA system controls promoter activity of *flhD*, *flgA*, *fljC* and *ler* genes.

Strain (number)	$\beta$ -galactosidase activity, Miller units (SD)				
	pRL124	pRLFHD	pRLFGA	pRLFIC	pRLLER
wild type	15.8 (5.07)	2670 (284)	717 (76.5)	1720 (98.7)	7600 (410)
<i>grlR</i>	18.8 (7.04)	1240 (199)	87.9 (3.18)	147 (4.76)	23800 (1600)
<i>grlA</i>	19.3 (3.27)	3400 (250)	869 (210)	2130 (118)	4390 (515)
<i>grlR grlA</i>	23.1 (5.11)	3130 (138)	848 (87.2)	2000 (313)	not done

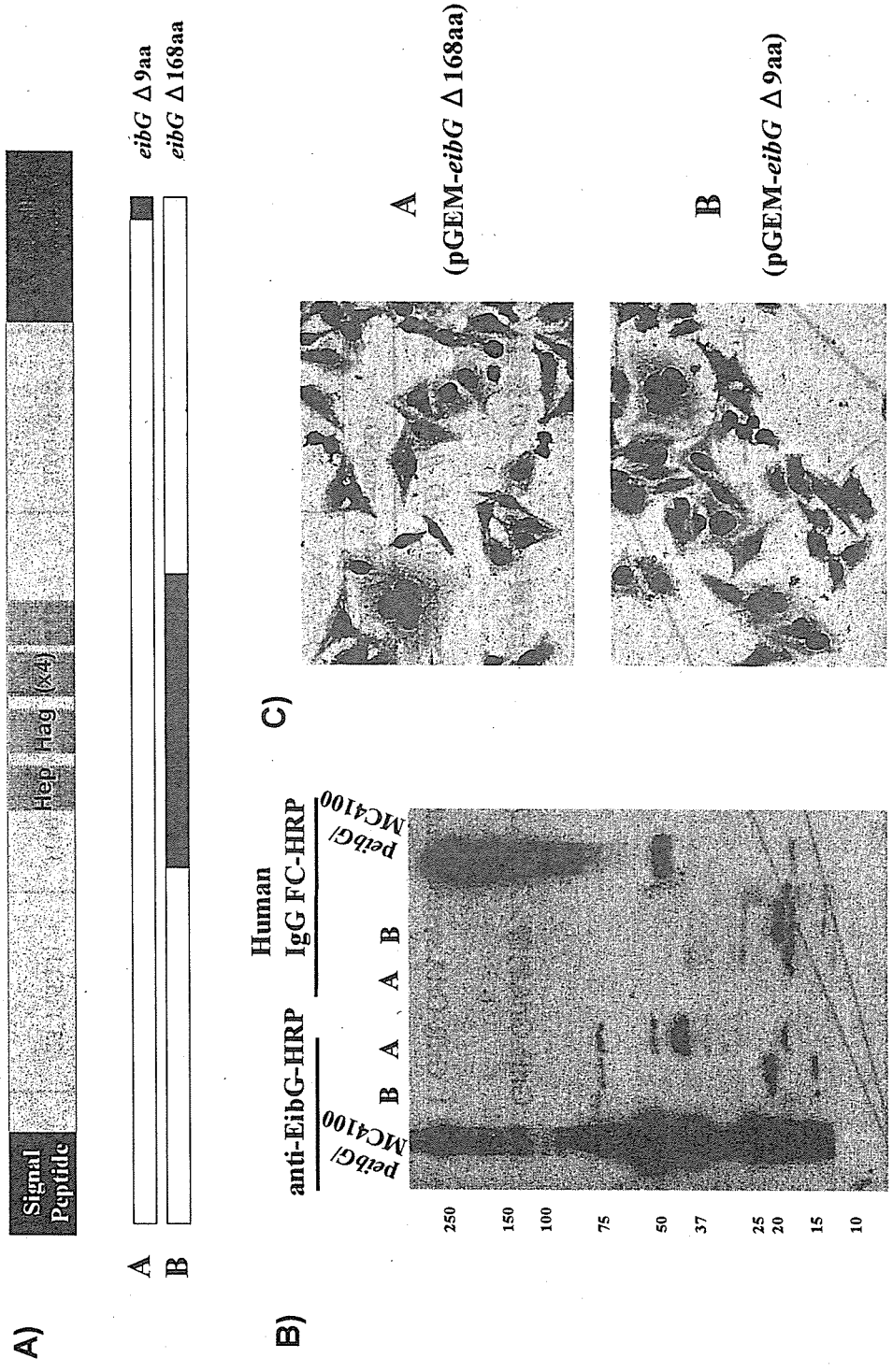


図6. EibGのドメイン解析 A) EibGのドメイン構造 B) IgG結合能の解析. 左側3カラム, 抗EibG抗体-HRP; 右側3カラム, ヒトIgG-HRP. C) HEp-2細胞への接着能.

