

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04651

研究課題名(和文) ケニアとタイでの定型、非定型腸管病原性大腸菌の流行状況と薬剤耐性を含む性状解析

研究課題名(英文) Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of typical and atypical EPEC in Thailand and Kenya

研究代表者

山崎 伸二 (Yamasaki, Shinji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70221653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：タイ、ケニアともeae遺伝子陽性大腸菌が患者検体から検出され、かつ、食品検体からも検出された。同じ検体からbfp遺伝子は検出されず、流行しているのは非定型腸管病原性大腸菌(tEPEC)ではなく定型腸管病原性大腸菌(aEPEC)であると考えられた。一方、ケニアではE. albertiiに特異的なEacdt遺伝子は検出できなかったが、タイでは、食品のみならず下痢症患者便からE. albertiiに特異的なEacdt遺伝子が検出できた。タイではE. albertiiが下痢症に関わっている可能性が初めて示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

eae、bfp及びEAF遺伝子が陽性のEPECが、特に開発途上国では下痢症の原因であると考えられてきた。今回、タイ、ケニアにおいてeae遺伝子のみ陽性のaEPECが主流であることが明らかとなった。aEPECはstx2ファージが感染することでEHECになることからtEPECよりより病原性が強いと言われている。一方、今回初めてE. albertiiをタイの食品のみならず下痢症患者便から検出した。今後、aEPECとtEPECを鑑別できる検査法やE. albertiiの検査法を普及することで、これらの細菌の疫学や下痢症起因菌としての位置づけをより明確にできることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：food samples, in particular, meats in both Thailand and Kenya. However, bundle forming pilus (bfp) gene was not detected in the same sample and even in eae gene-positive Escherichia coli isolated. These data indicate that atypical enteropathogenic E. coli (only eae gene-positive) is prevalent but not typical enteropathogenic E. coli (both eae and bfp gene-positive) in Thailand and Kenya. In addition, Escherichia albertii specific gene such as Eacdt genes were also detected in meat samples as well as stool specimens of diarrheal patients in Thailand. Furthermore, E. albertii was isolated from not only meat samples but also diarrheal patient. The isolates do not contain stx2 genes but produce biological active cytolethal distending toxin. Two E. albertii isolates were multi-drug resistant. Taken together, eae gene-positive bacteria such as aEPEC and E. albertii might be important emerging zoonotic pathogens.

研究分野：細菌学

キーワード：eae遺伝子 下痢病原性大腸菌 aEPEC tEPEC E. albertii

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、下痢原性大腸菌は少なくとも5種類、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管組織侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管毒素産生性大腸菌 (ETEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、そして腸管凝集性大腸菌 (EAEC) に分類されている。さらに、EPEC には、*eae*、*bfp* と EAF 遺伝子全てを保有する定型腸管病原性大腸菌 (tEPEC) と *eae* 遺伝子のみ保有する非定型腸管病原性大腸菌 (aEPEC) の2種類ある。我々は、6番目の下痢原性大腸菌として細胞膨化致死毒素産生大腸菌 (CTEC) について長年研究を行ってきた。その結果、インドの血便を呈した小児下痢症患者から分離した CTec が tEPEC であり、我が国から分離した小児下痢症患者から分離した CTec の一部は *eae* 遺伝子陽性の aEPEC であった。家畜から分離した CTec の一部も *eae* 遺伝子陽性の aEPEC であった。さらに、*cdtII* 遺伝子が陽性で当初大腸菌 (CTec) と同定された17株全てが *eae* 遺伝子陽性で *E. albertii* であることを明らかとした。また、我が国の小児下痢症患者から *cdtII* 遺伝子と *eae* 遺伝子陽性の当初大腸菌と同定された菌を分離し、その後の詳細な解析で Stx2f 産生性の *E. albertii* であることを報告した。近年、先進国のみならず開発途上国においても aEPEC の分離報告例が増えている。我が国においても、輸入鶏肉から aEPEC が多数分離され、タイにおいても予備的な実験で下痢症患者から *eae* 遺伝子のみ陽性の aEPEC が分離されている。しかし、開発途上国における情報は少なく、アフリカにおいてはタンザニアから、アジアではインド、ベトナム、モンゴルからは aEPEC の分離報告例があるが、ケニアやタイから aEPEC の報告例はほとんどない。よって、下痢症が多発しているが、原因菌が十分に調べられていないケニアとタイにおいて tEPEC に加え新興病原菌である aEPEC や *E. albertii* がどの程度の割合で下痢症と関わっているのか、食品を含めた環境からもどの程度検出されるかの疫学情報を得て、さらに分離菌の細菌学的性状や薬剤感受性を調べ、その重要性、検査法及び治療法に関する情報を得ることは当該国のみならず世界的に意義あると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

