

図2. EHEC MLVA の各遺伝子座における Diversity Index (0-1)。DI の値は Gene Mapper ソフトウェア VNTR プラグインによる。157, 26, 111 はそれぞれ血清群 O157、O26、O111 株で DI を計算した値からによる。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成19年度 分担研究報告書

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 山本 章治 国立感染症研究所 細菌第一部

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。一方、LEE非保有型EHECによる感染事例も多数報告されている。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EHECの溶血素であるエンテロヘモリシンの発現を制御していることを明らかにした。一方、これまでの研究からLEE非保有型EHECで同定された新規接着因子EibGの特徴である、ヒト由来免疫グロブリン（IgG）結合活性をLEE非保有型EHEC（166株）で解析したところ、約45%の菌株がヒト由来IgGに結合することが判明した。これらのSTECからIgG結合蛋白質をコードする遺伝子を単離したところ、新規の*eib*遺伝子であることが明らかとなった。

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（LEE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 μ 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ティングに供した。

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 (1×10^7) を 1×10^5 個の細胞へ感染させ、ギムザ染色液で染色し、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。

C. 研究結果

1. LEE 遺伝子群の発現制御因子 GrlA によるエンテロヘモリシン (Ehx) 活性化機構の解析： 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。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。GrlR と GrlA または GrlR と Ler 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 LEE の発現上昇は GrlA と Ler を介していると考えられる。一方、昨年度までの研究から、GrlA は鞭毛発現の負の制御因子として機能することが示されている。この発現制御は Ler 欠損下でも見られることから Ler には非依存的に行われていると考えられる。GrlR-GrlA 制御下にあるその他の病原性遺伝子を解明する目的で、GrlR 欠損株の表現型をさらに解析した。その結果、GrlR 欠損株では EHEC O157 が保有する大プラスミド上にコードされる溶血素である Ehx の活性が野生株と比較して著しく上昇していることが明らかとなった (図 1)。この活性化は GrlR と Ler の二重欠損株、および 3 型蛋白質輸送装置 (T3SS) の一部をコードする EscN と GrlR の二重欠損株でも確認されるが、GrlR と GrlA の二重欠損株では見られないことから、Ler および T3SS には非依存的に GrlA に依存して行われていることが明らかとなった。

さらに、これらの Ehx 活性化機構は遺伝子の転写発現レベルで行われていることが明らかとなった (図 2)。

2. LEE 非保有型 EHEC の免疫グロブリン (IgG[Fc]) 結合活性の解析

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 (3,081 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。昨年度までの研究から、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* が同定されている。*eibG* を特異的に増幅可能な PCR プライマーを設計し、その分布を解析したところ、166 株の LEE 非保有型 EHEC 株のうち、41 株が *eibG* 陽性であることが明らかとなった。Eib の特徴である IgG 結合活性について同じ 166 株を解析したところ、76 株が IgG 結合能を有することが判明した。

3. 新規 *eib* 遺伝子のクローニングと機能解析

既知の *eib* 遺伝子に共通な PCR プライマーを設計し、IgG 結合活性を持つが *eibG* が検出出来なかった株から *eib* 遺伝子のクローニングを試みた。その結果、新たに 4 つの *eib* 遺伝子 (*eibH*, *eibI*, *eibJ1* および *eibJ2*) がクローニング出来た (図 3)。これらの遺伝子を運ぶプラスミドで形質転換した大腸菌実験室

株 (MC4100) は HEp-2 細胞へ接着することが明らかとなった。

D. 考察

LEE 遺伝子群の発現制御機構の解析から、GrlR-GrlA 制御系は LEE 遺伝子群特異的ではなく、他の病原性遺伝子の発現もコントロールするグローバルレギュレータであることが明らかになりつつある。これらの知見は 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近い将来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。

LEE 非保有型 EHEC で見出された Eib 蛋白質の特徴である IgG 結合活性は国内で単離される LEE 非保有型 EHEC 株の約半数に見られることが判明した。これまでの研究から IgG 結合活性と宿主細胞への接着能はリンクしていることから、これらの特徴は EHEC の接着因子を同定する上で重要な特徴であるといえる。IgG 結合活性を持つ新規遺伝子の解析から、LEE 非保有型の EHEC 株には未同定の *eib* 遺伝子が多数残されていると予想される。今後の解析から、LEE 非保有型 EHEC 株に存在する Eib 蛋白質ファミリーの存在が明らかになると期待される。

E. 結論

・LEE 発現の負の制御因子である GrlR の欠失株では鞭毛遺伝子発現が顕著に阻害される一方、LEE 遺伝子発現と共に Ehx の活性が

上昇する。

・GrlA による Ehx 活性化機構は *ehxC* オペロンの転写活性化を介して行われている。

・今年度に国内で単離された EHEC 株 (3,081 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。

・LEE 非保有型 EHEC の約半数は IgG 結合活性を持つ。

・IgG 結合活性をもつ LEE 非保有型 EHEC から、新規 *eib* 遺伝子 (*eibH*, *eibI*, *eibJ1* および *eibJ2*) がクローニングされた。

F.健康危機情報

特になし

G.研究発表

1) Iguchi, A., Iyoda S., Watanabe, H. and Osawa, R. O Side Chain Deficiency Enhances Sensitivity of *Escherichia coli* to Shiga Toxin

2-*Converting Bacteriophages.*

Current Microbiology, 54:14-19 (2007).

2) Tokunaga, A., Kawano, M., Okura, M., Iyoda, S., Watanabe H., and Osawa, R. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

O157-Specific DNA sequence obtained from amplified fragment length polymorphism analysis. *Microbiology and Immunology*, 51:883-888 (2007).

