

E. coli Attaching and Effacing Gene (eae) と Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Adherence Factor (EAF) の PCR による同時検出

八柳 潤 齊藤志保子 佐野 健 森田 盛大

eae と EAF を同時に検出することが可能な PCR 法を開発した。散発下痢患者、下水などの環境、家畜から分離した大腸菌 31 株について本法により eae と EAF の保有状況を調査したところ、7 株が eae を保有する AEEC と同定され、うち 1 株が EAF を保有していた。さらに、医療機関の細菌検査室において、原因細菌不明と判定された散発下痢患者の直腸スワブ 50 検体を対象にして AEEC の検索を実施したところ、2 検体から AEEC が検出された（検出率 4 %）。今後、原因細菌不明の食中毒事例において AEEC の関与があるかどうか検討するなど、秋田県内における AEEC 感染症の実態をさらに調査する必要があるものと考えられた。

キーワード : Attaching and Effacing Escherichia coli, E. coli Attaching and Effacing Gene (eae), E. coli Enteroadherence Factor (EAF), PCR

I はじめに

ヒトに下痢を惹起する病原性大腸菌のうち、毒素原性大腸菌 (ETEC)、組織侵入性大腸菌 (EIEC) に関しては病原因子がほとんど明らかにされており、腸管出血性大腸菌 (EHEC) についてもベロ毒素と呼ばれる菌体外毒素を産生することが病原因子の一つとなっていると考えられている。国立予防衛生研究所、細菌部の伊藤たちは、これら 3 種類の病原性大腸菌の同定を容易かつ確実にする目的で、それらの菌が保有する病原因子をコードする遺伝子をターゲットとし、しかも混合プライマー法によりこれらの病原性大腸菌を同時に同定することが可能な PCR 法を確立し、普及させた¹⁾。この混合プライマー-PCR 法により ETEC、EIEC、EHEC の同定は極めて手軽に実施可能となったことから、これらの病原性大腸菌感染症の実態は今後急速に明らかにされていくものと考えられる。一方、病原血清型大腸菌 (EPEC) については、病原因子が最近まで明らかでなかったが、Moon たち²⁾ により EPEC がヒトおよび動物の感染モデルにおいて Attaching and Effacing lesion (A/E) と呼ばれる特徴的な組織障害を腸管に惹起することが報告され、このことが EPEC の病原性と深くかかわっているものと考えられた。なお、A/E を惹起する大腸菌は Attaching Effacing E. coli (AEEC) と呼ばれている。Knutton たち³⁾ は Fluorescence actin staining test (FAS) という、培養細胞を使用した A/E 形成能試験法を確立したが、比較的複雑な方法であり、手軽に実施できないという難点があった。

Jerse たち⁴⁾ は、Transposon Mutagenesis の手法

を使用して EPEC の A/E 形成に関与する遺伝子をクローニング、塩基配列を決定して E. coli Attaching and Effacing gene (eae) と名付けた。さらに、Donnenberg たち⁵⁾ は Positive-selection Suicide Vector を使用して、Deletion Mutant を作成する手法により、eae が A/E の形成に関与していることを確認した。

以上のように、eae が EPEC の病原性に深く関与している可能性が報告され、その塩基配列が明らかになったことから、我々は eae を検出する PCR 法を試みた。また、従来から EPEC が培養細胞に付着する際に必要であるとされていたプラスミド性遺伝子⁶⁾ (EPEC Adherence Factor : EAF) を検出する PCR 法も試み、eae と EAF を混合プライマー-PCR 法により同時に検出することに成功したので、その概要について報告する。また、県内の定点病院で原因細菌不明とされた散発下痢症患者の直腸スワブを対象として AEEC の検出を試みた成績について併せて報告する。

II 方法

1. 菌株 : AEEC の標準株には、米国マリーランド大学、Center for Vaccine Development の James B. Kaper 博士から分与された EPEC Strain E2348/69 (O127 : H6) を使用した。EAF の陽性対照には E2348/69 に加えて、同博士から分与された EAF プローブがクローニングされたプラスミド、pJPN16 で形質転換された E. coli HB101 (HB101/pJPN16) を使用した。また、当所において保存されていた散発下痢症患者、下水などの環境、家畜から分離された各種の血清型

