

において27株中2株が1 locus で1 repeat 数異なっており、1株がそれとは別の1 locus で2 repeat 数異なる MLVA タイプを示した。また、TN b330 の株においても、上記の集団発生由来株以外に同一 MLVA タイプを示す株や1 locus で1 repeat 数の違いを示す株が存在した。これらの株も疫学的な関連が不明な散发事例由来株であるが、分離時期については約3週間の集団発生の時期をふくめた約80日間に分離されていた。

2006年の広域流行株である TN a259 は、28都府県の散发事例から130株が4月から12月の長期にわたって分離されていた。このうち120株はBlnI-PFGE パターンが一致し、その他には7種類の異なるBlnI-PFGE パターンがあった。BlnI-PFGE パターンが一致する120株について、MLVAにより9種類の遺伝子座について調べると、すべての遺伝子座で繰返し数が一致する株が32株、1遺伝子座について繰返し数が1異なる変異株(SLV1)が67株あった。残りの22株については、1遺伝子座で繰返し数が2異なる変異株から2遺伝子座で繰返し数が2以上異なる変異株まで11種類の異なる MLVA タイプに分けられた。また、それぞれの MLVA タイプの株の分離時期を見ると、第31週までは MLVA タイプ A の株の分離頻度が高いが、第32週以降はタイプ A とは locus 10 で1 repeat 数異なるタイプ D の分離頻度が高くなっていた。

#### D. 考察

アジア諸国においては *Vibrio Cholerae* 及び *Vibrio parahaemolyticus* による下痢症の発生頻度が高く、これらの病原菌についての PFGE 解析結果を共有することにより、域内の

感染症対策へ貢献することが期待される。本研究においてアジア各国での分離株において良好な解析結果が得られるような PFGE 標準プロトコールが作成できたことから、わが国においてもこれらの病原菌による事例が発生した際には域内での情報交換もスムーズに進むものと考えられる。

2005年および2006年に分離された腸管出血性大腸菌では、集団発生由来株以外の散发事例由来株においても1 locus で1 repeat 数の違いがある株が検出されており、これらの株は集団発生由来株において repeat 数が1~2異なる、single locus variant が見られたとの既報の評価基準によく合致すると言える。PFGE 及び MLVA において同一タイプを示す広域散发事例由来株の EHEC O157 では、その遺伝学的特性が極めて類似していることから、これらの散发事例由来株は、“Unrecognized outbreak” を形成している可能性が示唆された。

#### E. 結論

*Vibrio Cholerae* 及び *Vibrio parahaemolyticus* について国際的にデータを共有し得る標準化 PFGE プロトコールを作成した。2005年及び2006年に広域から分離された EHEC O157 では、同一 PFGE パターンであっても MLVA では異なるタイプの場合が見られた。さらに、分離地や分離時期が異なっている広域分離株においても、PFGE 及び MLVA の型別が一致している株があり、それぞれの遺伝学的関連性が極めて高い可能性が示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- 1) Matsumoto M, Suzuki Y, Nagano H, Yatsuyanagi J, Kurosawa H, Kobayashi K, Yamaoka K, Horikawa K, Kudaka J, Terajima J, Watanabe H, Miyazaki Y. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis analysis performed at selected prefectural institutes of public health for use in PulseNet Japan. *Jpn J Infect Dis.* 58, 180-3, 2005
- 2) Kudaka, J., Asato, R., Itokazu, K., Nakamura, M., Taira, K., Kuniyosi, H., Kinjo, Y., Terajima, J., Watanabe, H., Kobayashi, J., Swaminathan, B., Braden, CR., and Dunn, JR. Escherichia coli O157:H7 Infections Associated with Ground Beef from a U.S. Military Installation -- Okinawa, Japan, February 2004. *Morbid. Mortal. Weelky Rep.* 54, 40-42, 2005
- 3) Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Mitobe J, Miura M, Watanabe H. Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing Escherichia coli in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2006, 3(1):68-73.
- 4) Cooper KL, Luey CK, Bird M, Terajima J, Nair GB, Kam KM, Arakawa E, Safa A, Cheung DT, Law CP, Watanabe H, Kubota K, Swaminathan B, Ribot EM. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2006, 3(1):51-8.
- 5) Liang SY, Watanabe H, Terajima J, Li CC, Liao JC, Tung SK, Chiou CS. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Molecular Typing of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol.* 2007, 45(11):3574-80.
- 6) Terajima J, Tosaka N, Ueno K, Nakashima K, Kitsutani P, Gaynor MK, Park SY, Watanabe H. *Shigella sonnei* outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Aug;59(4):282-3.