図2

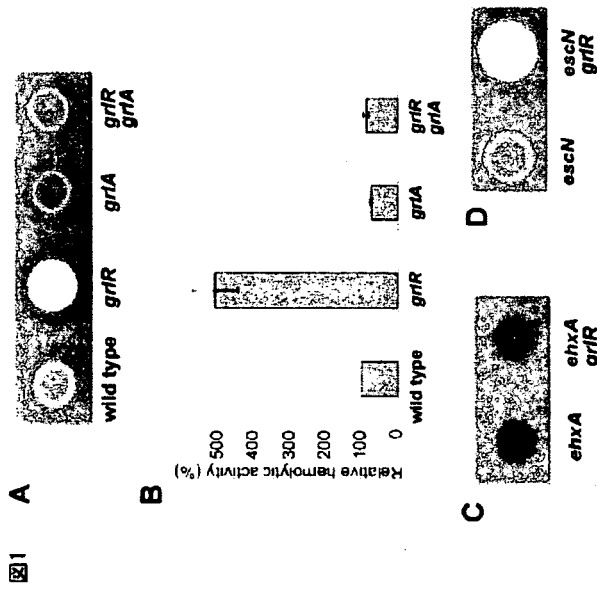
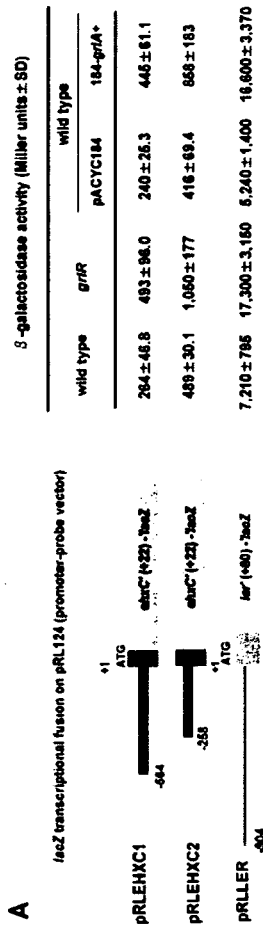


図1. GrIR-GrIA 制御システムによる Ehx 活性の制御。(A) EHEC O157 Sakai 株の *grIR* 欠損株では EHT 血液寒天平板上で Ehx 活性が顕著に上昇し、*grIA* との二重欠損株では活性上昇は見られない。(B) 羊脱繊維血を用いた溶血活性測定。*grIR* 欠損株で著しい活性上昇が確認された。(C) Ehx をコードする *ehxA* 欠損下では *grIR* 欠損下においても Ehx の活性上昇は見られない。(D) LEE にコードされる 3 型蛋白質輸送装置の一部を担う遺伝子 *escN* 欠損下においても *grIR* 欠損があると Ehx 活性が顕著に上昇する。

図2. GrIA による Ehx の活性上昇は *ehxC* オペロン (*ehxCABD* 遺伝子を含む) の転写活性化に起因する。(A) プロモータークロニングベクター pRL124

に *etxC* オペロン上流域をクローニングし、野生株、*grIR* 欠損株、野生株での *GrlA* 過剰生産株での活性を測定したところ、それぞれで約二倍の活性上昇が確認された。(B) 大プラスミド pO157 上において *etxC* と *lacZ* との転写融合体を構築し、野生株、*grIR* 欠損株、*grLA* 欠損株、*grIR grLA* 欠損株、野生株での *GrlA* 過剰生産株での活性を測定したところ、*grIR* 欠損株および *GrlA* 過剰生産株でそれぞれ野生株と比較して転写活性が顕著に上昇した。

図 3. 新規 Eib 蛋白質 (EibH, EibI, EibJ, EibK) の予想アミノ酸配列と既知の Eib 蛋白質との相同性解析

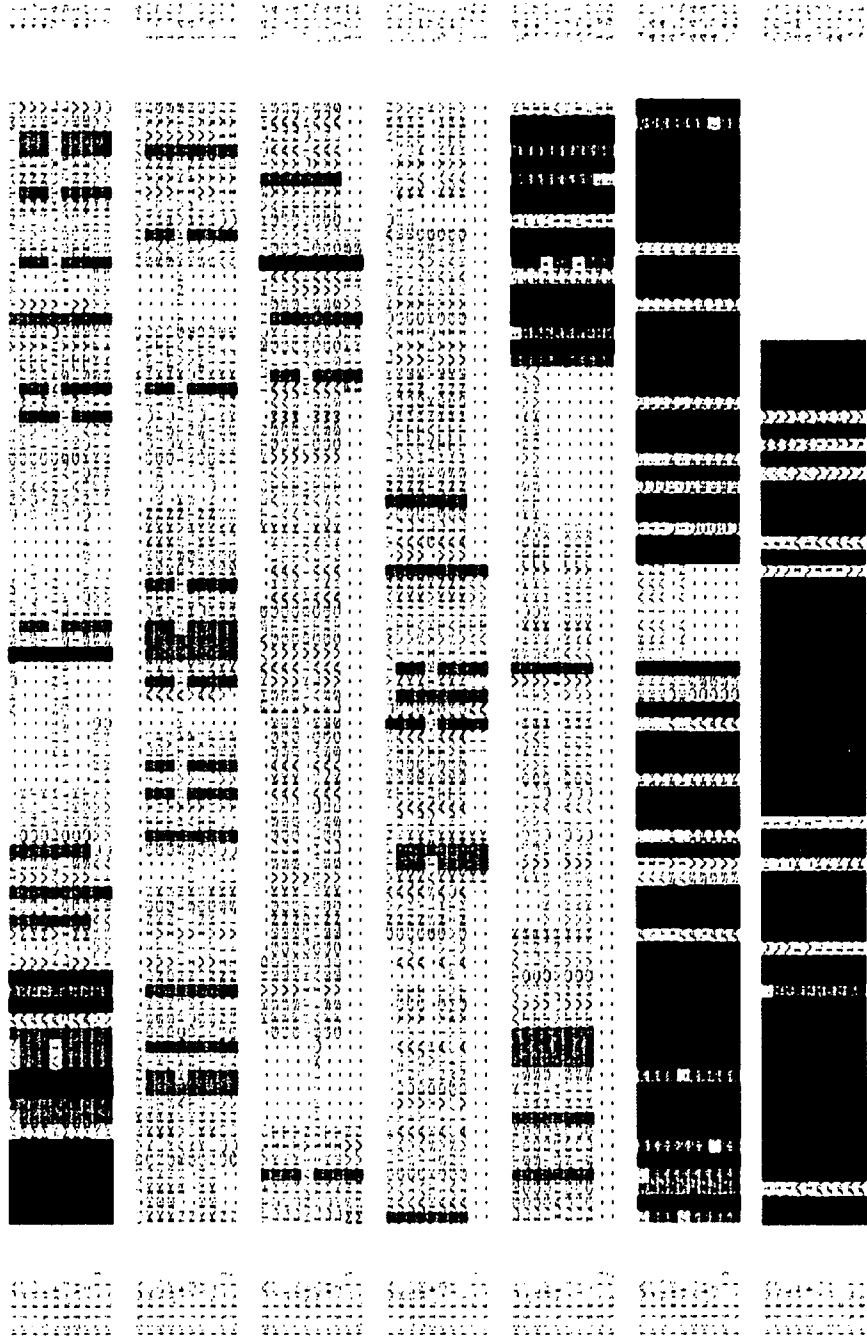
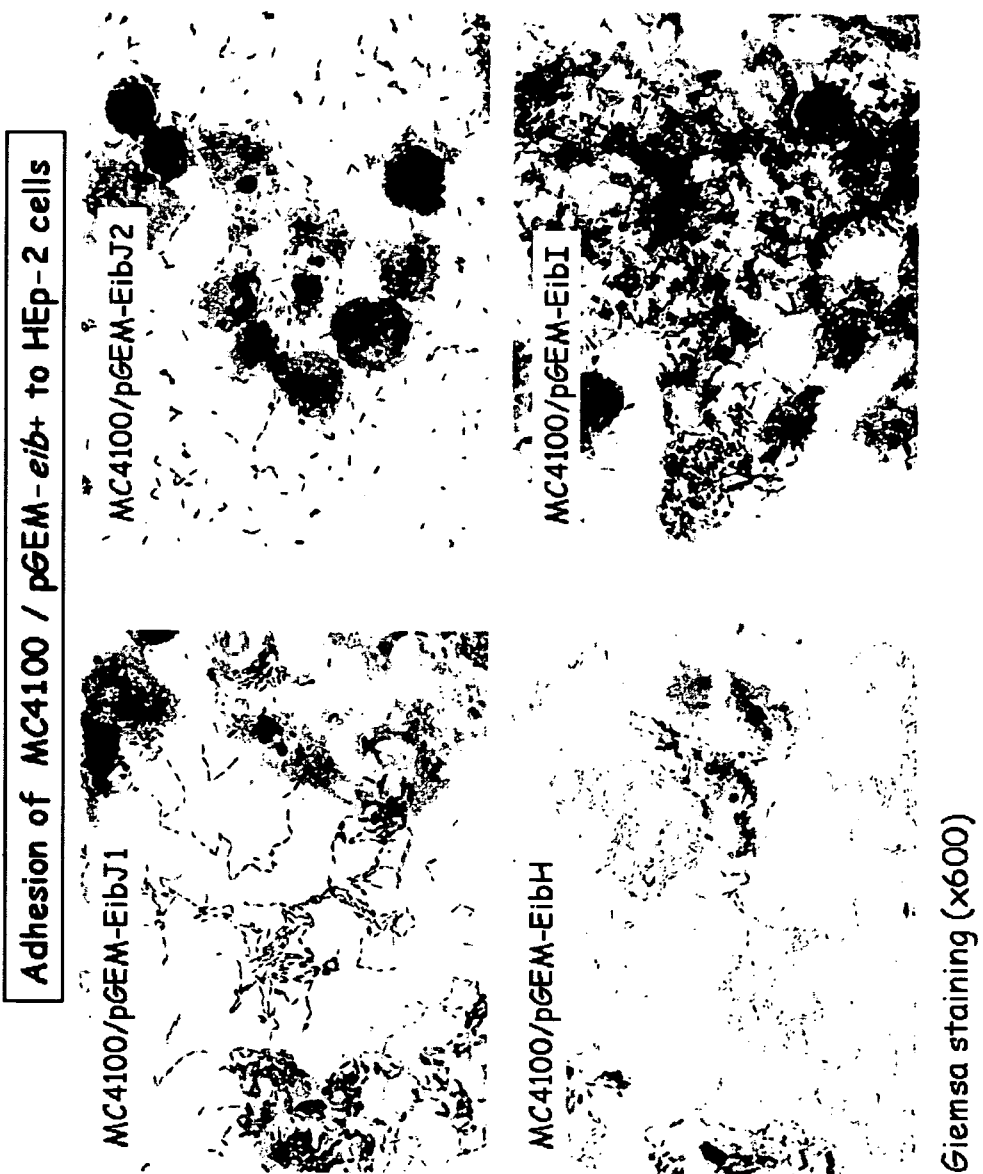


