

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591282

研究課題名(和文) 新興病原菌としての腸管凝集性大腸菌の分子疫学研究とイムノクロマト迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Molecular-epidemiological study of an emerging pathogen enteroaggregative *Escherichia coli* and development of rapid diagnosis using immunochromatography.

研究代表者

西 順一郎 (NISHI JUNICHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40295241

研究成果の概要(和文)：転写調節因子 AggR を保有する腸管凝集性大腸菌 Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) の検出頻度は、下痢症患者由来大腸菌 2,417 株中 76 株 (3.1%) であった。菌体表層抗原 Aap の検出頻度は EAEC では 81.6% と高く、アミノ酸配列はよく保存されていた。イムノクロマト法による EAEC 検出に利用するために、Aap のリコンビナント蛋白を用いて抗 Aap 抗体を作成し、EAEC への反応性を確認できた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the incidence of typical enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) among *E. coli* strains isolated from diarrheal children was 3.1% (76/2,417). The incidence of surface-layer protein Aap was 81.6% among typical EAEC strains, and its amino-acid sequences were well conserved. We successfully prepared anti-Aap antibodies using recombinant Aap protein, which can be applied for a rapid immunochromatographic detection system of EAEC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児、下痢症、下痢原性大腸菌、腸管凝集性大腸菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児の感染性胃腸炎はウイルス性と細菌性に分類されるが、臨床現場での判別は容易ではない。下痢症は、下気道感染症、HIV/AIDS について世界の死亡原因の第3位を占める。また発展途上国の下痢症の約10%

は持続性で成長障害の原因となっており、腸管病原体の診断は公衆衛生上の大きな課題である。一方先進国では、多くのウイルス性下痢症にも抗菌薬が投与され、常在菌叢の破壊や耐性菌誘導の面から問題であり、正確な腸管病原体の迅速診断が求められている。

(2) 細菌性腸炎の原因は、サルモネラ、カン

ピロバクター、腸管出血性大腸菌が多いが、欧米における最近のプロスペクティブなケース・コントロール研究では、腸管凝集性大腸菌 enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) が注目されており、発展途上国だけでなく海外先進諸国でも新興腸管病原菌として注目されている。

(3) EAEC は、HEp-2 細胞付着試験で特有の凝集付着を示す大腸菌と定義されている。転写調節因子 AggR、特有の凝集性線毛 AAF、外膜表層蛋白 Aap などの病原因子が知られているが、わが国での分離株における保有頻度は明らかでない。EAEC は、転写調節因子 AggR とその関連遺伝子群を持つ typical EAEC、持たない atypical EAEC に区別されている。

(4) 本邦においても下痢症患者から実際は多数分離されているが、その病原菌としての意義はまだ十分周知されていない。その原因のひとつは、本菌が常在菌である大腸菌と区別が難しく、一般の臨床検査室では検出できず、同定が実験室レベルに留まっていることによる。従って、EAEC の簡便で迅速な検出法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を目的とした。

(1) 鹿児島県で分離される小児下痢症患者由来大腸菌における EAEC の検出頻度を明らかにする。

(2) 分離された EAEC について病原因子の分子疫学解析を行う。

(3) EAEC の外膜表層蛋白 Aap を標的としたイムノクロマト法による迅速診断法を開発するための基礎的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) EAEC の検出頻度の検討

小児下痢症患者の便より検出された大腸菌を対象に、定量的バイオフィルムアッセイを用いて EAEC をスクリーニングし、最終的には HEp-2 細胞付着試験で凝集性付着を示した株を EAEC と判定した。

(2) 病原因子の分子疫学解析

① 以下の病原因子 (病原遺伝子) の PCR 法による検討。

転写因子: AggR (aggR); 線毛: AAF-I (aggA), AAF-II (aafA), AAF-III (agg3A), 毒素: Pet (pet), EAST-1 (astA), ShET-1 (set1A), バイオフィルム関連因子: Aap (aap), AatA (aatA), shf (shf)

② パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) による遺伝子型別

③ マイクロタイタープレート法による定量的バイオフィルム形成能の検討

④ 薬剤感受性検査 (ディスク法、微量液体法)、酸耐性検査 (塩酸、酢酸、乳酸)

