

論 文 要 旨

Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance

〔 鹿児島県で検出された腸管凝集性大腸菌の病原性に関する
細菌学的検討：バイオフィーム形成能と酸耐性能 〕

徳田 浩一

【序論および目的】

腸管凝集性大腸菌 (EAEC) は、発展途上国だけでなく先進国においても小児下痢症を引き起こす新興腸管病原菌として注目されている。これまで、転写調節因子 AggR を保有する typical EAEC の病原性に関しては比較的詳細に研究されているものの、AggR を保有しない atypical EAEC に関する研究は未だ進んでいない。atypical EAEC も含めて、EAEC の多様性や病原性など細菌学的特徴を解明することは、小児下痢症の原因究明に有用と考えられる。

【材料および方法】

県内医療機関を受診した小児下痢症患児の便より検出された大腸菌を定量的バイオフィームアッセイでスクリーニング ($OD_{570} > 0.2$) 後、HEp-2 細胞付着試験で凝集性付着を示した株を EAEC と判定し、それらに対してパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) や O 血清型別、病原遺伝子 PCR 検査、薬剤感受性試験、酸耐性試験を実施した。統計学的有意水準を 5% とした。

【結 果】

小児下痢症患児 2,417 人の便から、最終的に 102 株 (4.2%、1 患児から 1 株) の EAEC が検出された。病原遺伝子保有パターンや PFGE、O 血清型別の結果から EAEC の多様性が示された。102 株の内訳は typical EAEC 74.5%、atypical EAEC 25.5% であった。これまで typical EAEC において報告された病原遺伝子は、atypical EAEC ではほとんど検出されなかった。バイオフィーム形成能に有意差は認めなかったが、特定の抗菌薬 (ampicillin, cefotaxime, tetracycline) 及び酸 (塩酸、乳酸) 対して、typical EAEC は atypical EAEC より有意な耐性を示した。

【結論及び考察】

typical EAEC が atypical EAEC より病原性の強いことを示唆するいくつかの結果が得られたが、EAEC の大きな特徴であるバイオフィーム形成能には有意差は認めなかった。atypical EAEC を起炎菌とする食中毒集団発生事例が報告されるなど、感染対策上重要な菌と考えられるが、atypical EAEC 固有の病原遺伝子の存在など不明な点も多く、typical 及び atypical EAEC の両者を対象とした研究の継続が必要と考えられる。

(Microbiology and Immunology Vol.54, Issue6. 2010 年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1470 号	氏名	徳田 浩一
審査委員	主査	小田 紘	
	副査	嶽崎 俊郎	松藤 凡

Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance

〔 鹿児島県で検出された腸管凝集性大腸菌の病原性に関する
細菌学的検討: バイオフィーム形成能と酸耐性能 〕

腸管凝集性大腸菌 (EAEC) は、小児下痢症を引き起こす新興腸管病原菌として途上国と先進国の両方で注目されている。これまで、転写調節因子 AggR を保有する typical EAEC の病原性については比較的研究が進んでいるものの、AggR を保有しない atypical EAEC については未だ不明な点が多い。本研究は、鹿児島県の下痢症患児から検出された EAEC に関して、atypical EAEC も含めて EAEC の細菌学的特徴を明らかにすることを目的とした。

本研究では、県内小児医療機関を受診した下痢症患児の便より検出された大腸菌 2417 株に対して定量的バイオフィームアッセイでスクリーニング後、OD₅₇₀ > 0.2 を示した株を対象に HEp-2 細胞付着試験を実施した。鏡検により凝集性付着がみられた 102 株を EAEC と判定し、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) や O 血清型別、病原遺伝子の PCR 検査、抗菌薬感受性試験、酸耐性試験 (塩酸、乳酸、酢酸) を実施した。

本研究で得られた知見は次のとおりである。

1. 本県で検出された EAEC に遺伝子的多様性のあることが判明した。既知の 3 つの線毛遺伝子を保有したのは typical EAEC 76 株中の 16 株 (21.1%) のみであった。
2. O 血清型は 50% が untypeable であった。抗菌薬感受性はセフェム系薬とホスホマイシンへの感受性が良好であった。塩酸と乳酸に対しては、酸耐性を有することで知られる腸管出血性大腸菌と同等かそれ以上の耐性率を示した。
3. typical EAEC と atypical EAEC のいずれもが様々な病原因子を保有していることが判明した。バイオフィーム形成能に差はなかったが、酸耐性試験や抗菌薬感受性試験の結果から、typical EAEC は atypical EAEC より病原性の強い可能性が示唆された。
4. 過去に typical EAEC に関して報告された 14 の病原遺伝子のうち atypical EAEC から検出されたのは 2 つのみであったことから、未知の病原遺伝子が atypical EAEC に存在する可能性が考えられた。
5. EAEC の病原性を明らかにするため、typical EAEC だけでなく atypical EAEC も含めて、今後さらに細菌学的及び疫学的な研究が必要と考えられた。

