

称号及び氏名	博士(獣医学) 呉 育羅
学位授与の日付	平成22年3月31日
論文名	健康牛および下痢症患者から分離した志賀毒素産生性大腸菌の細菌学的性状と薬剤感受性パターンの比較
論文審査委員	主査 山崎 伸二 副査 笹井 和美 副査 三宅 眞実

論文要旨

緒言

志賀毒素産生性大腸菌(STEC)は、ヒトに血性下痢と激しい腹痛を主症状とする出血性大腸炎の原因菌で、特に小児や老人においては溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症といった重篤な合併症を引き起こすため重要視されている。STECが産生する主要な病原因子は、志賀毒素(Stx1, Stx2)、EHECヘモリシンの他、Locus of enterocyte effacement(LEE)領域にコードされた腸管上皮細胞への定着や病原性に関わる因子(インチミンと呼ばれる*eae*遺伝子産物など)などが知られている。血清型O157を始めHUS患者から分離されるSTECは、通常LEE陽性でありStxとLEE領域がSTEC感染の重症化に重要であると考えられていた。しかし、1998年、オーストラリアで*eae*-negativeのSTECがHUS患者から分離され、インチミンは重症化に関わる必須な病原因子ではなくインチミン以外の定着因子の存在が考えられるようになった。その後、*E. coli* factor for adherence (Efa1)、IrgA homologue adhesin (Iha)、STEC autoagglutinating adhesin (Saa)、Long polar fimbriae (LpfA) O113、EHEC autotransporter (EhaA)などの新たな定着因子が、患者から分離されたSTECで見つかった。更に2003年、2004年にはそれぞれ細胞膨化致死毒素(CDT)、Subtilase cytotoxin (SubAB)が、STECの新たな毒素として報告された。いずれも重症化した患者から分離された菌株で報告されており、STECの病原性との関わりが注目されている。しかし、STEC臨床分離株がどの程度の割合でこれらの定着因子および毒素産生能を保有

しているのか、またこれらの産生性と血清型との関連性については十分に明らかとなっていない。

現在 STEC の血清型は 435 種以上が報告されているにも関わらず、患者から分離される血清型は、O26、O111 および O157 等、特定の血清型に偏る。一方、ヒトへの感染源として知られるウシが保有する STEC の血清型は、かなり多様である。これらウシから分離される STEC と患者から分離される STEC における定着因子や病原因子の分布は未だ充分明らかとなっていない。また、ヒトの医療分野における薬剤耐性菌の出現は大きな問題となっており、その原因の 1 つに家畜に治療や成長促進を目的として使用される抗菌薬が挙げられている。臨床現場においては STEC 感染・発症後 3 日以内に抗菌薬を使用することが推奨されており、ヒトおよび家畜から分離される STEC の薬剤感受性を把握しておくことは適切な抗菌薬を選択する上に置いて重要である。

本研究では健康牛および下痢症患者から分離した STEC の細菌学的性状および薬剤感受性パターンを比較解析した。

第 1 章 健康牛から分離した STEC の細菌学的性状解析

ウシにおける STEC の保菌率を減少させるためには、ウシに定着しやすい STEC があるのか、あるとすればどのような細菌学的特徴をもっているのか明らかにすることが必要である。第一章では、特定の臨床症状を呈さない牛（以下、健康牛）が保有する STEC の細菌学的性状を解析した。

同一の牛舎内にいる 61 頭のウシから約 2 週間毎に 1 年間、計 919 検体の直腸便から単離された 341 株の STEC から無作為に抽出した 171 株の細菌学的性状を解析した。この 171 株は、PFGE による解析で 32 のサブタイプを含む 13 クラスタに分類された。クラスタ名と菌株数は以下の通りである；A:30、B:5、C:24、D:17、E:43、F:24、G:12、H:7、I:4、J:2、K:1、L:1、M:1。このウシ由来の 171 株について、血清型、定着因子(*eae*、*efal*、*iha*、*saa*、*lpfO113*、*ehaA*)と毒素(*cdt*、*subAB*)遺伝子の分布、および Stx 産生量について解析した。その結果、各クラスタ内の STEC は全て同一の性状を示した。即ち、血清型別の結果、A(O130:H24)、B(O163:H19)、C(O17:H11)、D(O113:NM)、E(O22:H8)、F(O153:H25)、G(O40:HUT)、H(OUT:H16)、I(O156:NM)、J(O2:HUT)、K(Orough:NM)、L(O26:H11)および M(O111:NM)、定着因子の保有状況を解析した結果、クラスタ A、B、C、D、E、F、G は *saa*、*iha*、*lpfAO113* および *ehaA* の全ての遺伝子を保有しており、同じ定着因子プロファイルを示し、供試菌株の 90.7% を占めた。さらに、優勢な定着因子プロファイルを示したクラスタ (A、C~G) はクラスタ B を除いて全て 10 株以上単離され (以下、高頻度単離菌)、10 株以下しか分離されなかったその他のクラスタ (H~M) に属する低頻度単離菌は、高頻度単離菌とは異なる定着因子プロファイルを示した。*stx* 遺伝子以外の毒素遺伝子の保有状況を解析した結果、*cdt* 陽性株は計 84 株の 49.1% を占め、5 種類存在するバリエーションの中で全てが V 型であった。*subAB* 陽性株は計 112 株の 65.5% を占めた。STEC 13 株の Stx 産生量を ELISA 法で測定した結果、Stx1 および Stx2 の培養上清と菌体中の産生量の合計はそれぞれ、140 から 250 ng/mL (平均 190 ng/mL)、0 から 220 ng/mL (平均 100 ng/mL) であった。