腸管病原性大腸菌は、開発途上国の小児下痢症の重要な病原菌で *eae*、*bfp*、EAF 遺伝子が陽性と定義されている。しかしながら、近年、*eae* 遺伝子のみ陽性で *bfp*、EAF 遺伝子陰性の非定型腸管病原性大腸菌 (aEPEC) の分離報告例が先進国のみならず開発途上国でも増えている。また、aEPEC は tEPEC と様々な点で異なり、むしろ腸管出血性大腸菌と類似しているのではとされている。近年、(a)EPEC や EHEC と同定されていた菌の一部が *Escherichia albertii* であることも明らかとなってきた。

そこで、本研究では下痢症が多発しているが原因菌が明らかとされていないケニアとタイにおいて aEPEC と tEPEC がどの程度の割合で下痢症患者から分離されるのか、感染源と考えられる家畜や食品からどの程度の割合で検出されるのか、aEPEC と類似の *E. albertii* が含まれていないか、また、分離菌の細菌学的性状や薬剤耐性についても調べることを目的とした。また、*E. albertii* をより効率的に検出、分離することを目的に *E. albertii* の選択培地、および特異的検出系の開発も行い、それらを本実験に用いた。

3. 研究の方法

タイの検体：下痢症患者便 328 検体と 88 検体を TSB で 37°C、一夜震盪培養し、培養液を TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0] 1 mM EDTA) buffer で 10 倍希釈し、100°C、10 分間加熱し、遠心分離を行なった後、上清を回収し PCR 用の鋳型 DNA とした。バンコク郊外のオープンマーケットとスーパーマーケットで鶏肉 43 検体、豚肉 48 検体、牛肉 38 検体、様々な野菜 60 検体を購入し、上記と同様に TSB で一夜震盪培養し、培養液を TE buffer で 10 倍希釈し、100°C、10 分間加熱し、遠心分離を行なった後、上清を回収し PCR 用の鋳型 DNA とした。

ケニアの検体：モンバサ近郊の下痢症患者便 130 検体と 18 検体を滅菌 PBS に懸濁し、懸濁液を MacConkey 寒天培地に植菌し、37°C、一夜培養した。得られたコロニーをコロニースリーブとしてかきとり、TE buffer に懸濁後、100°C、10 分間加熱し、遠心分離を行なった後、上清を回収し PCR 用の鋳型 DNA とした。鶏の便 45 検体と羊の便 45 検体を上記と同様に処理し PCR 用

の鋳型 DNA とした。

PCR : リアルタイム PCR は、Iijima らの方法 (Jpn. J. Infect. Dis., 70(1): 80-83, 2017) に準じて 8 種類の下痢原性大腸菌の病原遺伝子(*eae*, *bfp*, *ipaH*, *elt*, *estp*, *esth*, *stx1*, *stx2*, *aggR*) を検出した。また、通常の PCR で *eae* 遺伝子、*stx* 遺伝子、*Eacdt* 遺伝子、*Eccdt* 遺伝子、*est* 遺伝子及び *elt* 遺伝子を検出した。

菌分離と同定 : PCR 陽性の TSB での増菌液及びコロニースライプの PBS 懸濁液を MacConkey 寒天培地に塗り広げ、37°C 一夜培養した。得られたコロニーをニトロセルロース膜あるいはナイロン膜に転写し、アルカリ・中和処理により菌を溶菌させ、DNA を解離し、膜に固定した。その後、陽性となった当該遺伝子の PCR 産物を用いて ³²P で標識したプローブを作製し、コロニーハイブリダイゼーションにより当該遺伝子陽性菌を単離した。単離後、再度 PCR で当該遺伝子が陽性であることを確認した。分離菌が大腸菌であることは生化学的性状解析で確認した。分離菌が *E. albertii* であることは、*Eacdt* 遺伝子の検出と糖分解試験等に基づく生化学的性状試験で確認した。

O-genotype : 大腸菌の O 血清型は井口らの方法 (J Clin Microbiol, 53: 2427-2432, 2016) に準じた O-genotyping 法により行なった。

病原遺伝子プロファイル : 分離した大腸菌あるいは *E. albertii* について、*bfp* 遺伝子、*eae* 遺伝子、*stx1* & *stx2* 遺伝子、*Eacdt* 遺伝子の分布を PCR 法で確認した。

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) : PFGE は、CDC のプロトコールに従い、DNA の切断は XbaI を用いて行なった。