図 4. 新規 *eib* 遺伝子を運ぶプラスミドで形質転換した大腸菌実験菌株 (MC4100) の細胞接着性解析



厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）
平成19年度 分担研究報告書
（アジア地域における感染症の侵入監視に関する研究）

分担研究者 三戸部治郎

国立感染症研究所・細菌第一部

協力研究者 小泉信夫、志牟田健

国立感染症研究所・細菌第一部

研究要旨：

病原体の感染コントロールの究極的な目標はワクチン開発・集団接種であるが、これまでのトライアルでは血清型特異的な防御効果は認められるものの、赤痢菌群一般に対する防御効果は認められておらず、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない。その理由として赤痢菌が宿主の細胞に侵入した後に、環境の変化を察知して病原遺伝子の発現を抑制するため、血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇しても、病原蛋白に対する抗体の産生は抑えられている機構が予想される。アジア地域における赤痢菌の侵入監視の一環として、赤痢菌の病原性発現機構の基礎的知見に基づいたワクチン候補株を作成し、モルモットの評価系において一定の効果が得られた。

A. 研究目的

感染症のコントロールは有効なワクチン開発、集団接種が制圧の究極的な目標である。細菌性赤痢に対して、種々の生ワクチン候補が開発され、幾つかの大規模なトライアルが行なわれている。これらのワクチン株は既存の赤痢菌の病原性を低下させる変異を導入したものか、赤痢菌の病原遺伝子を導入した大腸菌であるが、ワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては有意ではなく、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない[1]。

その理由として赤痢菌は宿主の細胞に侵入した後に、環境の変化を察知して病原遺伝子の発現を抑制することが考えられ、血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇しても、病原蛋白は宿主の免疫から逃れ、結果として抗体の産生は抑えられていると考えられる。

ワクチン開発という側面からも、このよ

うな赤痢菌の病原性発現機構の基礎的理解は重要であり、担当者は細菌のRNA結合蛋白として良く知られている*hfq*遺伝子が赤痢菌の病原性発現調節に大きな役割を果たしていることを報告した(発表論文1)。*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、赤痢菌の病原性を規定するType III Secretion system (TTSS)の発現が脱抑制され、通常、TTSSが発現しない低温や低浸透圧の条件でも発現が起こり、通常発現の起こる高温(37℃)では発現が増大し、HeLa細胞に対する侵入性が野生株の2~30倍以上に増加していることが示された。

一方、*hfq*遺伝子はストレス応答に作用する制御因子であり、赤痢菌以外の病原細菌サルモネラ、コレラ、レジオネラでは動物実験系における病原性が低下することが報告されている。これは病原性以前に菌としてのストレス条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の*hfq*欠損株でも動物実験における菌の生存性はこれ

らの菌と同様であることが予想される。こうした、病原性蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下する表現型は、貧食細胞で殺菌されやすく、かつ免疫担当細胞に提示される抗原量が多い可能性があり、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。そのため、*hfq*欠損株を用いてワクチン候補の基礎的なデータの収集を行った。