以上の結果より、医学領域で問題となる O 群血清型の内 O26、O111 に属する STEC もウシから分離されたことから、ウシがヒトへの感染源となりうる可能性を改めて示した。また、ウシから高頻度に単離される STEC は全て *saa*、*iha*、*lpfAO113* および *ehaA* 遺伝子が陽性という定着因子プロファイルを示したことから、この定着因子プロファイルがウシの腸管に定着しやすい重要な因子の一つとなっている可能性が示された。一方、我が国のウシ由来 STEC が *cdt-V* や *subAB* 遺伝子を高率で保持していることも明らかとなった。

第 2 章 下痢症患者から分離した STEC の細菌学的性状解析および牛から分離した STEC との性状比較

ウシの STEC 保菌率を調べた結果、年間を通して 50% という高い陽性率を示したが、その中でヒトの臨床分離株で高頻度に見られる血清型は 171 株中 2 株 (O26:H11、O111:NM) であった。更に、ウシから高頻度に分離されたクラスター (A~G) の菌株とこれら血清型株の定着因子プロファイルは異なっており、後者は *stx* 遺伝子以外の毒素遺伝子も保有していなかった。よって、ウシに定着しやすい STEC とヒトに定着しやすい STEC とは異なる細菌学的性状を持つ可能性が示された。そこで、第 2 章では第 1 章と同様に患者由来 STEC の定着因子、毒素遺伝子の保有状況および Stx 産生量を解析した。

2004 年 7 月~2009 年 1 月の間に消化器症状を訴えて来院した患者の直腸スワブ 1,771 検体から、第 1 章と同法で STEC を単離、同定し、細菌学的性状を解析した。その結果、28 株の STEC が分離でき、血清型を調べた結果、O157:H7、O157:NM、O26:H11、O111:NM、O91:H21、Orough:H21 および OUT:NM がそれぞれ 20(71.4%)、1、3、1、1、1 および 1 株であった。さらに、1990 年代に分離され当教室において保管していた STEC 33 株を含む計 61 株について PFGE による解析を行った。その結果、互いに近縁な株も見られたが、遺伝学的には多様であった。定着因子の保有状況を解析した結果、61 株中 56 株 (91.8%) は血清型が異なるにもかかわらず *iae*、*iha*、*efal* および *eha* 遺伝子陽性という定着因子プロファイルを示した。さらに、毒素遺伝子の保有状況を解析した結果、*cdt-V* および *subAB* 遺伝子陽性の STEC は、それぞれ 2 株および 1 株だけであった。しかもこれらの陽性株は 1990 年代に分離された株でなく、2000 年代に分離された株であった。Stx 産生量を測定した結果、各 PFGE クラスター由来株の上清と菌体の合計 Stx1 および Stx2 の産生量はそれぞれ (130-320 ng/mL; 平均 190 ng/ml)、(46-480 ng/mL; 平均 230 ng/ml) であり、Stx1 の産生量はウシと患者由来株の間で差が認められなかったが、Stx2 産生量はウシ由来株より患者由来株の方が有意に多かった。

以上の結果より、ウシから高頻度に分離される STEC の多くが *cdt* および *subAB* 遺伝子を保有していたのに対し、我が国の下痢症患者から分離されるほとんどの STEC はこれらの毒素遺伝子を保有していなかった。公衆衛生上問題となる O 群血清型 O26、O111 および O157 を含む STEC が下痢症患者から分離されたが、ほとんど全ての株 (91.8%) が *iae*、*iha*、*efal* および *ehaA* 遺伝子が陽性という定着因子プロファイルを示したことから、この定着因子プロファイルがヒト腸管への感染に重要な因子の一つとなっている

可能性が考えられた。ヒトとウシでそれぞれ優勢に見られた定着因子プロファイルは異なっていたことから、それぞれの腸管への定着に有利に働く定着因子は異なる可能性が示された。