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

分担研究者 三戸部 治郎

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨：アジア地域における病原体ネットワークの構築には各国の情報の共有という面から、なるべく簡便な疫学タイピング法が望ましく、各国の予算、技術レベルの違い等の問題から、どのような国でも利用できる単純な方法も模索する必要があると考えられる。日本の赤痢症は主としてアジア地域からの輸入例が大半を占めるが、最近既存の血清型に凝集しない赤痢菌株がしばしば分離されており、アジア地域でも同様の状況が報告されている。こうした株を赤痢菌の4亜群に分類するため、生化学的性状が用いられるが、ごく限られた性状が分類の基準になるため、同定を誤る可能性がある。生化学的性状によらずアジアの多くの地域で利用できる、簡便な分類方法を求めて、赤痢菌を亜群に分別することを目的とした分子疫学的タイピング法の開発を行った。

#### A. 研究目的

赤痢菌は生化学的性状によって4亜群に分かれ、決定される菌名も疫学上、重要な指標といえる。その分類は生化学的性状によるが、1~2種類のごく限られた性状の陰性も含めた組合せで決定されるため、実際には各群に分類された菌に特異的な抗血清を作製し、その混合血清を用いて4菌群の判別を行っている(1)。こうしたことから、血清に反応しない新しい株が出現する可能性は常に存在し、また生化学的性状のみでは同定を誤る可能性がある。

赤痢菌は遺伝的には不活発な生化学的性状をもつ大腸菌群の1亜型であり、同一菌種の多様性を分類するための分子疫学的方法であるMLST法を用いれば、確実な分別は可能であるが、1株の同定について8ヶ所以上のシーケンスを行って同定することが必要であり、アジア地域で利用可能な、より簡便なタイピング法も求められる。一方、グラム陰性菌のゲノム中にはREP

(Repetitive Extragenic Palindromic) やERIC (Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus) といった繰返し配列が存在し、その繰返し数が大腸菌群の間で多様性があることが報告されている(2)。当研究ではMLST法に替わる簡便な分類方法として、赤痢菌ゲノムに含まれる繰返し配列を用いて、各群に分類する方法を開発、検討した。

#### B. 研究方法

大腸菌ゲノム上の繰返し配列ERICとREPに対するプライマー群を作製し、利用可能なプライマーを判別した。良好な結果が得られたプライマーを用いて、赤痢菌4亜群、計46株の血清型Type strainおよび、赤痢菌臨床分離株のゲノムDNAを増幅し比較した。

<プライマー>

ERIC1 5'-GTGAATCCCCAGGAGCTTACAT-3'

ERIC2 5'-CGCTCACCCAGTCACTTACTT-3'  
 ERIC1R 5'-CTTATGTAAGCTCCTGGGGATT-3'  
 ERIC2R 5'-AGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

以下は参考文献(5)参照

REP1R-1 5'-IIIIICGICGICATCIGGC-3'  
 REP1Rdt 5'-IIINCGNCGNCGATCNGGC-3'  
 REP2-1 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'  
 REP2D 5'-RCGYCTTATCMGGCCTAC-3'

### <ゲノムDNA調製>

#### 1) *EcoR* strain collection (3)

EcoR4, 15, 16, 21, 22, 24, 37, 38, 43,  
 44, 45, 47, 48, 65, 68, 69 (計16株)

#### 2) *Shigella* Type strains

A群: *S. dysenteriae* type1~type15  
 B群: *S. flexneri* type1a~type6  
 C群: *S. boydii* type1~type18  
 D群: *S. sonnei* I相

#### 3) *Shigella*臨床分離株

A群: *S. dysenteriae* 2株  
 B群: *S. flexneri* 12株  
 C群: *S. boydii* 2株  
 D群: *S. sonnei* 24株 (I相 II相)  
 型別不能株 1株