B. 研究方法

モルモットの角結膜炎モデルは個体に免疫応答を惹起し、ワクチンの評価系として用いることができることが報告されている[2]。今回、*hfq*欠損株と共に、ワクチン候補株として病原蛋白を高発現させるため、赤痢菌 *S. sonnei* の TTSS の effector 分子群 (*ipgC*~*ipaBCDA*) をコードする領域を低コピープラスミド pACYC177 にクローニングし、*S. flexneri* 2a 2457T の *hfq* 欠損株に保持させたところ、IpaB 蛋白に対するウエスタンブロッティングで20倍近い発現が見られた。

そのため、このワクチン候補株と元の *hfq* 欠損変異株、コントロールとして野生型 *S. flexneri* 2a 2457T 株、および PBS を4群計18匹のモルモット (Hartley, Male) に、二週間隔で 5×10^8 個を計4回、両側眼球に投与した(図1)。二回目免疫終了後、3週目に血清の赤痢菌のエフェクター蛋白に対する抗体価を調べるため採血を行った。

眼球症状は投与後2日目、3日目、5日目にデジタルカメラで接写し記録した。

4週目、血清型の異なる *S. sonnei* HW383 株を 5×10^8 個を計2回両側眼球に投与し、チャレンジとした。接種後1週間で殺処分した個体から眼球を摘出し、ホルマリン固定後、HE染色で組織を観察した。

ELISA法はLB培地で対数後期まで震盪培養した *S. sonnei* HW383 株に Congo Red 色素を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に加えて2時間培養することで培

養上清中に分泌蛋白を放出させ、濾過滅菌した上清200 μl を4 $^{\circ}\text{C}$ 18時間ELISAプレートに吸着し抗原とした。モルモット血清をPBSで100, 500, 2500, 12500, 62500倍希釈し、37 $^{\circ}\text{C}$ 1時間反応し、1000倍希釈したペルオキシダーゼ付加抗モルモットIgG抗体を1時間反応した。

C. 研究結果

初回免疫後、角結膜炎の症状を比較した。野性型菌と同様にワクチン株も角結膜炎を惹起したが、野性型と比較してワクチン候補株および *hfq* 欠損変異株は角膜、上下眼瞼の炎症性肥厚、膿汁分泌等の症状は有意に軽く治癒期間も、野性型で平均9日のところ5日と短期であった(図2)。野生型投与群では症状の重い1匹に1%テトラサイクリン点眼治療を行った。

以上の観察は赤痢菌でも他の病原細菌と同様、*hfq* 欠損株は動物実験での病原性が低下していることを示した。角膜炎は周囲から角膜中心に治癒が進行し、約二週間で、角膜は完全に透明に回復した。二回目免疫では全群で症状が認められなかった。

二回目免疫終了後、病原因子蛋白群に対する血清抗体価をELISA法で調べた。抗原はワクチン株と血清型が異なるチャレンジ株が、培養上清中に分泌する可溶性の病原因子を用いた。抗体価は有意に野性型赤痢菌投与株で強く誘導されており、PBS投与群では上昇しなかった。ワクチン株並びに *hfq* 欠損変異株ではELISAによる活性が有意に低いことが示された(図3)。

免疫後のモルモット血清を用いて凝集反応を行ったところ、免疫株である *S. flexneri* 2457T の菌体は凝集したが、チャレンジ株である *S. sonnei* HW383 株は凝集せず、チャレンジ株に対する血清型抗体は誘導されていないことが示された。

免疫終了後、血清型が異なる *S. sonnei* をチャレンジしワクチンの効果判定を行った。

PBSを投与した対照群では免疫時の*S. flexneri*より軽い角膜炎優位の症状を示した。膿汁分泌と眼瞼の炎症性肥厚は軽度で個体差が多かった(図4-1)。*hfq*欠損変異株では有意な感染症状は認められなかった(図4-2)。ワクチン株では軽度に角膜の混濁が混濁している印象が認められた(図4-3)。対照群と比較して野性型*S. flexneri*投与群は、有意に軽い角膜炎を発症した。角膜の混濁は有意であったが、眼瞼周囲の症状は認められなかった(図4-4)。

チャレンジ後一週間目の眼球組織のHE染色像は、PBS投与群では角膜が強度に肥厚し正常な上皮の組織構造が完全に破壊されていた(図5-1)。*hfq*欠損株投与群は有意な病変は認められないと考えられた(図5-2)。ワクチン候補投与群では角膜上皮に空泡構造が多く認められ(図5-3)、これが肉眼的に観察された角膜の淡い混濁の原因になっているものと考えられた。野性株免疫群では同様の空包構造が認められた上に、角膜層が有意に薄く、エオジンで強く染色され、その下層にエオジンで弱く染色される層が認められた(図4-4)。

D. 考察

汎赤痢菌群に有効なワクチン開発をめざしてモルモットの角結膜炎モデルで評価したところ、*hfq*欠損変異株を投与した群で血清型を超えた一定の免疫効果が認められた。

実験後明らかになった問題点は、免疫株である*S. flexneri*の病原性の方が攻撃株*S. sonnei*より強かったため、*S. flexneri*野性株での免疫でも軽度の免疫効果が認められたことが挙げられる。肉眼的に観察した症状は*hfq*欠損株投与群が実質、無症状であり、組織学的な判定でも角膜の変化は*hfq*欠損株のほうが少ない結果が得られた。

ワクチン候補株として*hfq*欠損変異株にプラスミドで*ipaBCDA*遺伝子群を保持させた株を免疫したものの、生体での効果は*hfq*欠損変異株のほうが効果的であった。組織学的な判定でも角膜上皮の空泡が多く、かえって効果が下がることが予想された。

ワクチン株と*hfq*欠損株で赤痢菌の病原因子であるIpaB蛋白の発現量を比較したところ、37℃の条件でワクチン株のほうがIpaBを強発現していたが、逆に30℃ではワクチン株での発現量が低下していた。角膜局所における体温は深部体温よりは低いと思われ、こうしたことも効果の違いに影響しているものと考えられる。

抗体の産生量は、培地中に分泌される可溶性の病原蛋白に関する限り、炎症の程度が強い野性型投与群が有意に多いことが示された。ELISA法の抗原として用いた*S. sonnei*の分泌蛋白は主としてTTSSのエフェクターであるIpaBCD蛋白群であり、このことはワクチン効果の中心となるprotective antigenが、これまで考えられてきた分泌因子以外の病原蛋白である可能性も考慮する必要があると思われる。また、これまでの解析から*hfq*欠損株ではTTSS以外の他の病原性蛋白であるIcsB(VirG)の発現が増加していることが示されており、これらの発現がHfqの直接的、ないし間接的な制御下にあることも予想される。