第3章 牛から分離した STEC と下痢症患者から分離した STEC の薬剤感受性パターンの比較

現在我が国においては STEC 感染症患者に対して、小児には Fosfomycin、成人にはニューキノロンが主な治療薬として使用されている。第1章および第2章ではウシおよびヒトにそれぞれ高頻度に存在する STEC の特徴が異なることを示してきた。第3章では、ヒト由来の STEC 分離株の薬剤感受性パターンを解析すると共に、ウシ由来株の薬剤感受性パターンも解析することで、治療や成長促進目的でウシに投与する抗菌薬と治療目的でヒトに投与する抗菌薬を使い分け、STEC 感染症患者に有用な薬剤を明らかにすることを目的とした。

作用機序の異なる抗菌薬の内、大腸菌に効果があり、ウシの下痢症および厚生労働省が推薦するヒトの STEC 感染症患者の治療薬を含む計 12 種の薬剤、即ち Ampicillin(ABPC)、Cefoxitin(CFX)、Imipenem(IPM)、Streptomycin(SM)、Gentamycin(GM)、Tetracycline(TC)、Chloramphenicol(CP)、Nalidixic acid (NA)、Ciprofloxacin (CPFX)、Enrofloxacin (ERFX)、Sulfamethoxazole-Trimethoprim (ST)、Fosfomycin (FOM)]を使用した。薬剤感受性試験は全て国際標準 CLSI に準じて行った。まず、ディスク拡散法により上記 12 種の薬剤感受性試験を行った。その結果、ウシおよびヒトから分離した STEC はいずれも 90%以上の株がこれらの薬剤に対して感受性であり、調べた全ての株が FOM および CPFX に感受性であった。ウシ由来の 171 株中 5 株(2.9%)、ヒト由来の 61 株中 8 株(13.1%)が用いた 12 種類のいずれかの薬剤に耐性を示した。また、O157:H7 ではヒト由来の 48 株中 4 株が SM、TC 耐性を示した。O111:NM ではヒト由来の 5 株中 3 株、ウシ由来の 1 株中 1 株が共に ABPC、SM、TC、ST に耐性を示した。また、検査した抗菌薬に耐性を示した株に対しては、耐性を示した薬剤に対する最小発育阻止濃度(MIC)を寒天平板希釈法により測定した。ABPC および SM のブレイクポイントは共に 32 µg/ml、ST のそれは 4/76 µg/ml であるが、ヒトおよびウシ由来株共に ABPC、SM(>256 µg/ml)、ST(>64/1216 µg/ml)に対する高度耐性菌が存在していた。

以上の結果より、ヒトおよびウシ由来の STEC 共に 90%以上の株が調べた薬剤に対して感受性を示した。また、ヒトおよびウシ由来の STEC 全ての株が FOM、CPFX に感受性であったことから、我が国に分布している STEC には厚生労働省が推薦する FOM および CPFX が有効であるが、STEC 感染症患者の治療薬としてのみ使用し、ウシに対しては、これら2つの薬剤やこれらの類縁体の成長促進目的での使用を禁止し、さらに、治療においても動物愛護・福祉などの特別な場合を除いては使用制限することが重要であると考えられる。しかしながら、少数ではあるがヒトおよびウシ由来株共に高度耐性菌が存在したことから、今後も STEC の薬剤感受性の動向を調べていく必要があると思われる。

結語

- ウシから高頻度に分離される STEC は全て同一の定着因子、即ち *saa*、*iha*、*lpfA0113* および *ehaA* 遺伝子を保有していた。ヒトから分離されるほとんどの STEC もウシ由来株とは異なるが同一の定着因子、即ち *eae*、*iha*、*efal* および *ehaA* 遺伝子を保有していた。ヒトとウシでそれぞれ優勢に見られた定着因子プロファイルは異なっていたことから、それぞれの腸管への定着に有利に働く定着因子は異なる可能性が示された。
- ウシから高頻度に分離される STEC の多くが *cdt* および *subAB* 遺伝子を保有していたが、下痢症患者から分離されるほとんどの STEC はこれらの毒素遺伝子を保有していなかった。
- Stx1 の産生量はウシ由来株とヒト由来株有意な差は認められなかったが Stx2 産生量はウシ由来株よりヒト由来株で有意に多く、Stx2 の産生量の違いがヒトへの病原性の強さに関与している可能性を示した。
- 調べた薬剤全てに対して 90% 以上の STEC 株が感受性を示した。全ての STEC が FOM および CPFX に感受性であったことから、これら 2 薬剤および類縁体を含め、ウシに対しては使用せず STEC 感染症患者の治療薬としてのみ使用することが重要である。