### <PCR条件>

genom DNA	1 $\mu$ l
primer (100 mM)	1 $\mu$ l
dNTP (each 2.5mM) (Takara)	1.6 $\mu$ l
10x PCR buffer (Takara)	2 $\mu$ l
ExTaq DNA polymerase (Takara)	0.2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ l

94°C	5min	40X
94°C	0.5min	
40°C	1min	
72°C	2.5min	
72°C	2.5min	

ゲノムDNAはLBプレートにて30°C、1晩培養し

た赤痢菌コロニーを直接 20  $\mu$ l TE buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)に懸濁し、98°C 10分加熱し4°Cで保存した。*EcoR* strainのゲノムDNAは(国立感染症研究所・細菌第一部、伊豫田淳博士提供) LB培地で37°C1晩培養した菌体よりQIAGEN社のDNA抽出キット (DNase Easy kit)を用いて精製し、TE bufferで10倍希釈したものを用いた。PCR産物は10  $\mu$ lを1x TAE, 1.2% SeaKem GTG agaroseゲルで、Mupid泳動槽を用いて50V 60分間泳動し、5  $\mu$ g/mlエチジウムブロマイドで15分染色、脱イオン水で15分洗浄後、ライトキャプチャー™ (ATTO)にて撮影した。PCRはABIサーマルサイクラー™ 9600ないし9800にて同様の増幅を確認した。

凝集反応はLBプレート上の菌体を20  $\mu$ l PBSに懸濁し、スライドグラス上で赤痢菌診断用抗血清(デンカ生研)1滴と1分間混合して判定した。

### C. 研究結果と考察

初めに計8種のERIC/REPプライマーを用いて、赤痢菌のゲノムDNAを増幅する事で各プライマーの分別能を検討したところ、多くは多数のバンドが出現したが、ERIC1Rプライマーを用いた場合、最もバンド数が少なく良好な分別能が見られた。

次にERIC1Rプライマーを用いて、遺伝的多様性が明らかな計16株の*EcoR* strain collection(3)を用いて増幅を行ったところ、全ての株で異なったバンドが見られたことから、相互の遺伝的な関係は示さないものの、株間の多様性の分別は可能であると考えられた(図1)。

また、テンプレートとして用いるゲノムDNA

の精製法によって出現するバンド数の差異が認められた。EcoR strainのゲノムDNAはQIAGEN社のキットで精製しており、全体として薄いバンドや、大きいサイズのバンドが多く出現した(図1)。逆に熱処理で抽出したテンプレートではこうしたバンドは抑制され、当研究の目的には向いていると考えられた。

次に国立感染症研究所・細菌第一部で保存している計46株の赤痢菌血清型Type strainからゲノムDNAを抽出し、ERIC1Rプライマーを用いて同様にPCRを行い、それぞれの泳動パターンを比較した。

その結果、亜群ごとに特定の泳動像を示す傾向がみられ、特にB群(*S. flexneri*)の6型を除いたすべての血清型で700bp付近に泳動される単一の泳動像を示した(図2)。*S. flexneri* 6型はMLSTを用いた分類法において、他の*S. flexneri*が全てMLSTのD群に分類されるのに対してMLSTのA群に分類されることが示されており(4)、この知見を再現する知見が得られた。

またD群も同様にI相(図2)とII相(図3)で800bpと1400bp付近に泳動される同一の泳動像を示し、病原性プラスミド上の配列を認識していない事が示された(図3)。C群では臨床分離株で検証を行ったところ、900bpと1200bp付近に二本のバンドを示すものが多く、型番号が大きくなるに従い、バンドの分散が大きくなる傾向が見られた(図2、図5)。

A群は最も泳動像の分散が多かったが、これは生化学的性状で、マニトール非発酵性だけが分別の指標になっていることと対応しているように思われた(1)。それでも15株中7株(3, 4, 6, 8, 9, 13, 15)は700bp付近に強いバンド、1300bp付近に弱いバンドを示す泳動像が得ら

れた。志賀毒素を保有するA群1型(志賀菌)は、他のA群と異なりカタラーゼ陰性の生化学的性状をもつが、泳動像も他のA群と大きく異なっていた(図2)。

さらに国立感染症研究所・細菌第一部で保有している赤痢菌群の臨床分離株についてERIC1Rプライマーを用いて同様にPCRを行い、型別が可能かどうか検討した。全ての株は混合血清で型別されており型別不能株が1株含まれていた。