また、この結果はプラスミドで保持させたIpaBCD群の蛋白は、ワクチンの防御効果を上げないことを示唆すると共に、人工的にコピー数が増えているにも関わらず、免疫効果が上がらないことを明らかにした。

今回明らかになった評価系の問題として免疫株と攻撃株の病原性の強さが違うこと

と症状を数値化することの困難さが挙げられる。より確実な評価として免疫株と攻撃株を入れ替えて評価すること、並びにマウスを用いた赤痢菌による肺炎モデルがワクチン評価に使用できることが報告されていることからこれらを用いての再試験が必須であると考えられる。

E. 結論

汎赤痢菌群に効果が認められる赤痢ワクチンの候補株として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子*hfq*の欠損変異株を用いて、モルモットの角結膜炎モデルで効果を判定した。*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く、血清型の違いに関わらず一定のワクチン効果が認められた。

F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

1. 論文発表

Mitobe. J., Morita-Ishihara. T., Ishihama. A., Watanabe. H., 2008. J. Biol. Chem. 283(9)5738-47

2. 学会発表

平成19年3月24-26日 第88回日本細菌学会
総会 大阪国際会議場

2007, Dec. 4 - 7, The 37th US-Japan
Medical conference Cholera board. Austin
Texas, USA

<参考文献>

1. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. 77(8): p. 651-66.
2. Hartman, A.B., et al., *Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of Shigella vaccine strains*. Infect Immun, 1991. 59(11): p. 4075-83.