審査結果の要旨

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は、ヒトに血性下痢と激しい腹痛を主症状とする出血性大腸炎の原因菌で、特に小児や老人においては溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症といった重篤な合併症を引き起こすため重要視されている。STEC が産生する主要な病原因子は、志賀毒素 (Stx1, Stx2) や *eae* 遺伝子にコードされ腸管上皮細胞への定着に関わるインチミンなどが知られている。血清型 O157 を始め HUS 患者から分離される STEC は、通常 *eae* 遺伝子陽性であり Stx とインチミンが STEC 感染の重症化に重要であると考えられていた。しかし、*eae* 遺伝子を保有しない STEC が HUS 患者から分離され、インチミンは重症化に関わる必須な病原因子ではないと考えられるようになり、Efa1、Iha、Saa、LpfA0113 や EhaA 等の新たな定着因子が、STEC の臨床分離株で見つかった。更に細胞膨化致死毒素 (CDT) や Subtilase cytotoxin (SubAB) 等の毒素が HUS 患者から分離された STEC で見つかると、CDT と SubAB が STEC の新たな病原因子である可能性が示された。

現在 STEC の血清型は 435 種以上が報告されているが、患者から分離される O 群血清型のほとんどは、0157、026 や 0111 等、特定の血清型である。一方、ヒトへの感染源として知られるウシが保有する STEC の血清型は、かなり多様である。これらウシから分離される STEC と患者から分離される STEC における定着因子や病原因子の保有状況は未だ充分明らかとなっていない。また、ヒトの医療分野における薬剤耐性菌の出現は大きな問題となっており、その原因の 1 つに家畜に治療や成長促進を目的として使用される抗菌薬が挙げられている。ヒトおよび家畜から分離される STEC の薬剤感受性を把握しておくことは、STEC 感染症の治療において適切な抗菌薬を選択する上において重要である。本研究では健康牛および下痢症患者から分離した STEC の血清型、定着因子や毒素遺伝子の保有状況を中心とした細菌学的性状および薬剤感受性パターンを比較解析した。

第 1 章では、同一の牛舎内にいる臨床症状を呈さない牛（以下、健康牛）61 頭から約 2 週間毎に 1 年間採材した計 919 検体の直腸便から単離した 341 株の STEC から無作為に抽出した 171 株の細菌学的性状を解析した。この 171 株は、PFGE による解析で 32 のサブタイプを含む 13 クラスターに分類されたものであり、その血清型、定着因子 (*eae*、*efa1*、*iha*、*saa*、*lpf0113*、*ehaA*) と毒素 (*cdt*、*subAB*) 遺伝子の保有状況、および Stx 産生量について解析した。その結果、医学領域で問題となる 026 や 0111 の STEC もウシから分離され、ウシがヒトへの感染源となりうる可能性やウシから高頻度に単離される STEC は全て *saa*、*iha*、*lpfA0113* および *ehaA* 遺伝子が陽性であり、この定着因子プロファイルがウシの腸管に定着しやすい重要な因子の一つとなっている可能性を示した。また、我が国のウシ由来 STEC が *cdt-V* や *subAB* 遺伝子を高率で保持していることも明らかにした。

第 2 章では、2004 年から 5 年間、下痢症患者便 1,771 検体から STEC の分離を試み、分離した 28 株及び 1990 年代に分離して研究室で保管していた 33 株の STEC（計 61 株）の細菌学的性状解析を行い、ウシから分離した STEC との性状を比較した。その結果、我が国の下痢症患者から分離されるほとんどの STEC は O 群血清型が 0157、026 および 0111 でほとんど全ての株（91.8%）が *eae*、*iha*、*efa1* および *ehaA* 遺伝子が陽性であったが、ほとんどの株が *cdt* および *subAB* 遺伝子を保有しておらず、ウシとヒトで分離される STEC の定着因子プロファイルが異なり、これらの定着因子がヒトへの感染に重要である可能性を示した。また、ウシ由来株と比べてヒト由来株では Stx2 の産生量が有意に高いことを示した。

第 3 章では、ウシと下痢症患者から分離した STEC の薬剤感受性試験を国際標準である CLSI 法に準じて行い、両者の薬剤感受性パターンを比較した。その結果、調べた 12 薬剤に対してウシ、ヒト由来株の 90%以上が感受性を示した。また調べた全ての株は、厚生労働省が治療薬として推奨しているフォスфоマイシンとシプロフロキサシンに対して感受性であった。一方、血清型 0111:NM のウシ及びヒト由来株で多剤耐性菌、ア

ンピシリン、ストレプトマイシン及び ST 合剤に対する高度耐性菌が存在することを明らかとし、今後も STEC の薬剤感受性の動向について調査することの重要性を示した。

以上の結果は、ウシ由来 STEC と下痢症患者由来の STEC において定着因子プロファイルが異なり、特定の定着因子がそれぞれの宿主に対する特異性に関与している可能性を示した。また、これらの成果は、我が国で分離されたウシ及び患者由来の STEC の重要な分子疫学的知見を提供するものであり、獣医学の分野のみならず医学領域においても多大な貢献をされると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。