臨床分離株として最も分離数が多いD群で検討したところ、分離地域と年代が20年以上異なる24株全てでType strainと同じ泳動パターンを示し、I相とII相株の差異は見られなかった(図3、RはType strain。レーン1から7がI相。レーン8から15がII相菌)。

同様に由来と年代の異なるB群の12株もすべてType strainと同じバンドを示した。12株中1株だけ6型のパターンを示した株(レーン1、矢印)は、B群6型に対する抗血清によって凝集した(図4、RはType strain)。

分離数が少ないC群は2株(図5、矢印Sb1, Sb2)あり、Sb1株はType strain14型に比較的近い泳動像を示し、C群14型に対する抗血清で凝集したが、これと似たSb2株は泳動パターンが全く異なるC群4型、6型双方の抗血清で凝集したため、混合血清ではC型に分類されるが特異的な血清がない株と考えられた(図5)。

同様にA群は2株(図6、矢印Sd1, Sd2)であったが、Sd1株はA群で比較的多い泳動像(3, 4, 6, 8, 9, 13, 15前述)を示しA群4型の抗血清で凝集した。Sd2株は2型に近似した泳動像を示しA群2型の抗血清で凝集した(図6)。

さらにA群とC群の混合血清で凝集するため

型別不能で、生化学的性状がA群と同定されている1株について同様に検討を行った。ERIC1Rプライマーによる増幅ではA群の5、7、11に泳動像に似ているものの、800bp付近のバンドの濃度が弱く、1000bpと1100bp付近に弱いバンドが2本認められた(図7、右端、UT)。

ERIC1Rプライマーによる増幅で比較的近似していたA5, A7, A11に対して同一のPCR条件で、ERIC2, REP1R, REP2プライマーを用いて増幅したところ、REP1RでA5ないしはA11に、REP2ではA11(図8、矢印)に、ERIC2ではA5, A7, A11全てが示す同一のバンド(図8、A、矢印)に近似しており、凝集の起こるC群のコントロールとは類似していないことから、ゲノム構成上もA群に属することが予想された(図8)。

#### D. 結論

ゲノム上の繰返し配列ERICに対するプライマーを用いてPCRを行ったところ、亜群ごとに特定の泳動像を示す傾向がみられ、とくにB群(*S. flexneri*)では6型を除きすべて同一のバンドを示した。臨床分離株で検証を行ったところ、年代と地域の異なるB群の12株もすべてType strainと同じバンドを示し、6型のパターンを示した株は6型血清で凝集した。

また、D群(*S. sonnei*)はI相とII相の二種類しか血清型は存在しないが、臨床分離株で検証すると、相や分離年代に関わらず全てType strainと同一のバンドを示したことから、亜群の判別に使用できる可能性が得られた。

A群とC群に関してはType strainの間で泳動像の差異が多かった。これらの亜群は各血清型間に有意の抗原関係がなく、元々Type strainを分類したときに用いられた生化学的性状が1

〜2種類と限られているうえ、陰性であることが指標になるため(1)、遺伝的なグループ分類と完全には相関していなかったことが予想される。逆にD群は指標となる陽性の生化学的性状が3種類あり遺伝的に均一な集団に分類されていることが予想された。

今後、分離頻度の低いA群(*S. dysenteriae*)、C群(*S. boydii*)に関して分離能の検討を行う予定である。また、アジア地域においても血清型不明な赤痢菌が分離されており、菌株を収集し上記タイピング法が使用可能か検討する予定である。

#### <参考文献>

1. 坂崎利一編 2000. 食水系感染症と細菌性食中毒 p140、中央法規出版
2. Bachellier, S., J. M. Clement, M. Hofnung, and E. Gilson. 1997. Genetics 145:551-62.
3. Ochman, H., and R. K. Selander. 1984. J Bacteriol 157:690-3.
4. Pupo, G. M., D. K. Karaolis, R. Lan, and P. R. Reeves. 1997. Infect Immun 65:2685-92.
5. Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991. Nucleic Acids Res 19:6823-31.