図 1 : 免疫スケジュール

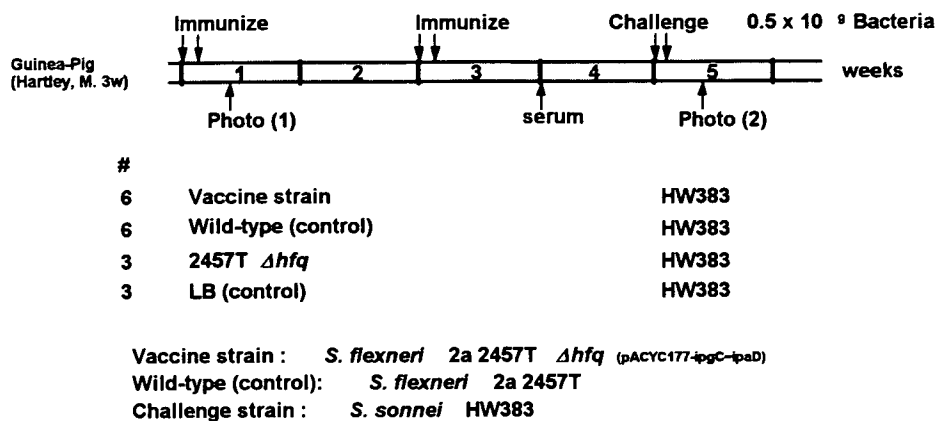


図 2 : 初回免疫の症状

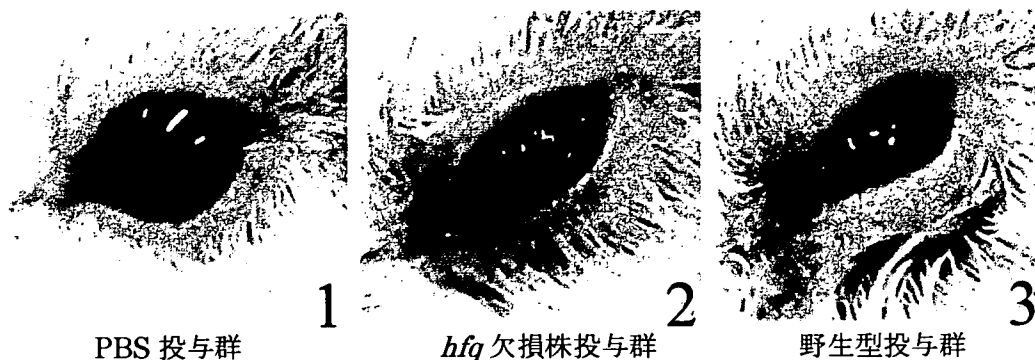


図 3 : 抗体価

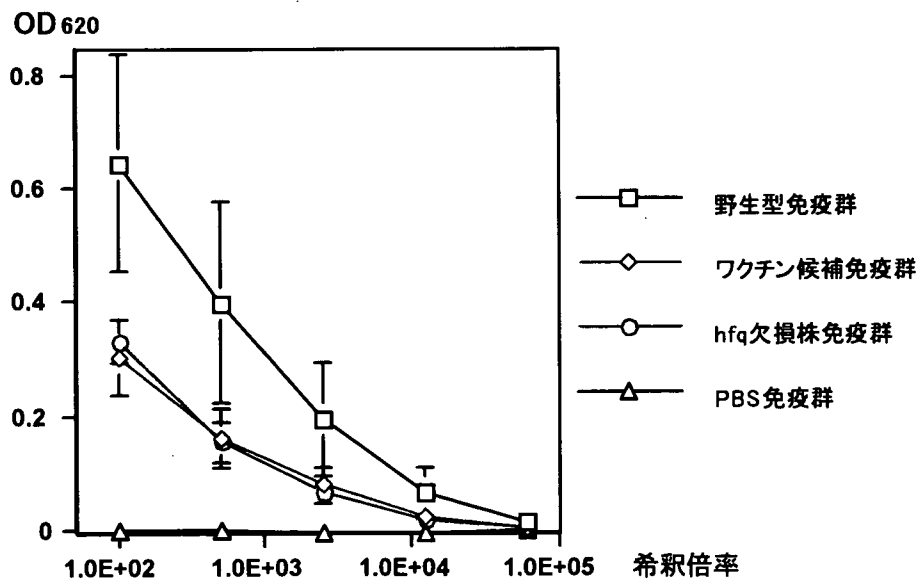


图 4

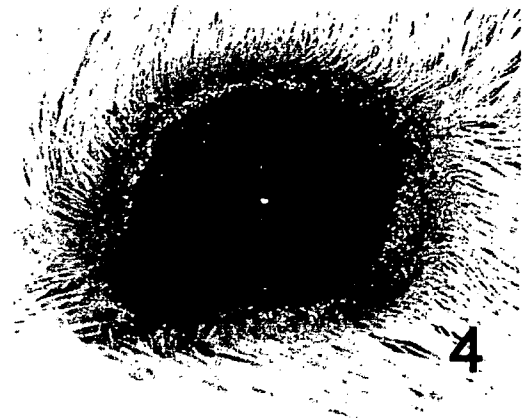
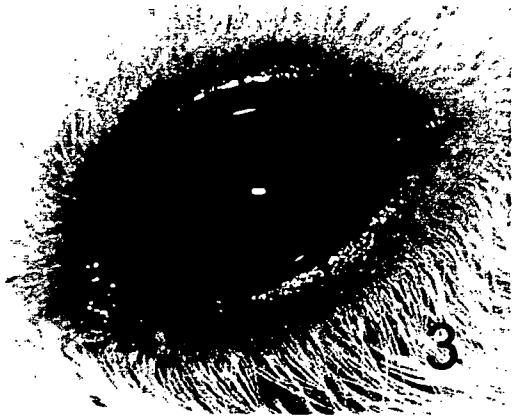
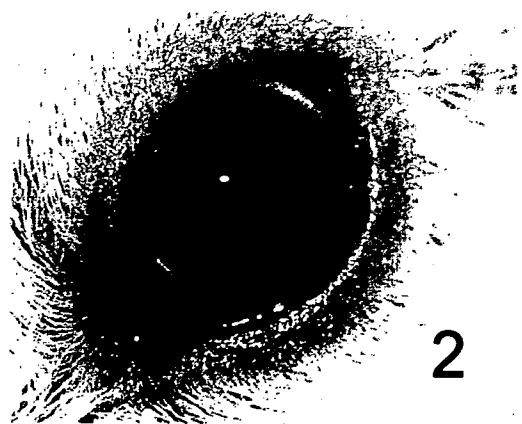
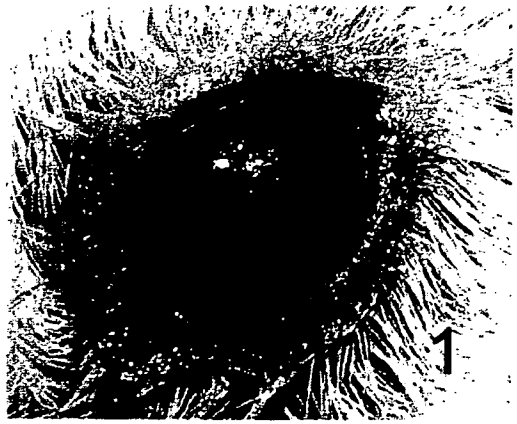
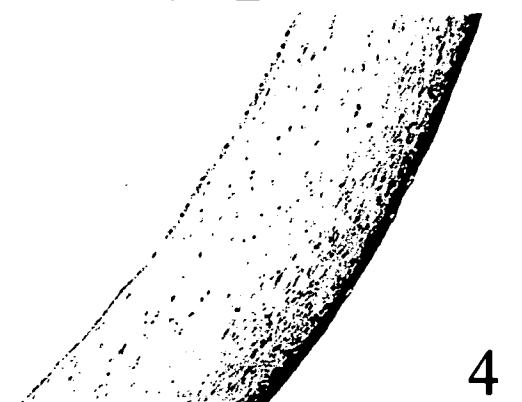
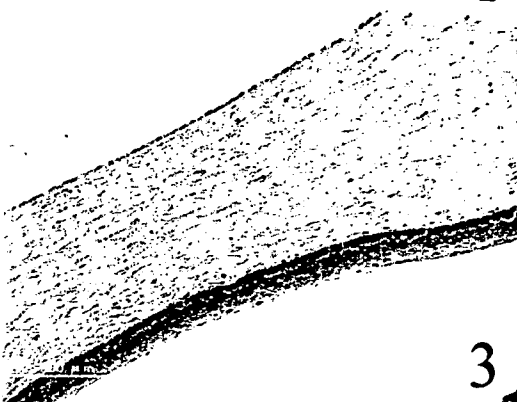
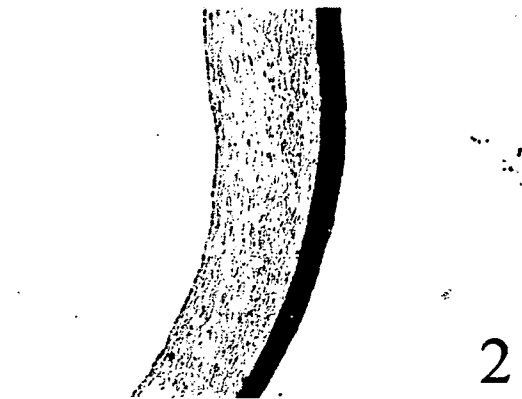


图 5



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 腸管外病原性大腸菌に関しては病原メカニズムおよび疫学解析が十分にはなされておらず、未だ病原性に関しても未解明な部分が多く残されている。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。昨年度までに引き続き、便あるいは膿由来大腸菌の系統解析を行った。膿由来大腸菌は尿路感染症由来大腸菌と同様に系統 B2 大腸菌が多く分離されることをしめした。また、系統 B2 大腸菌を細分類し、それぞれのサブグループから代表株を選定し血清耐性について検討を加えた。これらの情報は尿路感染症由来大腸菌含めた、腸管外病原性大腸菌の疫学解析および病原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（Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: ExPEC）と総称される大腸菌が存在する。下痢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。そこで本研究では 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い、そこから見いだされた情報をもとに疫学解析手法を確立することを目標とした。

本年度は、比較対象として用いる便由来

大腸菌および陰由来大腸菌の解析を行い、これまでの解析結果と統合してまとめを行った。

B. 研究方法

菌株の収集 健康人便由来大腸菌 57 株、陰由来大腸菌 88 株を、筑波大学 小島博士より分与された。

血清型別 O抗原型別はスライド法により行い、K 1 抗原に関しては、大腸菌夾膜抗原 K 1 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

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。ECOR コレクション株を含めた系統樹解析から大腸菌の系統分類を行った。この解析では、4 つの系統 A, B1, B2, D のうち、A および B1 を明確に区別することが出来ないため、A/B1 と表記した。

血清耐性能の測定

健康人ヒト血清をプールしたものを用いて大腸菌の血清耐性の検討を行った。LB 培地を用いて OD600=0.2-0.3 まで大腸菌の培養を行った。PBS-Ca 溶液に懸濁後、最終濃度 10%あるいは 50%に血清を添加し 37°C で 2 h 静置培養を行った。その後直ちにサンプルを PBS 溶液を用いて希釈し、LB プレート

を用いて CFU の計測を行った。コントロールとして同一ロットの血清を非動化し、同様の操作のもと解析を行った。

C & D. 研究結果と考察

1. 健康人糞便および膀胱炎患者尿由来大腸菌の系統からみた比較

これまでの解析により、尿路感染症由来の腸管外病原性大腸菌は系統 B2 株が優位であることを示してきた。一方で、健康人便由来の大腸菌は系統 A/B1 に属する株が尿路感染症由来大腸菌株に比して多いこと、MLST 型の多様性が高いことを示してきた。