の大腸菌株（表1）計31株を eae 保有状況調査に供した。

2. 混合プライマーPCRによる eae/EAF の同時検出

(1) eae 検出用プライマー：EPEC の eae の塩基配列⁴⁾、および EHEC の eae の塩基配列⁷⁾を比較したところ、オープンリーディングフレーム内で両者の塩基配列の一致率は5'末端から2000bpの領域においては98.5%であったのに対して、それ以降3'末端までの823bpの領域においては38.3%であったことから、5'末端から2Kbpの領域が eae の conserved lesion であるものと考えられた。

従って、eae 検出用プライマーは eae の5'末端近傍の454bpの断片が増幅されるように設計した (EA-1, EA-2)。

(2) EAF 検出用プライマー：Jerse たちが報告した EAF 検出用合成オリゴヌクレオチドプローブである EAF21、および EAF25 の塩基配列⁹⁾に従い、それぞれ20bのプライマーを設計した (EAF-B, EAF-SR)。本プライマーペアにより、HB101/pJPN16 をテンプレートとした際、Nataro たちが報告した EAF プローブ⁶⁾に該当する約1Kbpの増幅断片が得られた。

(3) 混合プライマー PCR法：PCRは既報の方法⁹⁾に準じて実施した。EA-1, EA-2, EAF-B, EAF-SR の各プライマーは1.0μMの濃度で使用し、温度サイクルは Denature : 94°C 30sec., Annealing : 56°C 60sec., Extension :

72°C 60sec. として、25サイクル反応を実施した。

3. 直腸スワブからのAEECの検出：既報のEC-PCR法¹⁰⁾に準じて実施したが、直腸スワブを接種した後のEC培地の培養温度は37°Cとした。

III 結果および考察

1. eae およびEAFの検出

図1に示すように、E2348/69株をテンプレートとした場合、EA-1, EA-2のプライマーペアでは454bpの増幅断片が(レーン2)、またEAF-B, EAF-SRのプライマーペアでは約1Kbpの増幅断片が(レーン1)それぞれ得られた。さらに、これら2組のプライマーペアを混合した系においては454bp, および約1Kbpの増幅断片が同時に得られた(レーン3)。また、HB101/pJPN16株をテンプレートにした場合には、EAF-B, EAF-SRのプライマーペアを使用した系、および混合プライマー系で約1Kbpの増幅断片が認められた。以上の結果から、混合プライマーPCR法により eae と EAF が同時に検出可能であることが示された。なお、データは示さないが、本PCR法により、秋田県内で発生したヒトの散発事例から分離されたEHECにおいても eae が検出されたが、それらのうちいずれから EAF は検出されなかった。

2. 分離大腸菌株の eae, EAF 保有状況

表1に示す大腸菌31株のうち、eaeを保有していたのはEC-18, EC-34, EC-39, EC-41, EC-43, EC-49, EC-51の7株であり、EAFを保有していたのはEC-34のみであった。これら7株の eae を保