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究」

ExPEC の解析

分担研究報告書

分担研究者 大西 真

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 病原性大腸菌は大きく 2 つに分けられる。一つは下痢を主な症状とする腸管病原性大腸菌であり、他方は尿路をはじめとする腸管外に様々な病変を惹起する腸管外病原性大腸菌である。腸管病原性大腸菌は、その病態と所有病原因子プロファイルからさらに腸管出血性大腸菌 EHEC 等に細分化され、それぞれのその病原メカニズム・疫学解析などが詳細に解析されてきた。しかしながら、腸管外病原性大腸菌に関しては十分な解析がなされておらず、未だ病原性に関して未解明な部分が多く残されている。そのような状況では、十分な疫学解析を行うことは困難である。本研究では、腸管外病原性大腸菌の分子系統解析から疫学解析の基盤情報を供することを目的として行った。その結果、腸管外病原性大腸菌の多くは系統 B 2 に属する大腸菌であることを示されたが、さらに系統 B 2 内で少なくとも 7 つのサブクラスが存在することが明らかとなった。これらの情報は腸管外病原性大腸菌の疫学解析に役立つものと考えられる。

#### A. 研究目的

膀胱炎・腎盂腎炎・前立腺炎・敗血症・髄膜炎など腸管外に様々な病変を惹起する腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) と総称される大腸菌が存在する。下痢病原性大腸菌がこのような腸管外病原性を持つことは知られておらず、腸管内では非病原性である大腸菌が腸管外に侵入した場合、その一部が病原性を示すと考えられている。しかしながら、下痢病原性大腸菌とは異なり、ExPEC の病原機構とその背景にある病原因子との関係について

は未だ未解明な部分が多い。さらに、膀胱炎・腎盂腎炎・前立腺炎・敗血症・髄膜炎のような様々な病態がどのような大腸菌によって引き起こされているのかについても解析は進んでいない。

下痢病原性大腸菌と比較して ExPEC においては未解明な部分が多いことから、これまで ExPEC に対応した分子疫学解析手法が十分に整備されていなかった。ExPEC の系統分類を確立してはじめて国内で分離される菌株の解析、アジア諸国で見いだされる菌株の解析と、国内外の比較解析が可能になると考えられる。そこで平成 17 年度から継続して、ExPEC の惹起する病態のひとつである急性単純性膀胱



炎患者由来大腸菌の系統解析を行った。さらに、新生児髄膜炎、腎盂腎炎、前立腺炎由来大腸菌の系統解析を行った。

## B. 研究方法

**菌株の収集** 急性単純性膀胱炎患者由来菌株は宮崎大学泌尿器科 濱砂先生により分離収集された28菌株が分与された。腎盂腎炎、前立腺炎由来大腸菌は兵庫医科大学 山本新吾先生に収集された菌株、それぞれ72株、48株が分与された。新生児髄膜炎由来菌株7株は北里研究所生方先生より分与された。さらに大腸菌コレクション ECOR collection を72株も解析に供した。

**血清型別** O抗原型別はスライド法により行い、K1抗原に関しては、大腸菌夾膜抗原K1型に対する抗体を用いたラテックス法により決定した (Wellcogen N. meningitides B/E. coli K1)。

### 系統解析

(i) PCR : Clermont, O. et al. によるPCR法を用いた大腸菌の4系統分類法 ( Appl Environ Microbiol. 2000 66:4555-4558.) に改変を加え解析した。改変は、大腸菌aspC遺伝子増幅のためのプライマーをPCRの内部コントロールとして加えたマルチプレックスPCRの系を作製した。

(ii) multilocus sequence typing , MLST : ミシガン州立大学 Dr. Thomas S. Whittam によって提唱されている病原大腸菌のMLST解析法に準拠し行った。7遺伝子、*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, *uidA*を解析対象遺伝子とし、PCR増幅断片をExoSAP IT (amersham)処理後、塩基配

列決定を行った。

得られた配列データは、MEGA3 をもちいて多重配列および系統解析を行った。

### 潜在的病原因子プロファイリング

4種類の接着因子遺伝子、P線毛 (*papG II*, *papG III*)、S線毛 (*sfaS*)、FIC線毛 (*focG*)、および接着分子遺伝子 *afa/DR* (*afaBC*)、*iha*, *tia*、3種類の毒素遺伝子 *hly*, *cnf-1*, *cdt*、および毒素合成遺伝子系 *pks*、さらに細胞侵入に関わると考えられている *ibeA* の存在をPCR法により確認した。