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）

平成 17～19 年度 総合分担研究報告書

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	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	斐 迎新	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
研究協力者	森田昌知	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	林 哲也	宮崎大学	

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および腸管出血性大腸菌(EHEC)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。サルモネラについては近年国内で増加が観察されたリジンデカルボキシラーゼ試験陰性株の解析を、EHECについては豪州で発見された新規細胞障害性因子 Sub の国内分布状況の調査を行った。また、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および EHEC について MLVA 試験系の構築を検討した。

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 および遺伝子操作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。ファージ型別は英国 HPA から供与されたファージおよびスキームを使用して実施した。パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) は米国 CDC が推奨する PulseNet プロトコールに準じて実施した。

C. 研究結果と考察

1. サルモネラ分離株の解析

1-a. リジンデカルボキシラーゼ試験 (LDC) 陰性 *S. Enteritidis* (SE) の解析



サルモネラの同定において、生化学性状試験の一つであるLDC陽性は重要な要件の一つである。2003年に発生した集団事例関連株において約1割(10/109)にLDC陰性株が見出された。これらLDC陰性株のファージ型は、PT4もしくは14bで、互いに類似したPFGEプロファイルを示した。

リジンデカルボキシラーゼは*cadBA*オペロンにコードされる。*cadBA*オペロンは*cadC*によって発現制御されることが知られている。上記LDC陰性SE株では、*cadC*遺伝子に共通の変異が見いだされ、973番目のCが欠失していた。このことによりC端が欠失した形のCadCしか発現しないことがLDC陰性化の原因であることが推測された。実際、本変異*cadC*遺伝子では*cadBA*オペロンを活性化できないことも確認された。こうしたことから、2種類のファージ型を含むものの、基本的には遺伝学的に均一性の高い株が広がったことが、LDC陰性SEが多く検出された背景にあることが明らかとなった。

#### 1-b. サルモネラ MLVA

近年、ゲノム解析が進み、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。

ゲノム配列をテキストベースで捉え tandem repeat(TR)配列を検索するプログラムをVisual Basic言語を用いて構築した。これを用いてサルモネラのゲノム配列を解

析し、各ゲノム配列から延べ300程度のTR配列を同定した。現在までに、MLVAの候補となりうる遺伝子座を22箇所選択した。

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の系を考案した。

上記PCRにて増幅した産物をシーケンサーで泳動し、各産物のサイズおよび繰り返し配列のリピート数をGene Mapperソフトウェアにて解析した。得られたリピート数のデータをBioNumericsに取り込みクラスター解析を行った結果を図1に示す。

22遺伝子座中、血清型Enteritidisについては16遺伝子座において、Infantisについては主として15遺伝子座において、Typhimuriumについては18-20遺伝子座において、それぞれ増幅産物が観察された。クラスター解析した結果、EnteritidisおよびInfantisは、最も遠い分岐での類似度がそれぞれ約90%および75%程度であり、高い分解能は得られなかった。また、Diversity Indexもそれぞれ1遺伝子座においてのみ0.56および0.40という値を得たがそれ以外の遺伝子座では0.1以下の値しか得られなかった。一方、Typhimuriumについては最も遠い分岐での類似度が約65%であった。また、6遺伝子座において0.35以上のDiversity Indexを得た。

各血清型とも100から200株程度試験し、増幅産物も7割以上の遺伝子座において良好に得られたものの、高い分解能が得られたのは血清型Typhimuriumのみであった。Typhimuriumについてはファージ型DT104株の流行があり、MLVAにおけるクラスター解析

でも互いに同じクラスターに集約されたが、DT104 クラスター内でも高度に分岐しており、多様性があることが示唆された。

## 2. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の解析

### 2-a. sub 遺伝子の解析

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 0113 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。血清群 091 が多く見られ、OUT、08、0128 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 (0157, 026 および 0111 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 (0113:  $\alpha$ ) 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。

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、*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。

