

17. 愛知県の健常者における腸管病原性大腸菌の保有調査 及び遺伝的性状の解析

○高橋 佑太、齋藤 典子、安井 善宏 (愛知県衛生研究所)

【研究目的】

腸管病原性大腸菌(EPEC)は乳幼児胃腸炎や食中毒の原因菌である一方、健常者からも分離される。EAF プラスミドを保有しない非典型的な EPEC (aEPEC)は近年下痢症患者からも多く分離されているが、病原機構は解明されていない。本研究では健常者から分離された大腸菌を用いて aEPEC の保有状況を調査し、遺伝的性状を解析することで、aEPEC の病原機構の解明に重要な基礎的データの収集を目的とする。

【研究の必要性】

大腸菌はヒトの腸管正常菌叢の一つであり、そのほとんどは病原性を持たないが、一部に下痢を引き起こすものがあり、下痢原性大腸菌と総称されている。下痢原性大腸菌のカテゴリ一分類には血清型が使用されてきたが、2012 年 1 月に衛生微生物技術協議会にて下痢原性大腸菌分類の見直しが行なわれた。特に腸管病原性大腸菌(*enteropathogenic Escherichia coli*、以下 EPEC)に分類される下痢原性大腸菌は従来の血清型ではなく、保有する遺伝子を分類の指標とすることとなった。

EPEC は乳幼児胃腸炎の原因菌であると同時に食中毒原因菌であり、その病原性には腸管上皮への定着因子である細胞外膜蛋白(インチミン)と bundle-forming pilus (BFP)と呼ばれる付着線毛の関与が知られている。インチミンをコードしている *eae* 遺伝子は染色体上の locus of enterocyte effacement (LEE) 領域に存在し、EPEC の指標遺伝子として最も汎用されている。また、BFP をコードしている BFP 合成遺伝子群の中の *bfpA* 遺伝子は EAF プラスミド上に存在し、この遺伝子も EPEC の指標遺伝子として使用されている。EAF プラスミド上には、BFP 合成遺伝子群だけでなく、LEE 制御遺伝子も存在し、LEE の発現を調節している。EPEC は EAF プラスミドの有無によって典型的な EPEC (tEPEC)及び非典型的な EPEC (aEPEC)に分類される。EAF プラスミドを保有する tEPEC は細胞への付着及び LEE の発現調節が可能であり、腸管上皮への接着及び定着により下痢を引き起す。一方で、aEPEC は EAF プラスミドを保有していないため、細胞への付着及び LEE の発現調節機構について未だ不明な部分が多い。

aEPEC は健常者からも分離されることが知られていたが、近年、下痢症患者からも多く分離されるようになり、aEPEC の病原機構についてはさらなる調査が必要と示唆されてい

る。病原機構の解明のためには下痢症患者由来 aEPEC だけでなく、健常保菌者(無症状保菌者)由来の aEPEC の遺伝的性状も解析する必要がある。本研究の健常者における aEPEC の保有状況調査及び分離された aEPEC の遺伝的性状の解析は、aEPEC の病原機構の解明に重要な基礎的データとなる。

【研究計画】

2019 年から 2023 年に愛知県内(政令指定都市及び中核市を除く)の食中毒関連検体から分離された食中毒原因菌ではない大腸菌計 622 株を供試菌株とし、以下の検査を実施した。

① 健常者における EPEC の保有状況調査

- (1) EPEC の指標遺伝子である *eae* 遺伝子及び tEPEC と aEPEC の分類指標である *bfpA* 遺伝子の探索¹⁾
- (2) *eae* 遺伝子が陽性となった株に対して、既報に従い O 血清遺伝子²⁾ 及び H 血清遺伝子³⁾ の型別

② 検出された aEPEC の遺伝子解析

- (1) *eae* 遺伝子の遺伝子型別
- (2) EAF プラスミド上以外の既知の LEE 制御遺伝子の探索

【実施内容・結果】

① 健常者における EPEC の保有状況調査

- (1) 供試菌株 622 株に対し、PCR 法により *eae* 遺伝子及び *bfpA* 遺伝子の探索を実施した。その結果、*eae* 遺伝子が検出されたのは 14 株であり、EPEC の検出率は 2.3% だった。また、tEPEC と aEPEC の分類指標である *bfpA* 遺伝子は 622 株全て陰性であったことから、今回供試した菌株から検出された EPEC は全て aEPEC であった。
- (2) aEPEC 14 株について、O 血清遺伝子型別及び H 血清遺伝子型別を実施した。O 血清遺伝子型別において增幅産物が得られず、型別ができなかつたものを OgUT とした。

