

氏名(本籍)	伊藤嘉浩(愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第1220号
学位授与日付	平成11年10月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Study of the characterization of rare isolates classified into diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> 1) Laboratory investigation of enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> O untypeable : H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness 2) The characterization of shiga toxin-non-producing <i>Escherichia coli</i> serotype O157 : H7 isolated from carcasses of cattle at a slaughter house
審査委員	(主査) 教授 江崎孝行 (副査) 教授 高橋優三 教授 渡邊邦友

論文内容の要旨

平成5年度岐阜県下の1集団食中毒事例から下痢原性大腸菌の新しいカテゴリーとされる腸管凝集粘着性大腸菌(EAggEC)が分離された。現在、開発途上で乳幼児の腸管凝集粘着性大腸菌による水様性下痢症は多発しているものの、本邦ではEAggECによって集団食中毒が起こることは報告されておらず、その人体への病原性についても完全に解明されていない。一方、平成8年度岐阜県下のとちく場にて牛枝肉より、腸管出血性大腸菌に属する志賀毒素(Stx)非産生性大腸菌O157:H7株が分離された。現在まで、牛枝肉からこのタイプのO157:H7が分離されたという報告は極めて少ない。そこで、申請者伊藤嘉浩は希少分離例である下痢原性大腸菌に属する上記2カテゴリーの株の性状と病原因子を解析した。EAggEC株については、EAggEC耐熱性エンテロトキシン(EAST-1)産生遺伝子である*astA*の保有を確認した。Stx非産生性大腸菌O157:H7株については、Stx産生性大腸菌(STEC)O157:H7株と殆ど一般的性状に変化は認められず、Stx産生遺伝子領域に変異が生じたものである可能性が示唆された。しかしこの株は腸管付着能を有し、狭義の病原性大腸菌に見られる*eaeA*遺伝子を保有していたことから病原性を保持していると予測された。

使用菌株

EAggECについては、平成5年度、岐阜県下の小中学校で2,697人の食中毒患者の内、高度の下痢症状を呈する12名の患者便より共通して分離された血清型OUT:H10, 27株を使用した。Stx非産生性大腸菌O157:H7については、平成8年度、岐阜県下のとちく場2頭の牛枝肉より分離された4株について使用した。

方法

EAggEC株及びStx非産生性大腸菌O157:H7株について以下の方法で性状を解析した。

- 1) 血清型別及び生化学的性状試験：血清型別及び各種生化学培地について定法に基づいて実施した。
- 2) 薬剤感受性試験：日本化学療法学会のMIC(最小発育阻止濃度)測定法に従って実施した。
- 3) Plasmid profile：Kado&Liuの変法に準じて実施した。
- 4) PCR：EAggEC株は、*stx1*, *stx2*, *ST*, *LT*, *invE*, *astA*遺伝子について各自PCRを実施した。Stx非産生性大腸菌O157:H7株は*stx1*, *stx2*, *bfpA*, *hlyA*, *eaeA*遺伝子について各自PCRを実施した。
- 5) 毒素産生性試験：EAggEC株はStx1, Stx2, LTについて逆受身ラテックス凝集反応(RPLA)、さらにSTについて酵素免疫反応(EIA)を実施した。Stx非産生性大腸菌O157:H7株はStx1, Stx2についてRPLAを、Stx

全般についてはベロ細胞接種試験を実施した。

6) HEp-2細胞付着試験：Vialらの方法に準じて実施した。

7) Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) 及びパルスフィールド電気泳動 (PFGE) : Stx非産生性大腸菌O157:H7株は、平成8年度岐阜県下の食中毒事例で分離株された3株のSTECO157:H7株との遺伝子型の比較をRAPD-PCR及びXbaI及びBlnI制限酵素切断によるPFGEを実施した。

結果及び考察

上記の実験結果からEAggEC株については以下のことが明らかとなった。

1) 全株、血清型OUT (O型別不能) : H10であり (後に国立感染研よりO5:H10の判定を受ける)、定型的な大腸菌の生化学的性状を示した。またMICについて全株同じ傾向を示した。

2) 全株60MDaのプラスミドを保有し、EAST-1産生を支配する*astA*遺伝子を保有していた。

3) 全株HEp-2細胞にEAggECに特徴的な凝集粘着様の付着形態を示した。

以下の結果からこの食中毒事例の患者便から分離された27株がEAggECに特有な2)と3)の結果を有している点からEAggECと確認された。本邦ではこの血清型のEAggECによる集団食中毒事例の報告はなく、今後の検査体制に課題を提供した。

次にStx非産生性大腸菌O157:H7株については以下のことが明らかとなった。

1) 全株、アルギニン脱水素酵素反応陽性以外は定型的なSTECO157:H7の生化学的性状を呈し、HEp-2細胞に局所付着の形態を示した。

2) 全株3.0及び60MDaのプラスミドを持ち、*eaeA*遺伝子及び*hlyA*遺伝子を保有していた。

3) XbaI及びBlnI制限酵素切断PFGEでは全株類似したパターンを示したが、ヒト食中毒由来株とは全く異なるパターンを示した。

以上の結果よりStx非産生性大腸菌O157:H7株はStx産生能を欠除している以外は、従来のSTECO157:H7株と同一の性状を示した。この株は局所付着能を保持しているため下痢を引き起こす可能性を持っており今後の重要な研究課題として着目された。

論文審査の結果の要旨

申請者伊藤嘉浩は集団食中毒事例を通じて、従来の分類に当てはまらない新しいタイプの大腸菌を分離してその解析を行った。腸管凝集粘着性大腸菌による多数の集団食中毒事例はこれまで報告が無かった事例であり、今後の行政対応が必要な疾患であることを認識させる最初の例となった。この報告は我が国だけでなく、広く欧米の研究者に腸管凝集粘着性大腸菌によって集団食中毒が起きることを警告した。一方、志賀様毒素非産生O157:H7大腸菌を牛から分離しその細菌学的特徴を解析した結果、局所付着性を保持していたことから、行政検査の対象になっていない毒素非産生株も重要な食中毒の病原体として軽視できないことを明らかにした。

以上の2種類の特異な大腸菌株の解析を行った本研究は病原細菌学の発展に重要な貢献をしたものと認める。

[主論文公表誌]

1) Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable : H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness

平成9年 J. Clin. Microbiol. 35 : 2546~2550

2) The characterization of shiga toxin-non-producing *Escherichia coli* serotype O157 : H7 isolated from carcasses of cattle at a slaughter house

平成11年 Microbiol. Immunol. 43 (7) : 699~703