### 2-b. EHEC MLVA

EHEC に関して現在公表されているゲノム配列は血清群 0157 のものであるが、それ以外に 026 および 0111 においてゲノム情報が得られつつある。これらの情報を利用し、サルモネラにおける MLVA 試験系構築と同様にして 0157 を含めた EHEC 全体をカバーしうる形で MLVA 試験系の検討を行った。約 20 からの候補遺伝子座を選定し、サルモネラと同様に 2 本のマルチプレックス PCR で実施可能な系を構築した。このうち 9 の遺伝子座は米国 CDC から提唱されている遺伝子座に相当する。血清群 0157 を 270 株、026 を 314 株、0111 を 140 株試験し、Diversity Index を比較した (図 2)。その結果、0157 で使用されている 9 遺伝子座のうち、0111 でも高い DI を示したのは 1 遺伝子座のみであり、026 に関しては高い DI を示した遺伝子座は観察されなかった (なお、M12 は 0157 と 026、0111 では配列が異なっていたため考慮していない)。また、上記 0157 で使用されていない遺伝子座の中に 3 つの血清型に共通して高い DI を示すもの、026 あるいは 0111 に特異的に高い



DIを示すものも見つかり、今後さらに検討する価値があると考えられた。

#### D. 結論

SEにおいてLDC陰性というこれまでとは違う視点から分離菌株を解析することで、特定の遺伝子変異を指標とした疫学解析も可能であることが示された。

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すとともに、他の試験法とも比較してその有用性を検討していく必要がある。

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。

EHEC MLVAに関しても、有用と思われる遺伝子座が新たに特定されつつあり、0157以外の血清群に属すEHECの簡易型別法としての有効性を検討していくことが重要となるであろう。

#### E. 健康危機情報

新たな細胞障害性因子をコードする*sub*遺伝子がLEE陰性EHECに広がっている状況にある。

#### G. 研究発表

1. 泉谷秀昌、寺嶋淳、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：2004年における0157:H7を中心としたEHECの動向について。衛生微生物技術協議会第26回研究会、2005年7月。
2. 森田昌知、泉谷秀昌、寺嶋淳、廣瀬健二、渡辺治雄：リジンデカルボキシラーゼ陰性*Salmonella* Enteritidis株における発現制御遺伝子の変異。第79回日本細菌学会総会、2006年3月。
3. 泉谷秀昌：食中毒菌の疫学解析に利用される分子遺伝学的手法について。衛生微生物技術協議会第27回研究会、2006年6月。
4. 泉谷秀昌、大西真、伊豫田淳、寺嶋淳、山崎伸二、石原朋子、渡辺治雄：サチラーゼ様プロテアーゼをコードする*subA*遺伝子の志賀毒素産生性大腸菌株における分布状況。第80回日本細菌学会総会、2007年3月。
5. 野田裕之、長田美母衣、大沼正行、金子通治、泉谷秀昌、渡辺治雄：山梨県で分離された散発下痢症患者由来の*Salmonella* serovar Enteritidisの分離頻度と疫学マーカーの頻度。第81回日本感染症学会総会、2007年4月。

