

# フィリピンの小児から分離された大腸菌のHeLa細胞付着性と病原遺伝子保有状況

内村眞佐子, 鶴岡 佳久, 山口マリ子<sup>1)</sup>, 植田 育也<sup>2)</sup>  
久保勢津子<sup>3)</sup>, 伊藤健一郎<sup>4)</sup>

## HeLa Cell Adhesion and Possession of Pathogenic Genes by *Escherichia coli* Derived from Children in Philippine

Masako UCHIMURA, Yoshihisa TSURUOKA, Mariko YAMAGUCHI  
Ikuya UEDA, Setsuko KUBO, and Kenichiro ITOH

### Summary

To detect enteropathogens, we studied stool specimens from infants less than 6 year of age with diarrhea and age-matched control infants without recent diarrhea in Philippine. Total of 238 *Escherichia coli* strains isolated from those infants were tested for HeLa cell adherence. LA (localized adherence *E. coli*) was found from 6 (8.0%) out of 75 diarrheal infants and 6 (3.7%) out of 163 healthy infants. The *eae* gene necessary for attaching/effacing in EPEC infection was detected from 4 out of 12 LA strains, 2 of them belonged to traditional EPEC serotype (055:H-, 0114:H2) and others belonged to non-EPEC serotype (020:H6, 0157:H45). The *eae* gene possessing *E. coli* was much more common in patients (3.5%) than in controls (0.6%). Among 4 strains with *eae* gene, only one strain (0157:H45) possessed *bfpA* gene which encodes a bundle-forming pilus associated with LA. AA (aggregative adherence) *E. coli* was found in almost equal rates (7 to 8%) from patients and controls. The *aggR* gene which concern with expression of aggregative adherence fimbriae I was detected from 11 out of 19 AA strains.

### 1. はじめに

ヒトに下痢症を引き起こす大腸菌のうち、腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC), 腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) は病原因子が明らかにされており、菌の同定は、細胞侵入性や毒素産性あるいはそれに関与する遺伝子により行われている。一方、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC) の病原機構として、菌の小腸粘膜への粘着性と上皮細胞微絨毛伸長作用が重要であると考えられている<sup>1)</sup>が、現在のところその同定はOH血清型別で行われている。

近年、下痢患者から分離される大腸菌の一部が、培養細胞 (HEp-2, HeLa) に対し局在性 (localized adherence LA), 拡散性 (diffused adherence DA) または凝集性 (aggregative adherence AA) のパターンで付着することが報告された<sup>2,3)</sup>。その後の研究で、LA グループには多くの EPEC 血清型株が含まれ<sup>4)</sup>、LA 大腸菌株はボランティアに下痢を引き起こすことが明らかにされた<sup>5)</sup>。また培養細胞に LA を示す大腸菌は、小児の小腸粘膜にも LA 粘着をすること<sup>6)</sup>が報告され、菌の小腸粘着性

と培養細胞への LA の関連性が示唆されている。しかし、LA を仲介する粘着物質が何かについては、研究者の間で議論されているところである。近年 Giron<sup>7)</sup>は、LA を示し、EPEC adherence factor (EAF) プラスミドを保有する菌が、線毛 (bundle-forming pilus, BFP) を産生することを報告し、BFP の構造遺伝子 (*bfpA*) の塩基配列が決定された<sup>8)</sup>。線毛産生に加えて EPEC 感染の重要な特徴は、菌が小腸の感染部位で引き起こす attaching and effacing (A/E) と呼ばれる上皮細胞絨毛の変化である<sup>9)</sup>。A/E を引き起こすのに必要な遺伝子の一つとして *eae* 遺伝子が報告され、DNA プローブが作成されている<sup>10)</sup>。

AA を示す大腸菌は、腸管凝集粘着性大腸菌 (enteroaggregative *E. coli*, EAaggEC) と名付けられ、東南アジア、南米等における乳幼児の持続性下痢症の原因菌として、注目されている<sup>11,12)</sup>。また、EAaggEC の HeLa 細胞に対する AA 型付着は、菌が産生する線毛 (AAF/I) によって特徴づけられていることが明らかにされ、AAF/I 線毛産生に関与する遺伝子 *aggR* の塩基配列が報告されている<sup>13)</sup>。

本報で我々は、フィリピン・ボホール島の小児から分離された HeLa 細胞に付着性を示す大腸菌について PCR 法で、*eae* *bfpA*, *aggR* 遺伝子検索を行い、細胞付着パターンとこれらの遺伝子保有の相関および、血清型で分類された EPEC との関係について調べた。

1) 現: 千葉市環境保健研究所

2) 千葉大学医学部

3) 千葉大学病院中央検査部

4) 国立予防衛生研究所

(1994年11月15日受理)