⑤ 0 血清型別

デンカ生研の「病原性大腸菌免疫血清」を用いたスライド凝集法で判定

(3) 迅速診断法のための基礎的検討

① EAEC の外膜表層蛋白 Aap のリコンビナント蛋白の作成と特異的抗体の作成・精製

EAEC 042 株の Aap 遺伝子を PCR で増幅し発現ベクター pCR T7/NT-TOPO へ導入。大腸菌 BL21-DE3 で His 標識リコンビナント蛋白を発現、Ni カラムでリコンビナント Aap (rAap) を精製。精製 rAap でウサギを免疫し、抗血清を得た。rAap を吸着させた CNBr カラムによりウサギ抗血清から抗 Aap 抗体を精製した。

② 精製した抗体の rAap への免疫反応性の検討

ウェスタンブロッティングで定性的に検定し、最も反応性の高い抗体を以後抗 Aap 抗体として使用した。2 次抗体は HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

③ 他の大腸菌における Aap の検出頻度の検討

Aap の特異性を検討するため、EAEC 以外の菌を PCR 法により検討した。当科に保存された下痢病原性大腸菌 (DEC) の病原遺伝子 (eae, bfp, lt, st, virF, ipaH, stx1, stx2, aggR) を保有しない non-DEC 1947 株を対象とした。Aap 遺伝子 aap は PCR で検出し、シークエンス後にアミノ酸配列を推定した。Aap 分泌能は、培養上清中の Aap を Western blot で検討した。

4. 研究成果

(1) 鹿児島県で分離される小児下痢症患者由来大腸菌における EAEC の検出頻度

EAEC は、2,417 株中 102 株 (4.2%) に検出された。転写調節因子 AggR を保有する typical EAEC は 76 株 (3.1%)、atypical EAEC は 26 株 (1.1%) であった。この頻度は、わが国でよく分離される腸管病原性大腸菌 (EPEC) とほぼ同等、また腸管出血性大腸菌などその他の下痢病原性大腸菌に比べて高い頻度であった。EAEC がこれまでの海外での報告と同様、わが国でも小児下痢症に関与していることが示唆された。しかし、下痢症に有意に関連しているかどうかについては、今後のケース・コントロール研究を待つ必要がある。

(2) 分離された EAEC の病原因子の分子疫学解析

typical EAEC の病原遺伝子検出頻度は atypical 群に比べて高かったが、既知の付着線毛遺伝子が検出されたのは 16 株 (23%) のみであった。PFGE による遺伝子型はいずれの群も多様性が著明であった (図 1)。典型的な凝集付着様式を示す株が typical EAEC で 54

株 (74.2%) を占め、atypical 群では非典型的なものが多かった (図 2)。バイオフィーム形成能は両群で有意差はみられなかったが (図 3)、塩酸と乳酸に対する酸耐性度は typical EAEC が有意に高かった (図 4)。

以上の結果から、typical EAEC が atypical EAEC に比べて強い病原性を持つことが示されたが、過去に報告された付着線毛遺伝子を保有しない株も多く、未知の病原因子の存在が推測された。また遺伝子型、表現型ともに EAEC には多様性が顕著であった。

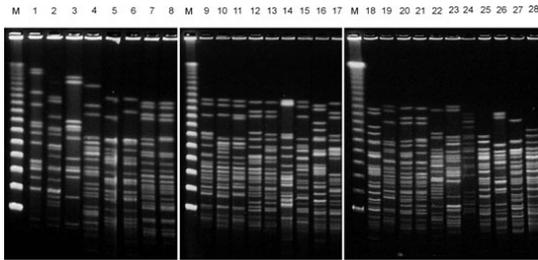
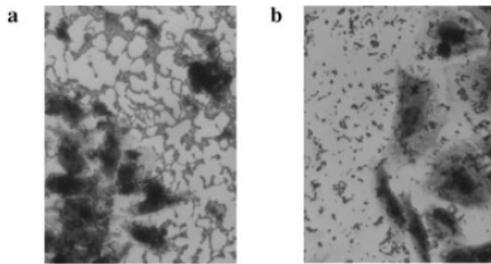


図 1 パルスフィールド電気泳動法 (PFGE)。遺伝子多様性が著明である。



EAEC		A	B
Typical	n=76	55 (72.4%)	21 (27.6%)
Atypical	n=26	6 (23.1%)	20 (76.9%)