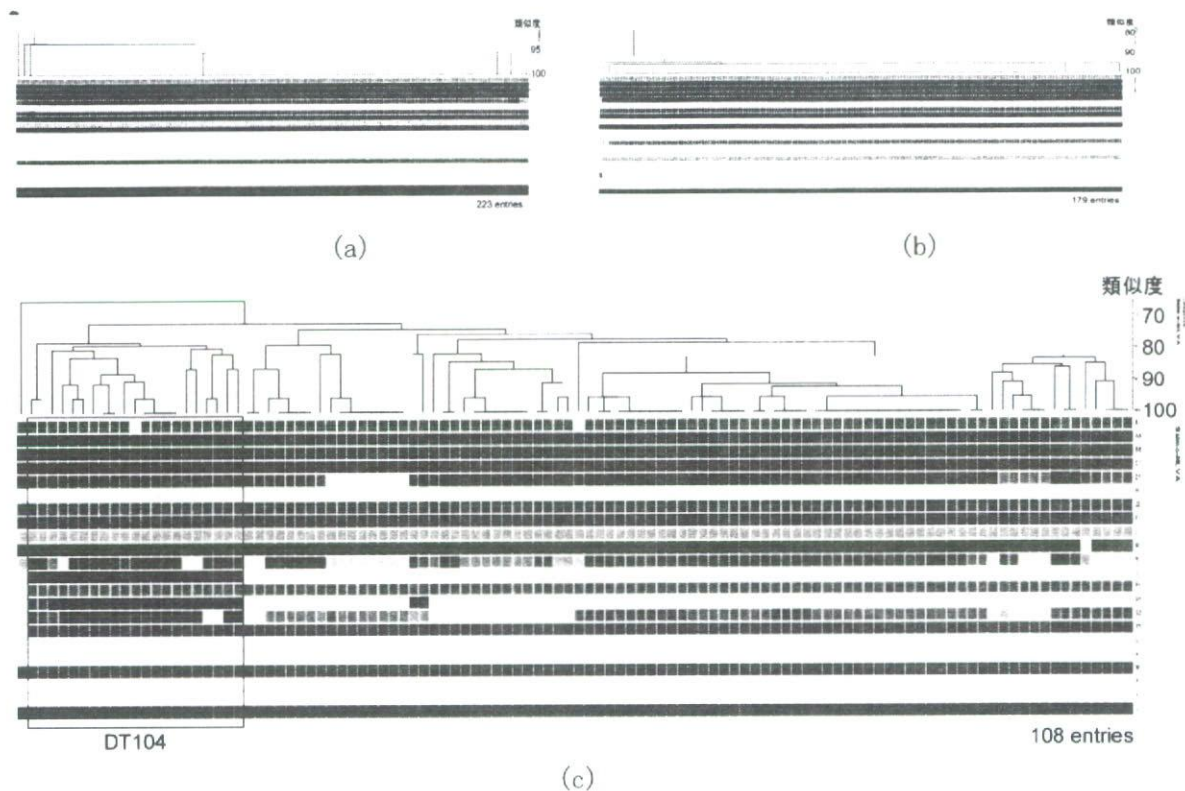


図1. サルモネラ MLVA によるクラスター解析 a) *Salmonella* Enteritidis, b) *Salmonella* Infantis, c) *Salmonella* Typhimurium. DT104 はファージ型 DT104 関連株が集積したクラスターを示す。

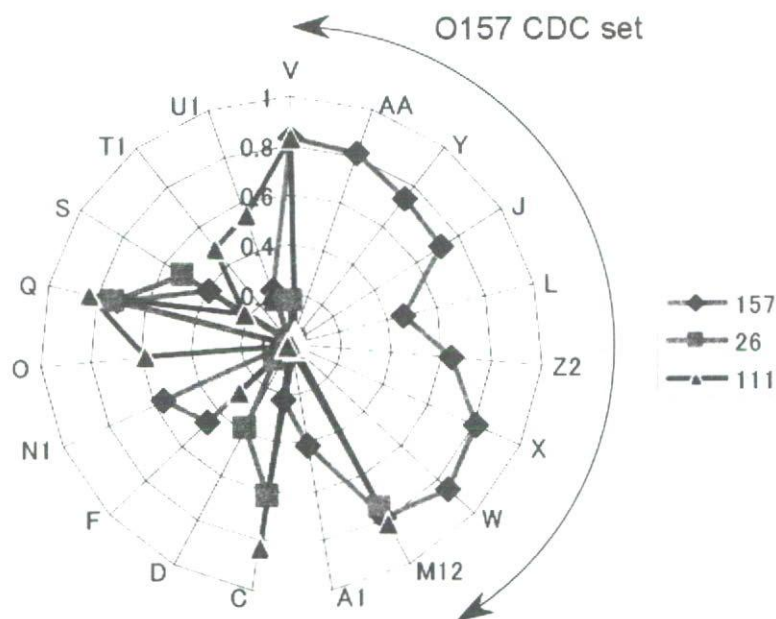


図2. EHEC MLVA の各遺伝子座における Diversity Index (0-1)。DI の値は Gene Mapper ソフトウェア VNTR プラグインによる。157, 26, 111 はそれぞれ血清群 O157、O26、O111 株で DI を計算した値からによる。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）

平成 17～19 年度 総合分担研究報告書

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 小泉 信夫 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。LEE 保有型 EHEC では、病原性遺伝子の発現制御機構の解明を行った。LEE 遺伝子群の発現制御に関わる発現制御因子 Gr1A は LEE 遺伝子群を正に制御するだけでなく、運動器官である鞭毛や溶血素であるエンテロヘモリシンの発現をそれぞれ負および正に制御していることを明らかにした。一方、LEE 非保有型 EHEC は接着因子が不明なものが多い。遺伝学的手法を用いた解析から、LEE 非保有型 EHEC にのみ見出される新規接着因子 EibG, H, I, J1, J2 を見出した。EibG はヒト由来免疫グロブリン（IgG）結合活性を有する。IgG 結合活性は LEE 非保有型 EHEC の約 45% の菌株で見られる共通な特徴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。これらの知見は同じ発現制御を受ける新規病原性因子の検索を行う上で重要であり、これら新規病原性因子の知見は感染起因菌の同定及び分類に重要であることは言うまでもない。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。トランスポゾン突然変異法は Epicentre 社の EZ-Tn5 <R6Kori/KAN-2> transposome kit 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 ( $1 \times 10^7$ ) を  $1 \times 10^5$  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、GrlA は鞭毛発現の負の制御因子として機能し、鞭毛レギュロンのマスターレギュレータをコードする *flhD* オペロンの転写発現レベルで行われていることが示された。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、GrIR 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。この活性化は GrIR 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 GrIR の二重欠損株でも確認されるが、GrIR と GrIA 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 GrIA 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。