## C. 研究結果と考察

### 1. 膀胱炎患者尿由来大腸菌の比較

平成17年度の研究結果より、急性単純性膀胱炎由来大腸菌 (H17\_C) は約80%が系統B2大腸菌であることが示された。そこで、今年度新規に収集した急性単純性膀胱炎由来大腸菌 (H18\_C) に関してMLST法により解析を行った (表1)。その結果、異なる地域 (京都および宮崎) で収集した場合でも、系統B2に属する菌株が約80%を占めることが示された。

表1 急性単純性膀胱炎由来大腸菌の系統

	A/B1	B2	D	others
H17 66株	4(6)	57(86)	4(6)	1(2)
H18 28株	1(4)	24(86)	3(11)	0(0)

( ) 内は%を示している。

急性単純性膀胱炎由来大腸菌のMLST解析から系統B2大腸菌はさらに、少なくとも7

つのサブクラスに分類出来ることを昨年度示した。この7つのサブクラスは系統 B2 膀胱炎由来大腸菌の 84% をカバーしていた (系統 B2 菌株 57 株中 48 株 : 表 2)。今年度収集した 27 株についても同様に 87% (23 株中 20 株) が 7 つのサブクラスのいずれかに属することが示された (表 2)。

表 2 系統 B2 大腸菌のサブクラス

Subclass	H17_C (n=57)	H18_C (n=24)	ECOR (n=15)
B2_1	5 (9)	0 (0)	0 (0)
B2_2	4 (7)	1 (4)	0 (0)
B2_3	1 (2)	3 (13)	0 (0)
B2_4	4 (7)	4 (17)	0 (0)
B2_5	4 (7)	1 (4)	2 (13)
B2_6	10 (18)	2 (8)	7 (47)
B2_7	20 (35)	10 (42)	2 (13)
others	9 (16)	3 (13)	4 (27)

( ) 内は%を示している。

ECOR collection 系統 B2 菌株 15 株中 11 株 (73%) が 7 つのサブクラスに属するが、47% は B2\_6 に属していた。また、B2\_1, \_2, 3, 4 の属する菌株は存在しなかった。しかしながら、急性単純性膀胱炎由来株は、B2\_7 が優勢であり (35 および 42%)、ECOR collection 中の系統 B2 菌株とは異なっていたが、H17\_C および H18\_C においては同様の傾向が見られた。

このように、急性単純性膀胱炎由来大腸菌の中で系統 B2 大腸菌の分離頻度が高いことが示されたと同時に、系統的な多様性が推測された。

## 2. 系統 B 2 菌株の病原因子の保有状況

系統 B 2 大腸菌の系統的な多様性と、接着因子を中心とした病原因子の保有状況との関連について検討を行った。P 線毛 (*papG II*, *papG III*)、S 線毛 (*sfaS*)、FIC 線毛 (*focG*)、afa/DR アドヘジン (DR)、*iha* アドヘジン、2 種類の毒素遺伝子 *hly*, *cnf-1*, *cdt*、および毒素合成系遺伝子 *pks*、細胞侵入に関わると考えられている *ibeA* の陽性率は表 3 に示した。系統 B2 急性単純性膀胱炎由来大腸菌 81 株 (H17\_C および H18\_C) 全体で陽性率をみると、*pks* 以外は 2%~41% の陽性率で、膀胱炎由来大腸菌が系統 B2 菌株に限ってみても、均一な集団ではなく、様々な菌株の集団であることを反映している。

サブクラスごとの陽性率から、B2\_1 は P 線毛のうち *allele GIII* および毒素遺伝子 *hlyA* および *hly*, *cnf-1*, *pks* 陽性の比較的均一なサブクラスであることが示された。同様に、サブクラス B2\_2, B2\_3, B2\_5 サブクラスについても比較的均一な遺伝子保有パターンが認められたが、B2\_4, B2\_6 および B2\_7 は病原因子保有パターンに関しては多様であった。MLST によって同一の配列型を示す菌株においても、様々な病原因子を多様なコンビネーションで保有していることが示された。

B2\_6 および B2\_7 菌株の多様性は、H17\_C と H18\_C のどちらの集団でも認められたことから、サンプリングバイアスの可能性は低いと考えられる。