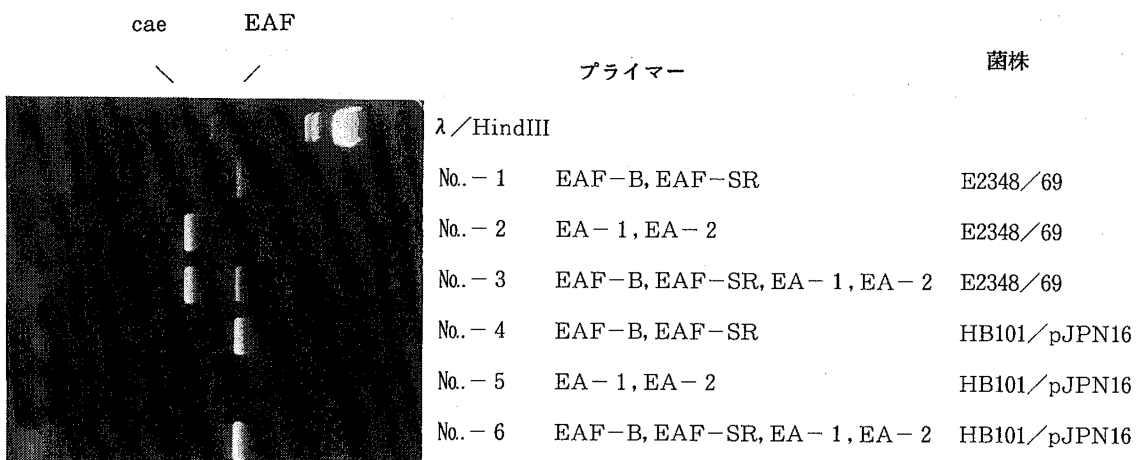


図1 PCRによるeaeとEAFの検出

表 1 供試菌株とeae, およびEAFの保有状況

菌株番号	血清型	由来	eae	EAF	菌株番号	血清型	由来	eae	EAF
EC-8	O28 : H21	環境	-	-	EC-33	O136 : H51	散発下痢	-	-
EC-10	O28 : H42	環境	-	-	EC-34	O153 : H21	散発下痢	+	+
EC-13	O159 : NM	散発下痢	-	-	EC-39	O128 : H2	散発下痢	+	-
EC-14	O111 : H21	散発下痢	-	-	EC-41	O153 : H21	散発下痢	+	-
EC-15	O115 : NM	散発下痢	-	-	EC-42	O28 : HUT	散発下痢	-	-
EC-17	O1 : NM	散発下痢	-	-	EC-43	O128 : H2	散発下痢	+	-
EC-18	O20 : HUT	散発下痢	+	-	EC-44	O126 : H27	散発下痢	-	-
EC-19	O18 : H42	散発下痢	-	-	EC-45	O126 : H21	散発下痢	-	-
EC-23	O168 : HUT	散発下痢	-	-	EC-47	O16 : HUT	散発下痢	-	-
EC-25	O18 : NM	散発下痢	-	-	EC-48	O148 : HUT	散発下痢	-	-
EC-26	O143 : HUT	散発下痢	-	-	EC-49	O26 : H11	家畜	+	-
EC-27	O20 : H11	散発下痢	-	-	EC-51	O128 : H2	散発下痢	+	-
EC-28	O20 : H11	散発下痢	-	-	EC-53	O111 : H21	散発下痢	-	-
EC-29	O18 : H5	散発下痢	-	-	EC-54	O18 : NM	散発下痢	-	-
EC-30	O111 : H11	散発下痢	-	-	EC-55	O128 : H12	散発下痢	-	-
EC-31	O126 : H12	散発下痢	-	-					

有していたAEECの血清型の内訳は、O128 : H2が3株、O153 : H21が2株、O20 : HUT、O26 : H11がそれぞれ1株であった。なお、従来EPECの血清型に属するとされていたO111 : H11、O111 : H21、O18 : NMなどはeaeを保有していなかった。

3. 散発下痢症患者直腸スワブからのAEECの検出

感染症サーベイランス事業において定めた定点病院において散発下痢症患者から採取した直腸スワブのうち、病院の臨床検査室で細菌検査を実施し、最終的に原因細菌不明と判定されたものを50検体分与を受け、AEECの検索を試みたところ、2検体からAEECが検出された(検出率4%)。なお、患者の年齢、性別、症状等に関する情報は入手しなかった。分離したAEECのうち、1株は血清型OUT : H21であり、市販の血清型別キットではO型別が不能であった。また、もう1株はO、Hともに市販のキットでは型別不能であった。

以上のように混合プライマーPCR法によりeae、EAFを検出することが可能となった。我々が選択したターゲットはeaeのうちConserved lesionに該当すると考えられるため、AEEC株間での塩基配列の相同性は高く、従ってeaeの検出率は高いものと推測される。しかしながら、我々のPCR法で得られた結果と表現形質との比較検討は実施していないため、今後PCRの結果とFASの結果を比較検討し、eaeの検出率を確認する必要があるものと考えられた。