## 2. EHEC の血清型別と LEE 非保有型 EHEC の接着因子の解析

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、これら以外の血清群の EHEC による感染事例も近年数多く報告されている。国内で単離される EHEC 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。LEE 非保有型 EHEC 株の一群は培養細胞への接着能が著しく上昇しており、それらは血清群 O91 に多く見られることが判明した。遺伝学的手法 (トランスポゾン挿入変異法) を用いて、これらが保有する接着遺伝子の突然変異体を単離したところ、特定のオープンリーディングフレームの別々の位置にトランスポゾンが挿入されていることが判明した。挿入部位周辺の DNA 領域をクローニングして塩基配列を決定したところ、ヒト由来

の免疫グロブリン結合蛋白質と相同性を持つ蛋白質をコードしていることが予想された。そこで、これらの遺伝子を *eibG* と命名した。*eibG* だけを運ぶプラスミドを構築し、大腸菌の実験室株である MC4100 を形質転換したところ、ヒト由来の免疫グロブリン IgG-Fc と IgA に結合する活性が確認された。さらに、この形質転換体は HEp-2 への鎖状接着性を獲得していることが確認されたことから、宿主細胞への接着因子としても機能していることが判明した。*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。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、GrIR-GrIA 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ーであること



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ことが可能となるであろう。

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 GrlA の機能に依存して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 に依存した鞭毛遺伝子発現の抑制機構は鞭毛マスターオペロンである *flhD* の転写活性を介して起こる。

・ 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。

・ 国内で単離された EHEC 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。

・ O157、O26、O111 以外の血清群に属する EHEC の約 40% は LEE 非保有型である。

・ 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 (*eibG*, *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) Iyoda, S., and Watanabe, H.: ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187: 4086-4094, 2005.

2) Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Rivas M., and Iwanaga, M: The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Res Microbiol.* in press.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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).

7) 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).



「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」

赤痢菌担当：国立感染症研究所・細菌第一部・三戸部治郎

研究要旨

3年間のまとめ

アジア地域における病原体ネットワークの構築には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なるべく単純な方法も模索する必要があると考えられる。当研究では、赤痢菌群を判別する簡便なPCRを利用したタイピング法を開発し、4群ある赤痢菌群を泳動パターンで比較できる系を構築した。その結果、分離数の大半を占めるD群とB群に関しては、ほとんどの株で群特異的な均一パターンを示し、簡便なタイピング法として使用できる可能性が示唆された。また感染コントロールの究極的な目標はワクチン開発であるが、赤痢菌群一般に効果のあるものはこれまで実用化されていない。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

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。赤痢症に関わる問題として、有効なワクチンが未だに実用化されていないこと、また赤痢の侵入監視に関わる問題点として、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。

当研究では(I)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(平成18年度報告)。(II)また感染コントロールの究極的な目標はワクチンの集団接種であるが、これまで赤痢ワクチンのトライアルでは、ワクチン株の血清型特異的な防御効果は認められるものの、赤痢菌群一般に効果のあるものは認められ

ていない(1)。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考えられている。

ワクチン開発という側面からも、このような病原性発現メカニズムの基礎的な解析は重要であり、赤痢菌の病原遺伝子群をコードするType III secretion system(TTSS)遺伝子の発現調節機構を調べたところ、これまで20年近く転写レベルで調節されていると考えられていた温度によるTTSSの発現が、そのレギュレータである*invE*遺伝子の転写後制御で調節されることを初めて証明した(平成17年度報告)。また、転写後制御に重要な役割を果たすRNA結合蛋白*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、TTSSの発現が脱抑制され、通常、TTSSが発現しない低

温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。

(III)この*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、レジオネラの*hfq*欠損株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*欠損株でも生存性はこれらの菌と同様であることが予想される。このように侵入性が増加するにも関わらず、生存性が低下する表現型は、貧食細胞での抗原提示機構を考えると生ワクチンとして効果が高い可能性があり、ワクチンとしての基礎的なデータの収集を行った(平成19年度報告)。