薬剤感受性試験 : 薬剤感受性試験は、CLSI のプロトコールに則り、ディスク拡散法にて行なった。アンピシリン 10、セフトジジム 30、セフトジジム 30/クラバン酸 10、セフォタキシム 30、セフォタキシム 30/クラバン酸 10、イミペネム 30、メロペネム 10、ホスホマイシン 50、ストレプトマイシン 10、カナマイシン 30、ゲンタマイシン 10、テトラサイクリン 30、クロラムフェニコール 30、ナリジクス酸 30、シプロフロキサシン 5、ST 合剤を用いた。

4 . 研究成果

PCR による特異遺伝子の検出及び菌分離 :

ケニアの下痢症患者便 148 検体についてリアルタイム PCR 法で調べた結果、16 検体で *eae* 遺伝子、5 検体で *ipaH* 遺伝子、4 検体で *aggR* 遺伝子、1 検体でそれぞれ *elt* 遺伝子と *estp* 遺伝子を検出した。通常の PCR では、12 検体で *eae* 遺伝子を検出し、現在のところ 4 検体から *eae* 遺伝子陽性菌を分離したが、*stx* 遺伝子、*Eccdt* (*Eacdt* を含む) 遺伝子は全てで陰性であった。一方、*elt* 遺伝子が 2 検体で陽性となり、そのうち 1 検体から *elt* 陽性菌を分離した。

ケニアの鶏由来 45 検体についてリアルタイム PCR 法で調べた結果、15 検体で *eae* 遺伝子、7 検体で *aggR* 遺伝子、5 検体で *elt* 遺伝子、4 検体で *stx1* 遺伝子、3 検体で *stx2* 遺伝子を検出した。一方、通常の PCR では、11 検体で *eae* 遺伝子、8 検体で *elt* 遺伝子、2 検体で *Eccdt* 遺伝子を検出した。ケニアの羊由来の 45 検体について通常の PCR で調べた結果、26 検体で *srx1* 遺伝子、9 検体で *eae* 遺伝子、6 検体で *stx2* 遺伝子を検出したが、*Eacdt* 遺伝子は検出されなかった。現在、羊由来 45 検体についてリアルタイム PCR で調べているところである。

一方、タイの下痢症患者便 416 検体のうち 10 検体から *eae* 遺伝子、4 検体から *Eacdt* 遺伝子を検出した。菌の分離は現在試みているところである。タイの鶏肉 43 検体から 24 検体で *eae* 遺伝子、11 検体で *Eacdt* 遺伝子、2 検体で *stx* 遺伝子を検出した。豚肉 48 検体から 22 検体で *eae* 遺伝子を、16 検体で *stx* 遺伝子を、12 検体で *Eacdt* 遺伝子を検出した。牛肉 38 検体から 20 検体で *eae* 遺伝子、10 検体で *Eacdt* 遺伝子、9 検体で *stx* 遺伝子を検出した。様々な野菜 60 検体についても同様に調べた結果、バジル、白菜、オオバコエンドウ、サラダレタスそれぞれ

1 検体で、きゅうり 2 検体の合計 6 検体で *eae* 遺伝子を検出した。*eae* 遺伝子陽性菌については、鶏由来 14 検体から 15 株、豚肉由来 3 検体から 5 株、牛肉由来 6 検体から 6 株分離した。*Eacdt* 遺伝子陽性菌については、豚肉由来 7 検体から 1 株、牛肉由来 6 検体から 3 株分離したが鶏由来 3 検体からは分離できなかった。*stx* 遺伝子陽性菌については、豚肉由来 6 検体から 2 株分離した。野菜由来 6 検体から 2 株（キュウリとサラダレタスそれぞれ 1 株）分離した。

分離菌の性状解析：

タイの食品から分離した *stx* 遺伝子陽性菌 2 株、*eae* 遺伝子陽性菌 21 株、*Eacdt* 陽性菌 4 株の細菌学的性状について解析した。その結果、生化学的性状より *stx* 遺伝子陽性菌と *eae* 遺伝子陽性菌は大腸菌で、それぞれ *stx2e* 遺伝子陽性の STEC と EPEC であった。また、*Eacdt* 遺伝子陽性菌は *E. albertii* であると確認できた。また、STEC 2 株は他の病原遺伝子 (*eae*, *Eacdt*, *bfp*) を保持していなかった。EPEC 19 株は他の病原遺伝子 (*stx*, *Eacdt*, *bfp*) を保持せず、aEPEC であった。*E. albertii* 4 株も、他の病原遺伝子 (*stx*, *bfp*) を保持していなかった。

aEPEC 21 株について PFGE で解析した結果、異なる鶏肉から分離された aEPEC が同一の PFGE パターンを示した一方、同一の鶏肉から分離した aEPEC が異なる PFGE パターンを示した。これらの検体は同じ日にオープンマーケットで購入した鶏肉であるため、交差汚染が起きていた可能性が考えられた。また、同一の豚肉から分離した aEPEC 3 株が同一の PFGE パターンを示した。最終的に 21 株の aEPEC は 17 の PFGE パターンに分けられた。