O 血清遺伝子型別の結果、12 種類(OgUT を 2 株含む)が検出され、Og109 及び Og137 のみ 2 株ずつ検出された。H 血清遺伝子型別の結果、7 種類が検出され、複数株から検出された H 血清遺伝子型は Hg34(4 株)、Hg6(3 株)及び Hg21(3 株)であった。14 株は 12 血清遺伝子型に分類され、多岐にわたっていた。2 株ずつ検出された Og109 及び Og137 の H 血清遺伝子型はそれぞれ Hg21 及び Hg6 と一致していた(表 1)。

② 検出された aEPEC の遺伝子解析

aEPEC 14 株について、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)を用いてライブラリーを作製し、Miseq (Illumina)を用いて全ゲノム解析を実施した。取得した塩基配列データを skesa (v2.5.1)でアセンブルし、contig ファイルを作製した。

- (1) *eae* 遺伝子型別を実施するために、VirulenceFinder のデータベース(2024-04-06)より 65 種類の *eae* 遺伝子型に対応する塩基配列を取得し、ローカルデータベースを構築した。各菌株の contig ファイルをクエリとして、構築したデータベースに対して Local BLAST (blastn)を実施し、最も高い相同意を示したものを *eae* 遺伝子型とした。

eae 遺伝子型別の結果、14 株から 8 種類の遺伝子型が検出され、最も多く検出された *eae* 遺伝子型は β 2a の 3 株、次いで α 1、 β 1a、 ι 1 及び θ が 2 株ずつ、 α 2、 η 2 及び \circ が 1 株ずつであった(表 1)。

(2) 染色体上の既知の LEE 制御遺伝子の探索は、各菌株の contig ファイルについて Bakta (v1.8.2, DB : v5.0 Light)でアノテーションし、表 2 に示した遺伝子の有無を調べた。LEE 領域外にコードされている遺伝子探索は、文献(4)を参考に LEE 領域のマスター・レギュレーターである *ler* 遺伝子の発現に直接関与している遺伝子のうち、tEPEC E2348/69 株において Bakta によるアノテーションで保有を確認できた遺伝子を選定した。

制御遺伝子探索の結果、LEE 領域にコードされている 3 つの遺伝子及び LEE 領域外にコードされている 6 つの遺伝子について、全ての株で保有が確認できた(表 1)。

表 1 aEPEC 14 株の血清遺伝子型、*eae* 遺伝子型及び制御遺伝子の保有状況

#	O 血清 遺伝子型	H 血清 遺伝子型	<i>eae</i> 遺伝子型	制御遺伝子*								
				<i>ler</i>	<i>grlA</i>	<i>grlR</i>	<i>cra</i>	<i>hns</i>	<i>kdpE</i>	<i>nagC</i>	<i>qseA</i>	<i>qseD</i>
1	Og81	Hg34	α 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	OgUT	Hg25	α 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	Og132	Hg34	α 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	Og109	Hg21	β 1a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	Og109	Hg21	β 1a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	Og137	Hg6	β 2a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	Og137	Hg6	β 2a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	OgUT	Hg6	β 2a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	Og86	Hg45	η 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	Og55	Hg34	ι 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	Og126	Hg34	ι 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	OgGp10	Hg11	\circ	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	Og108	Hg21	θ	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	Og156	Hg8	θ	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* : 制御遺伝子について、保有していれば「1」、保有していない場合は「0」とした

表2 探索した制御遺伝子及びその制御機構

制御遺伝子	制御	制御機構
LEE 領域		
<i>ler</i>	活性化	<i>grlA</i> 及び LEE2-LEE5 領域の転写促進
<i>grlA</i>		LEE1 プロモーター領域に結合し、 <i>ler</i> 及び LEE 領域の転写促進
<i>grlR</i>		GrlA に結合し、 <i>ler</i> 及び LEE 領域の転写抑制
LEE 領域外		
<i>cra, kdpE, qseA</i>	活性化	LEE1 プロモーター領域に結合し、 <i>ler</i> の転写促進
<i>hns, nagC, qseD</i>	抑制化	LEE1 プロモーター領域に結合し、 <i>ler</i> の転写抑制

【考察と今後の課題】

本研究では、食中毒関連検体由来の大腸菌 622 株のうち 14 株(2.3%)から EPEC が検出され、その全てが EAF プラスミド(*bfpA* 遺伝子)を保有しない aEPEC であった。窪村ら⁵⁾の報告によると、健常者の便検体から 3.4% (23/682 検体)の EPEC が検出され、全てが aEPEC であった。また Lili Wang⁶⁾らの報告では、*bfpA* 遺伝子の保有状況については明記されていないものの、健常者の便検体から 5.4% (26/482 検体)の割合で EPEC が分離されている。これらの結果から、愛知県内の健常者における aEPEC の保有状況は国内の他地域と同程度であると示唆された。