## B. 研究方法

(I)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(2)。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、簡便とは言い難い。一方、グラム陰性菌のゲノム上には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(3)。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PCRで増幅し電気泳動パターンで、各群に分類する方法を開発、検討した。

(II)赤痢菌のTTSS発現制御が、転写か翻訳レベルのどちらかで行われることを調べるため、TTSSのレギュレータである*invE*遺伝子をクローニングし*lacZ*遺伝子と転写レベルと翻訳レベルで融合させたレポータープラスミドを作製し30℃および37℃でβ-galactosidase活性を比較した。

また赤痢菌の*hfq*遺伝子の欠損変異株を作成し、TTSSのコンポーネントであるIpaB蛋白に対する抗体とInvEに対する抗体を用いてウエスタンブロットで発現量を調べた。

(III)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(6)。ワクチン候補株として*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18匹のモルモット(Hartley, Male)に、二週間隔で $5 \times 10^8$ 個を計4回投与し、6週目、同じ量の血清型の異なる*S. sonnei* HW383株をチャレンジし症状を観察した。

## C. 研究結果

(I)8種類のプライマーの分別能を検討した結果、最良であったERIC1Rプライマーを用



いて、あらかじめ遺伝的多様性が明らか16株のEcoR strain collection(4)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、株間の多様性の分別は可能であると考えられた。

計46株の赤痢菌血清型Type strainからゲノムDNAを抽出し、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*)では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バンドの泳動像を示した。

D群もI相とII相菌ともに800bpと1400bp付近に泳動される2本のバンドからな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。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。

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である事実に対応しているように思われた(2)。それでも15株中7株(3, 4, 6, 8, 9, 13, 15型)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独特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。

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。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株全て同じ泳動パターンを示した。

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。

群血清でA群と判別された2株のうち1株はA群で比較的多い(3, 4, 6, 8, 9, 13, 15前述)の泳動像を示し、A群4型の抗血清で凝集した。残りは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。

(II)結果概要はA. 研究目的で前述。研究発表：論文1を参照。

(III)ワクチンとして用いた $hfq$ 欠損変異株の初回免疫後の角結膜炎の症状は野性型と比較しては有意に症状が軽く治癒期間も、野性型で平均9日のところ5日と短期であった。両者とも二回目免疫時には症状が認められなかった。

効果判定では、 $hfq$ 欠損株投与群では実質的に感染症状が認められなかった。PBSを投与した対照群では初回免疫時より軽い角膜炎症状を示した。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。

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破壊されていた。野性株投与群では有意に角膜上皮が薄く変化し空泡構造が認められ、上皮下にエオジン好性に染まる層が認められた。 $hfq$ 欠損株投与群ではこれらの変化は認められず正常な構造を保っていると考えられた。

#### D. 考察

(I)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見られ、特に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。*S. flexneri* 6型はMLSTを用いた分類法でも、他の型が全てMLST-D群に分類されるのに対してMLST-A群に分類されることが示されており(5)、この知見を再現しているものと考えられた。

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、64株の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ある。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考えられた。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ることが予想された。

(II) TTSS発現調節のメカニズムを解析したところ、これまで転写レベルで調節されていると考えられていた温度と浸透圧によるTTSSの発現が、そのレギュレーターであるInvE蛋白の転写後制御で調節されることが証明された。これは、温度による発現制御の引き金となる熱力学的な相互作用が、転写段階よりも、mRNAに対して鋭敏に働くことを示すものと考えられた。また、こうした転写後制御に重要な役割を果たすRNA結合蛋白*hfq*遺伝子の欠損株では、TTSSの発現

が上昇し、通常TTSSが発現しない低温条件でも発現が起こることは、Hfq蛋白が低温条件でmRNAの翻訳をブロックし、mRNAの分解を促進させていることが予想された。

(III) 上述の*hfq*欠損変異株を用いて、モルモットの角結膜炎モデルで免疫したところ、血清型をこ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として、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。症状から見た効果は*hfq*欠損変異株によるワクチネーションが有効であり、組織学的な判定でも角膜症状は*hfq*欠損株のほうが少ない結果が得られた。

他のワクチン候補株として*hfq*欠損変異株にプラスミドでTTSSの分泌因子である*ipaBCDA*遺伝子群を保持させた株での免疫を試みたものの、生体での効果は*hfq*欠損変異株のほうが効果的であった。組織学的な判定では角膜上皮の空泡が明らかに多く、かえって効果が下がることが予想された。