本研究は、これまで十分に研究されていなかった atypical EAEC も含めて、EAEC の細菌学的特徴について明らかにした点で重要である。EAEC の抗菌薬感受性に関する報告は本邦では初めてであり、酸耐性に関するデータは世界的にも新たな知見といえる。この結果は、本邦における細菌性下痢症の研究と臨床に重要であるとともに、世界における下痢原性大腸菌の研究にも意義のある報告と考える。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1470 号	氏名	徳田 浩一
審査委員	主査	小田 紘	
	副査	嶽崎 俊郎	松藤 凡
<p>主査および副査の3名は、平成22年5月17日、学位請求者 徳田浩一 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) EAECは自然界ではどのような場所に存在しているか。 (回答) 環境中に存在するが、近年食品からの検出頻度が下痢原性大腸菌の中でも高いと報告されている。</p> <p>質問2) ヒト以外で保有している動物はあるか。 (回答) EAECにおけるヒト以外の保有宿主に関する報告は見当たらない。以前、本学農学部より供与されたウシの便由来の大腸菌約100株について調べたところ、EAECは1株も検出されなかった。</p> <p>質問3) 研究に用いる大腸菌をどのようにして収集したか。 (回答) 主に鹿児島市内の小児医療機関を受診した下痢症患児から診療上必要と考えられて提出された便培養検体由来の大腸菌を、医療機関の承諾を得た上で検査センターから譲り受けた。</p> <p>質問4) 下痢の程度など臨床症状についても収集したか。 (回答) 詳細な臨床症状は収集していない。</p> <p>質問5) 患者由来の菌を収集するにあたり、倫理的な問題をどのように考えたか。 (回答) 患者からの便検体は診療上の必要性があつて収集されたものであり、さらに日本細菌学会や臨床微生物学会の倫理規定において、細菌学的な基礎的研究を行う場合で、患者の病状などのデータが研究に用いられない場合には患者の承諾は不要とされているため、本研究では患者からの同意書は不要と判断した。</p> <p>質問6) 定量的バイオフィルムアッセイに偽陰性の存在する可能性はあるか。 (回答) EAECがOD>0.2を示すことは、Wakimotoらの研究で証明されているが、今回の研究においてもOD≤0.2の中にEAECが存在する可能性を考慮して、OD≤0.2の菌の一部に対してHEp-2細胞付着試験を実施し、EAECが存在しないことを確認したため、偽陰性はほぼないと考えられる。</p> <p>質問7) テトラサイクリンに対して耐性率が高値である理由は何が考えられるか。 (回答) 正確な機序は不明だが、テトラサイクリンは成人で比較的多用される傾向があり、使用頻度の高いことが耐性につながっている可能性も考えられる。</p> <p>質問9) atypical EAECがtypical EAECの保有する特異的線毛を持たないのであれば、本菌の腸管粘膜への付着はtypical EAECとは異なる機序による可能性があるか。 (回答) atypical EAECの付着機序については、未知の線毛によるものや、線毛以外の付着性因子が関わっている可能性が考えられ、研究が進められているが、この点についてはtypical EAECでも同様であり、既知のAAF I・II・IIIを保有する割合が低いことから、別の線毛や付着因子を保有する可能性が考えられている。</p> <p>質問10) 凝集するというEAECの特徴が、病原性とどのように関わっているか。 (回答) 凝集してバイオフィルムを形成することにより、宿主の免疫システムから免れ、より長期に腸内に存在して病態を遷延させるなど、広義の病原性に関連すると考えている。</p> <p>質問11) 本研究では、atypical EAECや凝集性の弱いタイプのEAECの存在や、さらにtypical EAECとatypical EAECでO血清型の分布や病原遺伝子の保有状況が大きく異なることなどが報告されたが、これらの菌をEAECという1つのカテゴリーに入れることの妥当性、すなわちEAECの定義はどのように考えているか。 (回答) EAECの判定は、凝集性付着など特徴的な表現型に基づいて行われているが、菌によって病原遺伝子の保有状況が様々であること、typical EAECとatypical EAECでは、血清型や病原遺伝子のパターンに解離がみられることから、今後より詳細な検討が必要と考えている。本研究では、atypical EAECがtypical EAEC</p>			