Knutton たちは¹¹⁾ EPEC血清型に属する大腸菌のうち、FASが陽性となるのは一部の菌株であり、A/

E形成能を保有するのはそのFAS陽性の株であること、また、EAFを保有するものはFAS陽性株のごく一部であることを報告している。我々が分離株について検討した成績においても、eae陽性菌株7株のうちEAFを保有していたのはEC-34株1株のみであった。これらのことから、AEECの同定に際してはEAFではなく、eaeを検出するか、もしくはその表現形質であるFASを指標とするのが適切であると考えられた。

今回、我々が分離株で検討した成績では、従来EPECであるとされてきた血清型であるO111 : H11、H21、O18 : NMなどに属する株はeaeを保有していなかった。今回、データは示していないが、我々が検討した範囲ではこれらの株にEnterotoxigenic E. coli Heat-stable Enterotoxinを産生するものがあることが認められた。このことは、従来、血清型からEPECとされてきた1群の中に病原因子の異なる菌種が混在していることを示すものであると考えられた。さらに、EPECとされている菌群の中に、未発見の病原因子を保有する菌種が存在している可能性も否定できないなど、EPECの病原機構を理解するためには今後さらに研究が必要であると考えられた。

今回、我々は秋田県内の散発下痢症患者からAEECが分離されたことを初めて明らかにし、その分離率は4%であった。一方、我々が実施した平成2年度、および3年度の感染症サーベイランス病原検出の成績を総合すると急性胃腸炎、大腸炎、下痢症からの病原細菌分離率は約7%であった。これらのことから、下痢症などの原

因菌としてAEECが重要な位置を占めているものと推察され、さらに、病因物質不明の食中毒においてもAEECが関与する可能性が考えられるなど、今後、秋田県におけるAEEC感染症の実態についてさらに検討する必要があるものと考えられた。

IV 文 献

- 1) 伊藤健一郎, 他. 腸管出血性大腸菌迅速検査法技術研修マニュアル, 1991, 国立予防衛生研究所細菌部
- 2) H.W. Moon et al. Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and Rabbit Intestines, *Infect. Immun.*, 1983 ; 41 : 1349-1351.
- 3) S. Knutton et al. Actin Accumulation at Sites of bacterial Adhesion to tissue Culture cells: basis of a New Diagnostic Test for Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, 1989 ; 57 : 1290-1298.
- 4) A.E. Jerse et al. A Genetic Locus of Enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the Production of Attaching and Effacing lesions on Tissue culture cells, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1990 ; 87 : 7839-7843.
- 5) M.S. Donnenberg and J.B. Kaper, Construction of an eae Deletion Mutant of Enteropathogenic *Escherichia coli* by Using a Positive-Selection Suicide Vector, *Infect. Immun.*, 1991 ; 59 : 4310-4317.
- 6) J.P. Nataro et. al., Detection of an Adherence Factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA Probe, *J. Infect. Dis.*, 1985 ; 152 : 560-565.
- 7) J. Yu and J.B. Kaper. Cloning and Characterization of the eae gene of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7, *Mol. Microbiol.*, 1992 ; 6 : 411-417.
- 8) A.E. Jerse et al. Oligonucleotide Probe for Detection of the Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adherence Factor of Localized Adherent EPEC, *J. Clin. Microbiol.*, 1990 ; 28 : 2842-2844.
- 9) 八柳 潤, 他. 平成3年に秋田県で分離された腸管出血性大腸菌について. 秋田県衛生科学研究所報, 1992 ; 36 : 43-47.
- 10) 八柳 潤, 他. 秋田市内で市販されていた輸入牛肉からの腸管出血性大腸菌の分離. 秋田県衛生科学研究所報, 1993 ; 37 : 39-44.
- 11) S. Knutton et al. Screening for Enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with Diarrhea by the Fluorescent-actin Staining Test, *Infect. Immun.*, 1991 ; 59 : 365-371.