O-genotype については、STEC 2 株がそれぞれ O_gGp15 と O_g8 に、aEPEC 21 株はそれぞれ、O_g80 が 5 株、O_gGp5 が 3 株、O_g157 が 2 株、O_g12, O_g71, O_g76, O_g109, O_gGp3 がそれぞれ 1 株、O_gUT が 4 株であった。

分離菌の薬剤感受性：

E. albertii については、ナリジクス酸にのみ耐性を示したものが 1 株、3 クラス 3 剤に耐性の多剤耐性株が 2 株（アンピシリン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン；ホフオマイシン、テトラサイクリン、シプロフロキサシン）あった。STEC については、2 株とも 5 クラス 5 剤、7 クラス 9 剤に耐性の多剤耐性菌であった。aEPEC については、1 株が 1 剤に耐性、6 株が 2 クラス 2 剤に耐性であった。また、1 株が 4 クラス 5 剤に耐性、4 株が 5 クラス 5 剤に耐性、2 株が 5 クラス 6 剤に耐性、1 株が 5 クラス 7 剤に耐性、そして 1 株が 6 クラス 7 剤に耐性の多剤耐性菌であった。

まとめ

今回タイで初めて *E. albertii* を分離した。多剤耐性の *E. albertii* は非常に珍しく、3 クラス 3 剤に耐性ではあるが 2 株とも多剤耐性の *E. albertii* であった。タイやケニアにおいても予想以上に tEPEC でなく aEPEC が分布し、下痢症の原因菌として関わっている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 A. Hinenoya, N. Yasuda, N. Mukaizawa, S. Sheikh, Y. Niwa, S. P. Awasthi, M. Asakura, T. Tsukamoto, A. Nagita, M. John Albert, and S. Yamasaki	4. 巻 307
2. 論文標題 Association of cytolethal distending toxin-II gene-positive <i>Escherichia coli</i> with <i>Escherichia albertii</i> , an emerging enteropathogen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Med. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 564-571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijmm.2017.08.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 J. Hassan, S.P. Awasthi, N. Hatanaka, K. Okuno, P.H. Hoang, A. Nagita, A. Hinenoya and S. Yamasaki	4. 巻 76
2. 論文標題 Development of a multiplex PCR for the simultaneous detection of eae, stx and cdt genes in genus <i>Escherichia</i> and detection of a novel cdtB gene in <i>Providencia rustigianii</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathog. Dis.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femspd/ftz002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Hinenoya, H. Ichimura, S.P. Awasthi, N. Yasuda, J. Yatsuyanagi and S. Yamasaki	4. 巻 309
2. 論文標題 Phenotypic and molecular characterization of <i>Escherichia albertii</i> : Further surrogates to avoid potential laboratory misidentification.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Med. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 108-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijmm.2018.12.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hinenoya, H. Ichimura, N. Yasuda, S. Harada, K. Yamada, M. Suzuki, Y. Iijima, N. Hatanaka, S.P. Awasthi, and S. Yamasaki	4. 巻 95
2. 論文標題 Development of a specific cytolethal distending toxin (cdt) gene (Eacdt)-based PCR for the detection and identification of <i>Escherichia albertii</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diagn. Microbiol. Infect. Dis.	6. 最初と最後の頁 119-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Hinenoya, K. Nagano, K. Okuno, A. Nagita, N. Hatanaka, S. P. Awasthi and S. Yamasaki	4. 巻 97
2. 論文標題 Development of XRM-MacConkey agar selective medium for the isolation of Escherichia albertii.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagn. Microbiol. Infect. Dis.	6. 最初と最後の頁 115006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀧本誠太、Srinuan Somroop、畑中律敏、Sharda Prasad Awasth、日根野谷 淳、山崎伸二
2. 発表標題 タイ王国の市販食品におけるeae遺伝子陽性細菌の汚染状況.
3. 学会等名 第72回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	日根野谷 淳 (Hinenoya Atsushi) (20548490)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403)	
研究 分担者	飯島 義雄 (Iijima Yoshio) (60144739)	神戸市環境保健研究所・その他部局等・所長 (84505)	
連携 研究者	中西 典子 (Nakanishi Noriko) (50615490)	神戸市環境保健研究所・その他部局等・研究員 (84505)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	アワスティ シャルダ (Awasthi Sharda) (30751888)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教 (24403)	