と同等のバイオフィーム形成能を有していること、また他の下痢原性大腸菌に特異的な病原遺伝子が検出されなかったこと、典型的なレンガ積み様付着を示さなかった株でも EAEC に特異的な *aggR* を有するものがみられことから、現時点では EAEC という 1 つのカテゴリーに分類するのが妥当と考えている。しかし今後、新たな病原因子が明らかになり、別のカテゴリーに分類される可能性はある。

質問 12) EAEC 検出において、ガラスとポリスチレンへの付着を同等に取り扱うことに問題はないか。

(回答) EAEC については当初より、ガラス面以外の物質表面にも付着する特徴が報告されており、定量的バイオフィームアッセイは、この特性をスクリーニングに応用したものである。今回の研究においてもスクリーニング法として用いており EAEC の定義には含めておらず、問題ないと考えている。またこれまでの研究においては、ガラス面への付着とポリスチレンへの付着は 100% 一致している。

質問 13) PFGE で 64 パターンに分類されたが、これには解析ソフトの使用など、どのような方法を用いたか。

(回答) PFGE 写真上のバンドを、マーカーを基準として並べて比較検討した。1 バンドの相違をもって異なるパターンと判断した。解析ソフトは用いなかった。

質問 14) EAEC の各株の細菌学的特徴と患者の症状を比較検討することはできなかったか。Typical EAEC と atypical EAEC の間で、何らかの臨床的な違いはなかったか。

(回答) カルテからの詳細な臨床症状の抽出は困難であり、比較検討できなかった。

質問 15) atypical EAEC に、本当に病原性があるといえるか。

(回答) 過去に、ウイルス性や他の細菌性を鑑別した上で atypical EAEC が原因菌と判断された集団発生事例が複数報告されており、本菌が病原性を有することは立証されている。ただし今回、我々の検出した atypical EAEC が、患児の下痢症にどれほど関与しているかは不明であり、より詳細な検討が必要と考えている。

質問 16) atypical EAEC は typical EAEC が保有する病原遺伝子をほとんど持たないとのことであったが、病原性を発現する機序が両者で全く異なる可能性があるか。

(回答) atypical EAEC は *aggR* を保有せず、AA プローブも検出できないことから、多くの病原遺伝子が存在する pAA プラスミドを保有しておらず、病原性発現の機序が typical EAEC と全く異なる可能性が高い。

質問 17) 塩酸への耐性試験の結果で、負荷 30 分以降で菌が死滅しない状態が長く続いているのは、どのような理由が考えられるか。また累積曲線が、180 分前で急に 100% に達しているのはなぜか。

(回答) EAEC は経口的に宿主に取り込まれた後、pH2 の環境である胃を通過したのち、pH5~6 の大腸内で長く生存する能力を有している。つまり pH2 の塩酸環境には耐えうるが、生体には存在しない pH2 の乳酸環境には弱いという、生体内での生存状況を反映した結果であることが推察される。長時間の酸負荷により菌は死滅するという前提で、各累積曲線の 180 分時点の値を便宜的に 100% としたが、180 分以降の酸耐性を実際に確認してはいない。

質問 18) 今回の報告は鹿児島県で検出された EAEC に関するものであったが、日本国内の他の地域あるいは世界の EAEC と比較して、病原遺伝子の保有状況などに違いはあるか。

(回答) EAEC に関する疫学調査が少なく、国内での比較は困難であった。発展途上国との比較では、病原遺伝子の保有パターンが大きく異なっていたが、この傾向は他国間や他国内でも同様にみられ、国や地域ごとに病原遺伝子の保有状況は多様であった。先進国については比較し得るデータに乏しく行っていない。

質問 19) EAEC は凝集性付着するという特徴があるが、凝集性付着する菌は全てバイオフィームを形成すると考えてよいか。

(回答) 現在のところ EAEC は、細胞やガラス面への付着とバイオフィーム形成能を有する菌として定義されている。EAEC では、凝集に関連する遺伝子と付着に関連する遺伝子の 2 種類が存在し、共に *aggR* の制御下に同時に発現すると考えられている。

質問 20) 成人も EAEC を保有するか。

(回答) 成人からも EAEC が検出されるが、疫学データはあまり報告されていない。EAEC に特異的な免疫をもつ割合が高くなるため、保有率は小児より低いと考えられる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。