図 2 HEp-2 細胞付着試験で凝集性付着 (a タイプが典型例)

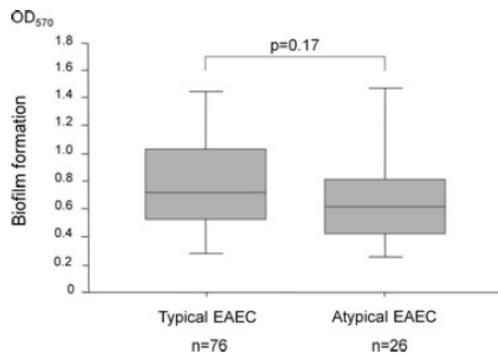


図 3 バイオフィーム形成能の比較

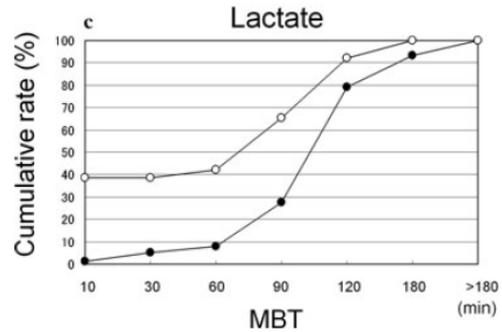


図 4 乳酸に対する耐性度の比較 (● typical EAEC, ○ atypical EAEC)

(3) EAEC の外膜表層蛋白 Aap を標的とした迅速診断法開発へ向けた基礎的検討

① EAEC の外膜表層蛋白 Aap のリコンビナント蛋白の作成と特異的抗体の作成・精製

EAEC プロタイプ 042 株の DNA から His 標識した Aap 遺伝子を増幅、発現プラスミドに組み込み大腸菌内で Aap 蛋白を発現させた。抗 His 抗体を付着させたカラムを作成し、リコンビナント Aap 蛋白を精製した。リコンビナント Aap 蛋白を抗原としてウサギを免疫、回収した血清から Aap 付着カラムを用いて抗 Aap 抗体を精製した。

② 精製した数種類の抗体のリコンビナント Aap への免疫反応性の検討

042 株の培養上清中にみられる Aap を標的として、ウェスタンブロッティングで作成した抗 Aap 抗体の反応性を検討し、特異的に結合したバンドが観察された。

③ 他の大腸菌における Aap の検出頻度の検討

Aap は、typical EAEC の 81.6% (62/76) と non-DEC の 0.36% (7/1947) に認められ、その他の下痢原性大腸菌株からは検出されなかった。Aap のアミノ酸配列は各株でよく保存されており、042 の Aap に対する相同性は、EAEC 25 株で 94.8-99.1、non-DEC 7 株で 85.3-95.7 であった。Aap の推定アミノ酸配列に基づく系統樹解析では、0 抗原型との相関がみられた (図 5)。Aap 陽性の non-DEC 7 株中 6 株で Aap の分泌が確認されたが、分泌量は EAEC 臨床分離株に比較して少なかった。

本邦においても、EAEC 以外に Aap を保有する大腸菌が少数ではあるが存在することが明らかになった。しかし、non-DEC における Aap の検出頻度は 0.36% と低く、免疫クロマト法など蛋白レベルの EAEC 検出法に抗 Aap 抗体を利用できると考えられた。