新たに解析した便由来大腸菌 57 株 (FEC-H19) から 36 の MLST 型が見いだされた。MLST 型の多様性を表すために、一つの MLST 型を構成する平均菌株数を解析菌株数を MLST 型数で除することで多様性指数を求めた。つまり、ある集団の菌株がそれぞれ異なる MLST 型を示した場合、多様性指数は 1 となる。今年度解析した健康人便由来大腸菌の多様性は 1.58 であった (表 1)。

	# of ST	# of Strains	
FEC-H19	36	57	1.58
FEC-H17	29	50	1.72
FEC	60	107	1.78
VEC	38	88	2.32
UCAC-H17	18	52	2.89
UCAC-H18	13	32	2.46
UCAC	23	84	3.65

表 1 各種大腸菌コレクションの多様性指数

この値は、前年度までに解析した便由来

大腸菌 50 株 (FEC-H17) が示す多様性指数 1.72 と類似した値となった。ふたつの健常人便由来大腸菌コレクション、FEC-1 および FEC-H19 に共通して見いだされる MLST 型は 7 種にとどまり、多様性指数も 1.78 と増加しない。このことは急性単純性膀胱炎由来大腸菌コレクション (UCAC-H17 および UCAC-H18) がそれぞれ多様性指数 2.89, 2.46 を示し、統合した場合には 3.65 と増加することと対照的である。

表 2 に示す通り、便由来大腸菌 57 株 (FEC-H19) の系統解析から、系統 A/B1 に属する菌株は 25 株 (43.9%)、系統 D=6 株 (10.5%)、系統 B2=26 株 (45.6%) であることが明らかにされた。FEC-H17 の内訳は A/B1=72.0%, D=6.0%, B2=22.0% であったことから、2 つのコレクション間で系統の分布に相違が認められた。UCAC-H17 および UCAC-H18 においては、系統 A/B1 および系統 B2 菌株の割合はそれぞれ 3.6% および 89.3% であることから、健常人便由来大腸菌は系統 A/B1 の分離される頻度が膀胱炎由来大腸菌よりも約 10-20 倍程度増加することと、系統 B2 株の分離頻度が低下することが示された。

		A/B1	D	B2
FEC-H19	57	25 43.9%	6 10.5%	26 45.6%
FEC-H17	50	36 72.0%	3 6.0%	11 22.0%
FEC	107	61 57.0%	9 8.4%	37 34.6%
VEC	88	10 11.4%	8 9.1%	68 77.3%
UCAC-H17	52	2 3.8%	3 5.8%	47 90.4%
UCAC-H18	32	1 3.1%	3 9.4%	28 87.5%
UCAC	84	3 3.6%	6 7.1%	75 89.3%

表 2 各種コレクションの系統の分布

腔由来大腸菌 88 株の MLST 解析からは、38 種の MLST 型が見いだされた。多様性指数は 2.32 となった。便由来大腸菌を比較して多様性が低いことが示された。系統解析の結果は、A/B1, D, B2 のそれぞれの系統に属する株が、10 (11.4%), 8 (9.1%), 68 株 (77.3%) であった。便由来大腸菌よりも系統 B2 由来大腸菌の分離率が高く、尿路感染症由来大腸菌における率に類似していた。尿路感染症の感染経路と考えられる肛門-会陰-尿路経路において、腔内環境で侵入・定着することと、尿路へ侵入し感染を引き起こすこととの間に何らかの関連がある可能性が考えられる。

2. MLST法を用いた系 B2 大腸菌の細分類

系統 B2 大腸菌は MLST 型により、更に細かく分類されることを示してきた。これまでの解析から膀胱炎由来系統 B2 菌株の優先サブグループは B2_8 (41.3%) であった。一方で、便由来大腸菌 (FEC-H17) においては明確な優先サブグループは存在しなかった。

B2	便由来(H17)	便由来(H19)	便由来	腔由来	膀胱炎由来
	11	26	37	68	75
_1	3 27.3%	0 0.0%	3 8.1%	4 4.5%	4 5.3%
_2	0 0.0%	7 26.9%	7 18.9%	7 8.0%	5 6.7%
_3	2 18.2%	0 0.0%	2 5.4%	3 3.4%	4 5.3%
_4	1 9.1%	3 11.5%	4 10.8%	6 6.8%	8 10.7%
_5	1 9.1%	0 0.0%	1 2.7%	3 3.4%	4 5.3%
_6	0 0.0%	4 15.4%	4 10.8%	8 9.1%	8 10.7%
_7	0 0.0%	4 15.4%	4 10.8%	4 4.5%	6 8.0%
_8	3 27.3%	5 19.2%	8 21.6%	23 28.1%	31 41.3%
non	1 9.1%	3 11.5%	4 10.8%	10 11.4%	5 6.7%

表 3 系統 B2 菌株のサブグループ

今回解析した FEC-H19 コレクションでは B2_2 が優先グループであった。しかしながら、FEC-H17 の分布との相関は認められず、

便由来大腸菌の特徴とは考えられなかった (表3、図1)。

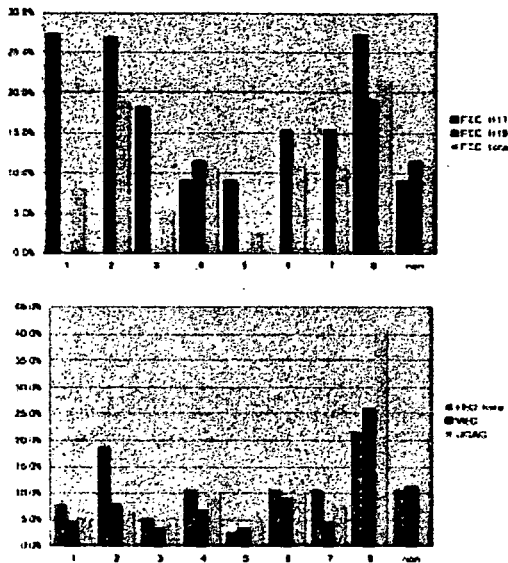


図1 各種大腸菌コレクションの系統 B2 大腸菌のサブグループの分布

FEC-H17 および FEC-H19 を統合した結果では、B2_2, B2_8 が他のグループより多い傾向が認められた。便由来系統 B2 大腸菌の解析菌株数比較的少ないため、今後の菌株の収集と解析が必要である。