血清遺伝子型別の結果、aEPEC で検出率の高い血清型として報告⁷⁾された血清型に該当する遺伝子型は Og55:Hg34 のみであり、aEPEC の血清型は多岐にわたると考えられた。

eae 遺伝子は、N 末端領域が保存されている一方で、細胞への結合活性が局在する C 末端領域に高度な多様性が認められており、この領域の配列に基づいて複数の遺伝子型に分類されている。これらの遺伝子型は、宿主特異性や組織向性、さらには病原性の違いに関与していると考えられている⁸⁾。本研究において検出された 8 種類の *eae* 遺伝子型は、2016 年に中国で実施された研究⁹⁾において下痢症患者から検出された *eae* 遺伝子型に含まれており、病原性を有する可能性が示唆された。

LEE 領域の発現は、宿主、環境及び微生物に由来する複数のシグナルを感知し統合され、非常に複雑なプロセスで制御されている。40 以上の制御因子が報告されており、それらは制御の中心である *ler* 遺伝子に収束する⁴⁾。本研究において探索した遺伝子のうち LEE 領域外にコードされている遺伝子は、種々のシグナルによって発現され、*ler* 遺伝子を含む LEE1 領域のプロモーターに直接関与するものであり、LEE の発現制御に重要であると考えられる。tEPEC E2348/69 株の EAF プラスミドを欠失させた株においても、欠失していない株より頻度は低いものの、腸管上皮細胞に対して EPEC に特徴的な attaching/effacement lesion (A/E 障害)を引き起こすことが報告されており、tEPEC E2348/69 株の染色体上の制御遺伝子で LEE 領域の発現が可能なことを示している¹⁰⁾。本研究において検出された aEPEC は、今回探索した遺伝子全てを保有しており、各遺伝子の上流の制御については探索できていないものの、tEPEC E2348/69 株と同様に LEE 領域の

発現が可能であると考えられた。

本研究によって、愛知県内における aEPEC の保有状況及びその aEPEC の LEE 領域の発現に関与している遺伝子の保有状況が明らかとなった。愛知県内の aEPEC の保有状況は国内の類似調査と同程度(2.3%)であった。aEPEC で検出率が高いと報告されている血清遺伝子型に該当する株は 1 株のみであったが、検出された *eae* 遺伝子型は全て下痢症患者から検出されたことのある遺伝子型であった。また、今回検出された aEPEC 14 株は tEPEC E2348/69 株が染色体上に保有している LEE 制御遺伝子を同様に保有しており、LEE 領域の発現が可能であると示唆された。宿主細胞との付着に関して、tEPEC は初期接着に BFP が関与しているが、aEPEC は様々な付着因子が関与していると報告¹¹⁾されているため、今後は本研究において検出された aEPEC の付着因子の探索を行っていきたい。

【参考文献】

- 1) 磯崎将博. 日本臨床微生物学雑誌, Vol.26, No.1 (2016)
- 2) Iguchi A et al. J Clin Microbiol. 53(8):2427–2432 (2015)
- 3) Banjo M et al. J Clin Microbiol. 56(6):e00190-18 (2018)
- 4) R Christopher D Furniss et al. J Bacteriol. 200(2):e00336-17 (2018)
- 5) 窪村亜希子. 日本感染症学雑誌, 第 89 卷, 第 1 号(2015)
- 6) Lili Wang et al. Jpn J Infect Dis. 70(4):464-469 (2017)
- 7) Ahmad O M et al. Cureus. 17(5):e83475 (2025)
- 8) Rodrigo T Hernandes et al. FEMS Microbiol Lett. 297(2):137-49 (2009)
- 9) Yanmei Xu et al. PLoS One. 11(3):e0152571 (2016)
- 10) S Knutton et al. Infect Immun. 55(1):69–77 (1987)
- 11) Alfredo G Torres et al. Infect Immun. 73(1):18–29 (2005)

【経費使途明細】

使 途	金 額
PCR 試薬(Takara Ex Taq Hot Start, DreamTaq Green PCR Master Mix) 遺伝的性状の解析に使用した試薬 (Puregene Cell Kit) (QIAseq FX DNA Library UDI Kit, Puregen Cell Kit)	111,298 円 153,340 円
プラスチック製品(PCR プレート・チューブ、チップ) 振込手数料(660 円 × 2)	34,042 円 1,320 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円