表3 膀胱炎由来系統B2大腸菌の病原因子保有率

subclass	n	focG	sfaS	iha	tia	papGII	papGIII	DR	ibeA	cst	hly	cnf1	pks
B2_ALL		7%	10%	25%	31%	35%	32%	2%	32%	6%	41%	33%	77%
B2_1	5	0%	40%	20%	20%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%
B2_2	5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	20%
B2_3	4	0%	0%	75%	25%	100%	0%	0%	75%	0%	75%	0%	0%
B2_4	8	0%	0%	50%	0%	0%	0%	25%	0%	0%	0%	0%	88%
B2_5	5	0%	20%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	60%	100%
B2_6	12	42%	0%	58%	17%	25%	42%	0%	0%	25%	58%	75%	100%
B2_7	30	0%	17%	0%	70%	70%	30%	0%	40%	3%	33%	23%	97%
B2_others	11	8%	0%	42%	0%	0%	17%	0%	50%	8%	25%	25%	25%

系統B2および各サブクラスにおける陽性率を示した。  
75%以上の陽性率を示す病原因子は水色で、0%の場合は灰色で示した。

*Pks* 毒素合成遺伝子群の陽性率は全体で77%と比較的高率に存在した。サブクラスB2\_2, および\_3は*pks*陰性である一方、B2\_1, \_4, \_5, \_6, \_7サブクラスではほぼ100%陽性であった。本遺伝子群の尿路感染症における役割は明らかにされていないが、少なくとも系統B2菌株のマーカーの一つとして利用出来る可能性があると考えられる。

### 3. 系統B2サブクラス内の多様性

B2\_6およびB2\_7サブクラスに属する菌株間の病原因子保有パターンの多様性が認められた。H17\_CおよびH18\_CのB2\_7サブクラス菌株の多様性を、全ての菌株で陰性であった*focG*, *iha*, DR アドヘジンおよびほぼ全ての株が陽性であった*pks*を除いて表4に示した。表から明らかなように、B2\_7サブクラスは少なくとも、さらに4つのクラスターに病原因子保有パターンから分けることが出来た。つまり、B2\_7-1 および B2\_7-2 のグループは*papG III + cnf1 + hly* を共通に有し、B2\_7-1は*sfaS + ibeA*を、B2\_7-2は*tia + papG II*を有している。一方でB2\_7-3およびB2\_7-4は*tia + papG II*を共通に有し、加えてB2\_7-3は*ibeA*

を有している。

表4 B2\_7菌株の病原因子保有パターンの多様性

		tia	papGII	papGIII	cnf1	hly	sfaS	ibeA	
		70%	70%	30%	23%	33%	17%	40%	
1	CM12 H18	0	0						tia/papGII (-) cnf1/hly/papGIII (+) sfaS (+) ibeA (+)
	C8 H17	0	0						
	C17 H17	0	0						
	RC5 H17	0	0						
	RC10 H17	0	0						
2	RC15 H17	0	0						tia/papGII (-) (cnf1)/hly/papGIII (+) sfaS (-) ibeA (-)
	Co13 H17			0	0	0	0	0	
	FC59 H18			0	0	0	0	0	
	C31 H17			0	0	0	0	0	
	CM1 H18			0	0	0	0	0	
3	CM19 H18			0	0	0	0	0	tia/papGII (+) cnf1/hly/papGIII (-) sfaS (-) ibeA (+)
	C7 H17			0	0	0	0	0	
	Co2 H17			0	0	0	0	0	
	RC2 H17			0	0	0	0	0	
	CM3 H18			0	0	0	0	0	
4	CM7 H18			0	0	0	0	0	tia/papGII (-) cnf1/hly/papGIII (-) sfaS (-) ibeA (-)
	CM10 H18			0	0	0	0	0	
	CM15 H18			0	0	0	0	0	
	CM17 H18			0	0	0	0	0	
	C1 H17			0	0	0	0	0	
	C4 H17			0	0	0	0	0	
	C13 H17			0	0	0	0	0	
	C15 H17			0	0	0	0	0	
	C17 H17			0	0	0	0	0	
	C35 H17			0	0	0	0	0	
	Co3 H17			0	0	0	0	0	
RC8 H17			0	0	0	0	0		
C5 H17	0	0	0	0	0	0	0		
RC11 H17	0	0	0	0	0	0	0		
CM26 H18	0	0	0	0	0	0	0		