膣由来系統 B2 大腸菌では、膀胱炎由来系統 B2 大腸菌同様に B2_8 が優先グループ (26.1%) であった。しかしながら膀胱炎由来大腸菌の B2_8 分離頻度ほどは高くはなく、膣由来大腸菌と尿路感染症由来大腸菌との関連は不明であった。一方で、便由来大腸菌と同様、B2_1 から B2_8 以外の MLST 型を示す菌株の占める比率が高いことが明らかとなった。

膣由来大腸菌の病原性に対する考え方は一定ではない。妊婦における大腸菌性膣症

が早産と関連するという報告がなされているが、十分な解析はなされていないのが現状である。

3. 系統 B2 サブグループ間の性状比較

これまでに、系統 B2 大腸菌の接着因子を中心とした病原因子の保有状況と系統との関連について検討を行ってきた。その結果、系統 B2 菌株の病原因子保有プロファイルには非常に大きい多様性が存在することを示してきた。急性膀胱炎由来大腸菌 83 株に関して、13 種類の病原因子遺伝子の有無を PCR 法により検索した結果、42 パターンもの多様な保有プロファイルが存在した。しかしながら、MLST により細分類したときには病原因子保有プロファイルが B2_6 および B2_8 を除いたサブグループ内では、均一化することを報告してきた。

そこで、各サブグループから代表株として 25 株を選定し、性状解析を行った。選定した菌株の病原因子プロファイルは図 2 に示した。

		hlyE	hlyN	hlyP	hlyB	hlyD	hlyE	hlyF	hlyG	hlyH	hlyI	hlyJ	hlyK	hlyL	hlyM	hlyN	hlyO	hlyP	hlyQ	hlyR	hlyS	hlyT	hlyU	hlyV	hlyW	hlyX	hlyY	hlyZ	
FC04	1	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	2	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	3	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	4	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	5	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	6	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	7	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	8	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	9	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	10	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	11	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	12	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	13	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	14	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	15	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	16	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	17	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	18	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	19	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	20	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	21	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	22	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	23	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	24	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC04	25	EPEC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

図2 選定株の病原因子プロファイル

大腸菌の血清耐性をはじめとする様々な性状が LPS の産生の有無と直接的、間接的に関連することが知られている。そのため、今回選定した菌株の LPS の構造を検討するため、菌体から LPS を調整し、SDS-PAGE で分離後、銀染色を行いプロファイルを検討した。その結果選定株は LPS の側鎖部分を保持していることが推測された (図 3)。

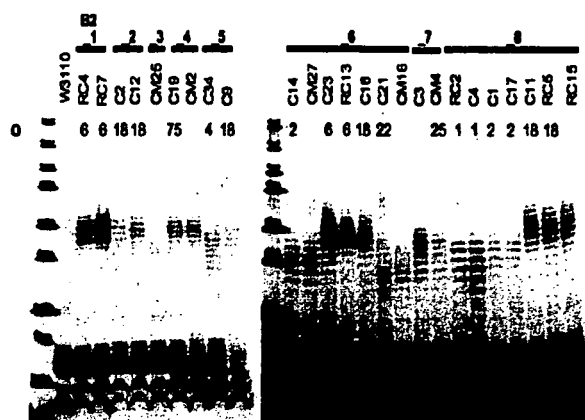


図 3 大腸菌の LPS 構造のプロファイル

腸管外病原性大腸菌感染症の中には、尿路感染症から敗血症に進展する病態が存在する (urosepsis)。敗血症を引き起こすためには血清耐性能が重要であることが推測される。大腸菌の血清耐性能に関しては Iss (BorA), K1 莢膜産生能が重要な因子であることが報告されてきた。

B2_2, B2_3, B2_8 に属する菌株は K1 莢膜を産生することは以前報告した。また、iss (borA) 遺伝子の保有は B2_4 に属する 2 株以外は全ての菌株において認められた。そこで、選定した菌株のヒト血清耐性能を実際に検討した。

その結果、10%ヒト血清で 2 h 処理した場合 80% (25 株中 20 株)の菌株は血清中で増殖

することが可能であった。B2_3 B2_7 に属する菌株は血清感受性であり、サブグループによって血清耐性がことなる知見が得られた。他の血清感受性株は B2_6 に属する菌株の一部に認められた。

Resistance to complement-mediated Killing (human serum)

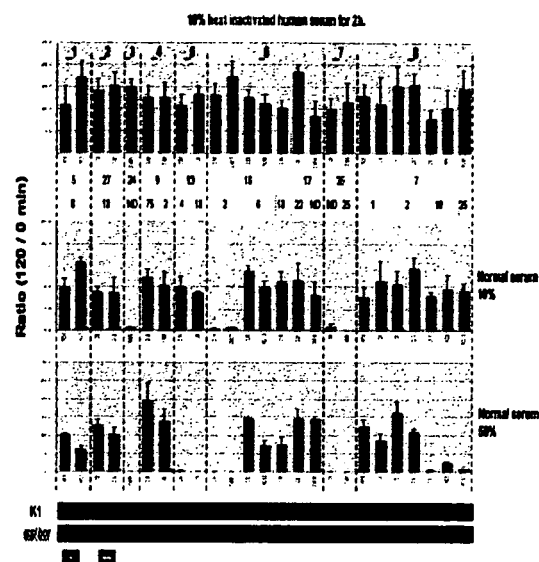


図 4 大腸菌の血清耐性

サブグループ B2_6 は病原因子プロファイルからも非常に多様な菌株の集団であるが、血清耐性能においてもサブグループ内に多様性が存在することが示された。さらに高濃度の血清に対する耐性能を検討した。10%血清感受性である菌株に加えて、B2_8 に属する菌株の中に感受性株が混在することが明らかとなった。サブグループ B2_8 もサブグループ B2_6 同様に多様な菌株が混在していることを明らかにしており、このことと一致すると考えられた。

ここで示した血清耐性能がある耐性因子によるものか否かは明らかでないが、サブグループ B2_4 のように、K1 莢膜非産生株

でありさらに iss (borA) を保持しない株であっても耐性を示すことから、K1 莢膜および Iss (BorA) 以外の耐性因子が存在することが示唆された。

E. 結論

膣由来大腸菌の 80% 近くが尿路感染症において高い頻度で分離される系統 B2 大腸菌であることが示された。膣より分離される大腸菌の病原学的な意義において、今後の検討が待たれる。また、尿路感染症との関連においても、会陰部への定着と尿路への侵入の機会の増大との関連について検討が必要である。

系統 B2 を細分化し、解析菌株を選定する作業をおこなった。血清耐性に関わる新たな病原因子の検索が必要であることが示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

腸管外病原性大腸菌の系統解析：大西真他
第 81 回感染症学会総会。