抗体の産生量は、培地中に分泌される病原蛋白に関する限り、炎症の程度が強かった野性型菌ほうが多いことが示された。これはワクチン効果の標的となるprotective antigenがこれまで考えられてきた分泌蛋白以外の分子である可能性も考慮する必要があると思われる。*hfq*欠損株で病原性が増加する機序としてType III分泌装置のレギュレーターであるInvE蛋白の転写後抑制が脱抑制され発現量が増加している(論文1)。また、*hfq*欠損株ではTTSS以外の他の病原性蛋白であるIcsB (VirG)の発現も増加していることが示されており、これらの蛋白が直



接、間接的にHfqの制御下にあることも予想される。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や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

(I) 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を利用した型別法を開発した。B群とD群赤痢菌の臨床分離株で検証を行ったところ、年代と地域の異なる株すべてでType strainと同じバンドパターンを示し、型別に用いることができる可能性が示唆された。

(II) TTSS発現調節はそのレギュレータであるInvE蛋白の転写後制御で調節され、その制御にはRNA結合蛋白Hfqが関与する。

(III) 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、上述の*hfq*遺伝子の欠損変異株を用いてモルモットの角結膜炎モデルで評価した。*hfq*欠損株は一定のワクチン効果が認められ、免疫時の炎症が軽いことが認められた。

#### 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

##### 1. 論文発表

Mitobe. J., Morita-Ishihara. T., Ishihama. A., Watanabe. H., 2008. J. Biol. Chem. 182

##### 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

##### <参考文献>

1. Kotloff, K.L., et al., Bull World Health Organ, 1999. 77:651-66.
2. 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
3. Bachellier, S., J. M. Clement, M. Hofnung, and E. Gilson. 1997. Genetics 145:551-62.
4. Ochman, H., and R. K. Selander. 1984. J Bacteriol 157:690-3.
5. Pupo, G. M., D. K. Karaolis, R. Lan, and P. R. Reeves. 1997. Infect Immun 65:2685-92.
6. Hartman, A. B., et al., Infect Immun, 1991. 59:4075-83.

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(ExPEC)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。尿路感染症由来大腸菌を中心に腸管外病原性大腸菌を収集し、病原因子プロファイルを明らかにし、分子系統解析を行った。健康人便由来大腸菌、腫瘍由来大腸菌の収集も併せて行い、その比較解析を行った。腸管外病原性大腸菌の約90%は、系統B2に属する大腸菌であることを示された。しかしながら、系統B2大腸菌であっても、それらの病原因子プロファイルは多彩であることが示された。そこで、MLSTを用いて系統B2大腸菌を細分類し、代表株の選定することで、系統の違いと病原性の違いの一部を明らかにした。今回の解析から、腸管外病原性大腸菌の分子疫学解析の基盤情報を得ることが出来た。

#### 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尿路感染症由来大腸菌を主とした腸管外病原性大腸菌の系統解析を行い、分子疫学解析に有用な基盤情報を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

**菌株の収集** 尿路感染症由来（急性単純性膀胱炎、腎盂腎炎、前立腺炎）大腸菌を兵庫医大泌尿器科 山本博士、京都大泌尿器科 高橋博士 大阪府立大 倉園博士、宮崎大泌尿器科 濱砂博士から分与された。糞便由来大腸菌は、大阪府立大学倉園博士、筑波大学小島博士、臍由来大腸菌は筑波大学 小島博士より分与された。総計399株の大腸菌に関して解析を行った。

**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. meningitidis 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。

### 病原因子プロファイリング

5種類の接着因子、P線毛(*papEF*, *papG II*, *papG III*)、S線毛(*sfaS*)、F1C線毛(*focG*)、afa/DR アドヘジン(*afaBC*)、*iha* アドヘジン)、4種類の毒素遺伝子 *hly*, *cnf-1*, *cdt*, *pks*、および細胞侵入に関わると考えられている *ibeA*、血清耐性に関わる *iss* の存在を PCR 法により確認した。

### 血清耐性能の測定

健常人ヒト血清をプールしたものをを用いて大腸菌の血清耐性の検討を行った。大腸菌(LB broth OD600=0.2-0.3)を 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. 研究結果と考察