*tia* および *papG II* 遺伝子は、トリ病原性大腸菌 O1:K1 株の tRNA-pheV に挿入された Pathogenicity Island, PAI<sub>APEC01</sub> にコードされていることが知られている。また、尿路病原性大腸菌 J96 株の tRNA-leuX に存在する PAI II J96 が *papG III*, *cnf1* および *hly* をコードしていること、さらに尿路病原性大腸菌 536株の tRNA-serX に存在する PAI III 536 が *sfaS* 遺伝子をコードしていることが報告されている。今回解析対象とした菌株においてもそれぞれに類似した PAI が存在することを、tRNA 近傍

に存在する保存されたORFの配列と病原因子特異的プライマーを用いた Long PCR 法で確認出来た。

ExPEC 菌株の多様性の形成機序に関しては、現在まで未解明な部分が多いが、PAI の多様性とそれらが転移することによる病原因子の水平伝播が頻繁に行われることで多様性が形成されていることの一例を示すことができた。

#### 4. 新生児髄膜炎由来 ExPEC の多様性

ExPEC のある一群の菌株が非常に重篤な感染症である新生児髄膜炎を引き起こすことが知られている。また、新生児髄膜炎を引き起こす大腸菌は K1 夾膜抗原を産生し、K1 夾膜が宿主免疫反応に対する抵抗性に深く関与していることが知られている。これまでの報告によると、尿路病原性大腸菌にも K1 夾膜産生菌が存在することが明らかにされている。

昨年度の結果では、B2\_2, B2\_3, および B2\_7 の3つのサブクラスの菌株は全て K1 抗原陽性であり、他のサブクラスの菌株は陰性であることを報告した。特に B2\_7 サブクラスに属する菌株は、病原因子プロファイルの多様性があるにも関わらず全ての菌株が K1 抗原陽性であった。

そこで新生児髄膜炎由来大腸菌 7 株の解析を行った。全てが K1 抗原陽性であり、系統的には系統 B 2 に属する菌株が 5 株、系統 D 菌株が 2 株であった。系統 B 2 の 5 株に関しては、B2\_2 に属する株が 1 株と B2\_7-1, B2\_7-3 に属する株がそれぞれ 1 株と 3 株であった(表 5 および 6)。

表 5 由来別 ExPEC の系統と B2 サブクラス

	C		NM		P		Z	
n=	94		7		72		48	
A/B1	5	5%	0	0%	4	6%	1	2%
B2	81	86%	5	71%	63	88%	40	83%
-1	5	6%	0	0%	9	14%	1	3%
-2	5	6%	1	20%	2	3%	0	0%
-3	4	5%	0	0%	7	11%	3	8%
-4	8	10%	0	0%	8	13%	4	10%
-5	5	6%	0	0%	3	5%	6	15%
-6	12	15%	0	0%	17	27%	12	30%
-7	30	37%	4	80%	17	27%	12	30%
UT	12	15%	0	0%	0	0%	2	5%
D	7	7%	2	29%	4	6%	7	15%
Others	1	1%	0	0%	1	1%	0	0%

C; 膀胱炎, NM, 新生児髄膜炎, P; 腎盂腎炎, Z; 前立腺炎。  
膀胱炎由来 ExPEC と比較して高頻度で分離された系統  
とサブクラスとを で示した。

B2\_2, B2\_7-1, B2\_7-3 はいずれも *ibeA* 陽性グループであり、内皮細胞への侵入に関与すると考えられている *ibeA* 遺伝子の病原性に関する重要性を支持する。しかしながら、系統 D に属する 2 株 (MLST 型は同一であり、膀胱炎由来の大腸菌とは異なる) に関しては、*ibeA* を含む今回解析対象とした病原因子の全てが陰性であることから、未知の病原因子が存在する可能性が考えられる。

#### 5. 腎盂腎炎および前立腺由来 ExPEC の多様性

腎盂腎炎および前立腺由来大腸菌の系統解析を行った。膀胱炎由来 ExPEC と同様に系統 B2 由来が 80% 以上であった。また、系統 B2 サブクラスの割合は腎盂腎炎由来および前立腺由来株は膀胱炎由来株と同様 B2\_7 の比率が高かった。しかしながら、腎盂腎炎由来株は膀胱炎由来株と比較して B2\_1, B2\_6 の比率が高く、前立腺由来菌株は B2\_6 の比率が高かった(表 5)。

また B2\_7 内の多様性を比較すると、腎盂腎