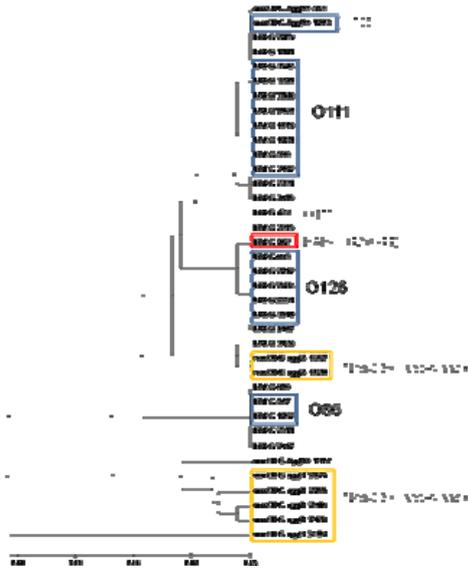


図5 Aapの系統樹解析(アミノ酸配列)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Miyahara E, Nishie M, Takumi S, Miyahara H, Nishi J, Yoshiie K, Oda H, Takeuchi M, Komatsu M, Aoyama K, Horiuchi M, Takeuchi T. Environmental mutagens may be implicated in the emergence of drug-resistant microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 査読有, 2011;317(2):109-116
- ② Tokuda K, Nishi J, Imuta N, Fujiyama R, Kamenosono A, Manago K, Yoshifumi K. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. *Microb Immunol*, 査読有, 2010: 54(6):320-329
- ③ Ueno K, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Kawano Y. Presence of multiple copies of capsulation loci in invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) strains in Japan before introduction of the Hib conjugate vaccine. *Microb Immunol*, 査読有, 2010;54(3):160-163
- ④ Shigemi A, Matsumoto K, Yaji K, Shimodozono Y, Takeda Y, Miyahara H, Kawamura H, Orita M, Tokuda K, Nishi J, Yamada K. Correlation between meropenem and doripenem use density and the incidence of carbapenem-resistant *Pseudomonas*

aeruginosa. *Int J Antimicrob Agents*, 査読有, 2009;34(6):589-91

- ⑤ Eguchi T, Nomura Y, Hashiguchi T, Masuda K, Arata M, Hazaki D, Ueno K, Nishi J, Kawano Y, Maruyama I. An elevated value of high mobility group box 1 is a potential marker for poor response to high-dose of intravenous immunoglobulin treatment in patients with Kawasaki syndrome. *Pediatr Infect Dis J*, 査読有, 2009;28(4):339-341,
- ⑥ Yamasaki Y, Nishi J, Nishikawa T, Tatsumoto C, Kasano F, Sano N, Kawano Y, Kawakami K. Descending necrotizing mediastinitis secondary to retropharyngeal abscess in a child. *J Infect Chemother*, 査読有, 2008;14(3):255-7
- ⑦ Fujiyama R, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Manago K, Kawano Y. The shf gene of a *Shigella flexneri* homolog on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. *Current Microb*, 査読有, 2008;56(5):474-80
- ⑧ Imamura M, Nishi J, Tamada I, Tenokuchi Y, Toyoshima M, Kawano Y. Proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid from patients with nontyphoidal *Salmonella* encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J*, 査読有, 2008;27(6):558-9

[学会発表] (計7件)

- ① 藺牟田直子, 西 順一郎. 小児下痢症患者から分離された大腸菌における cytolethal distending toxin (CDT) 遺伝子保有状況. 第7回日本小児消化管感染症研究会 大阪 2011. 2. 12
- ② 徳田浩一, 西 順一郎, 藺牟田直子, 河野 嘉文. 腸管出血性大腸菌感染症の報告促進における課題—医師側要因に関する KAP 調査— 第42回日本小児感染症学会総会・学術集会 仙台 2010. 11. 27
- ③ 藺牟田直子, 徳田浩一, 西 順一郎. 鹿児島県で分離された腸管凝集性大腸菌の病原遺伝子の系統解析 第80回日本感染症学会西日本地方会学術集会 松山 2010. 11. 19
- ④ 西 順一郎, 藺牟田直子, 徳田浩一, 河野嘉文. 小児下痢症由来大腸菌における腸管凝集性大腸菌 dispersin(Aap) の分布. 第14回腸管出血性大腸菌感染症研究会 宮崎 2010. 7. 22-23

- ⑤ 西 順一郎 小児市中感染症－呼吸器感染症・髄膜炎・腸管感染症－ 第19回南九州臨床微生物研究会 人吉 2009. 10. 25
- ⑥ 西 順一郎 シンポジウム「小児消化器感染症の合併症」サルモネラ感染症の合併症 第35回日本小児栄養消化器肝臓学会 東京 2008. 10. 12
- ⑦ 西 順一郎 ランチョンセミナー「微生物検査、臨床は何を求めているか？」医師が求める微生物検査」第43回九州医学検査学会 鹿児島 2008. 10. 11

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ped/>
(鹿児島大学小児科 HP 研究グループ 感染症)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 順一郎 (NISHI JUNICHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40295241

(2) 研究分担者

野村 裕一 (NOMURA YUICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：90237884