### 1. MLST による系統解析

399 株の大腸菌の MLST 型を決定し、112 の MLST 型が同定された。大腸菌は 4 つの主要な系統、A, B1, B2, D に分類されることが MLEE 法による系統解析で明らかにされている。系統が明らかにされている ECOR コレクション大腸菌の MLST 型を含めた系統樹解析から、今回用いた MLST 法では A および B1 を明確に区別することは出来なかったが、A/B1, B2, D の 3 種の分類は可能であった。今回の解析で明らかになった、112 種の MLST は A/B1 に属するものが 50 種(79 株)、B2 に属するものが 39 種(283 株) D に属するものが 20 種 (34 株)、その他 3 種(3 株)であった。

健常人便由来大腸菌(107 株)、臍由来大腸菌(88 株) 尿路感染症由来腸管外病原性大腸菌(204 株)はそれぞれ 60, 38, 40 種の MLST 型を示した。それぞれのグループを構成する菌株数を MLST 型数で除した多様性



指数は、それぞれ 1.78, 2.32, 5.10 となり、腸管外病原性大腸菌が系統的に偏った菌株の集団であることが示された。疾患別および収集時期/地域の異なるコレクションで同一の MLST 型が見いだされることから、尿路感染症の原因となる大腸菌は疾患に関わらず系統的には類似していることが示唆された。

	# of STs	# of isolates	Isolates/STs
Faecal	60	107	1.78
Viginal	38	88	2.32
ExPEC	40	204	5.10

腸管外病原性大腸菌の系統は全てのコレクションにおいて 80%以上は系統 B2 大腸菌であった。便由来大腸菌の約半数が属する系統 A/B1 大腸菌は、腸管外病原性大腸菌の 2-5%程度しか認められなかった。一方で、便由来大腸菌のうち系統 B2 大腸菌は約 35%を占めていた。尿路病原性大腸菌は腸管内に存在し、会陰部の汚染を通して尿路へ侵入すると考えられているが、腸管に常在している大腸菌の一部（系統 B2）が尿路へ侵入したときに尿路病原性を発揮することが考えられた。

#### 大腸菌の由来と系統との関係

単純性急性膀胱炎/腎盂腎炎/前立腺炎から分離された大腸菌、および健康人便あるいは便由来大腸菌の系統の比較を行った。

		total	A/B1	D	B2	NT					
UPEC	total	204	8	3.9%	17	8.3%	178	87.3%	1	0.5%	
	uncomplicated cystitis	#1	52	2	3.8%	3	5.8%	47	90.4%	0	0.0%
	#2	32	1	2.1%	3	9.4%	28	87.5%	0	0.0%	
	total	84	3	3.6%	6	7.1%	75	89.3%	0	0.0%	
	pyelonephritis	72	4	5.6%	4	5.6%	63	87.5%	1	1.4%	
	prostatitis	48	1	2.1%	7	14.6%	40	83.3%	0	0.0%	
Faecal	#1	50	36	72.0%	3	6.0%	11	22.0%	0	0.0%	
	#2	57	25	43.9%	8	10.5%	24	46.8%	0	0.0%	
	total	107	61	57.0%	9	8.4%	37	34.6%	0	0.0%	
	Viginal	88	10	11.4%	8	9.1%	68	77.3%	2	2.3%	
	Total	399	78	19.8%	34	8.5%	283	70.8%	3	0.8%	

## 2. 系統 B2 大腸菌の細分類

系統 B2 大腸菌の尿路病原性が高いことが示唆されたが、疫学解析に役立つ情報を得るためには、系統 B2 菌株間の類似性と

多様性を明らかにする必要がある。MLST による系統解析では、系統 B2 大腸菌はさらに B2\_1 から B2\_8 の 8 つのサブグループに分類可能であった。系統 B2 に属する腸管外病原性大腸菌 178 株のうち 96%が B2\_1 から B2\_8 のいずれかに属することが示された。

### 3. 系統 B2 菌株の血清型

単一な O 血清型を示すサブグループ (B2\_1 (06), B2\_2 (018), B2\_3 (016), B2\_4 (075), B2\_5 (018)) と種々の O 血清型が混在するサブグループ (B2\_6, B2\_7, B2\_8) が存在することが明らかになった。B2\_2, B2\_3, B2\_8 に属する全ての株は K1 夾膜抗原産生性であり、他のサブグループに属する株ではこの産生は認められなかった。

### 4. 系統 B2 サブグループ間の性状比較

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大きな多様性が存在することが示された。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、比較的均一化することが示された。

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。選定にあたっては、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ため、LPS の側鎖部分の保持を確認した。