2. 材料と方法

2.1 菌株の分離同定

1989年8月にフィリピン南部のボホール島において、6歳以下の子どもの対象として、便からの腸管系病原菌の調査を行った。下痢の有無は、検査した便の状態から判断した。分離培地としてSS培地及びマッコンキー培地を用い、病原菌の同定は定法に従って行った。大腸菌のLTおよびST検出は市販キット(デンカ生研)を用い、VT検出はVero細胞を用いて行った。血清型別は市販血清を用いて行い、侵入性大腸菌の血清型に凝集した株については、PCR法により侵入性プラスミドの保有を確認した。

2.2 HeLa細胞への付着

大腸菌のHeLa細胞への付着性の観察は、CVD法<sup>1)</sup>に準じて行った。つまり、HeLa細胞を5%牛胎児血清加Eagle MEMを用いて、プラスチックディスク(セルディスク、住友ベークライト)を入れた24ウェル平底プレート中で、37℃、20時間培養後、ウェルを5%牛胎児血清及び0.5% D-mannose 加抗生物質不含Eagle MEMで1回洗浄し、各ウェルに同じ培地を1ml分注した。さらに、L-プロスで37℃18時間培養した供試菌株培養液の40μlを加え、37℃、3時間、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した後、プラスチックディスクを取り出し、PBSで3回洗浄し、メタノール固定、ギムザ染色を行って鏡検した。

2.3 PCR反応

病原大腸菌のAttaching and effacingに關与する染色体性遺伝子 *eae*<sup>15)</sup>、および線毛形成に關与する遺伝子 *bfpA*<sup>9)</sup>、EAggECの線毛形成に關与する遺伝子 *aggR*<sup>13)</sup>の一部を認識するプライマーを作成し、定法に従ってPCRを行って2%アガロースゲル電気泳動後観察した。

3 結果

3.1 大腸菌のHeLa細胞付着性と *eae*, *bfpA*, および *aggR*遺伝子保有状況

フィリピン・ボホール島の下痢小児75名、健康小児163名の便から分離した大腸菌の、HeLa細胞への付着性を調べた結果を表1に示す。LA大腸菌は、下痢症小児6名(8.0%)、健康小児6名(3.7%)から、AA大腸菌は下痢症小児5名(6.7%)、健康小児13名(8.0%)から、DA大腸菌は、下痢症小児9名(12%)、健康小児10名(6.1%)から検出された。細胞付着性を示した95

表1 フィリピン小児より分離した大腸菌のHeLa細胞付着性による分類

HeLa細胞付着パターン	菌株数(%)	
	下痢症小児 (n=75)	健康小児 (n=163)
LA	6 (8.0)	6 (3.7)
AA	5 (6.7)	13 (8.0)
DA	9 (12.0)	10 (6.1)
PA*	16 (21.3)	38 (23.3)
Negative	39 (52.0)	96 (58.9)

\* HeLa細胞への弱い付着性を示す

株および細胞付着性を示さなかった14株について、PCR法で *eae* および *aggR* 遺伝子の検索を行った。LA大腸菌12株のうち4株は *eae* 遺伝子を保有し、1株は *aggR* 遺伝子を保有していた。AA大腸菌19株のうち11株が *aggR* 遺伝子を保有していた。DA型付着株は17株、付着は認められるがLA, AA, DAのいずれにも分類できなかった(PA)47株および細胞付着性を示さなかった(NA)14株は、いずれも *eae* および *aggR* 遺伝子を保有しなかった(表2)。

表2 *eae* および *aggR* 遺伝子保有とHeLa細胞付着パターン

遺伝子保有		HeLa細胞付着陽性株数				
<i>eae</i>	<i>aggR</i>	LA	AA	DA	PA*	Negative
+	-	4	0	0	0	0
-	+	1	11	0	0	0
-	-	7	8	17	47	14

\* HeLa細胞への弱い付着性を示す。

*eae* 遺伝子が検出された株および従来のEPECに型別された株の血清型およびHeLa細胞付着型を表3に示した。*eae* 遺伝子陽性株で従来のEPEC血清型に属するものは、0114:H2, 055:H-の2株で、*bfpA* 遺伝子を共有する株は、0157:H45に型別された1株のみであった。他のEPEC血清型株: 018:H-, 020:H-, 026:H-, 044:H18(2株), 0114:H-, 0114:H2, 0119:H-, 0128:H-は *eae*, *bfpA* 遺伝子陰性であった。*aggR* 遺伝子陽性を示す12株のうち市販血清でO型別された株は、086a:H-(EPEC血清型)1株, 086a:H111株, および0148:Hut1株の3株のみであった。

表3 EPEC血清型菌のHeLa細胞付着性と *eae* 遺伝子検出

血清型(株数)	HeLa細胞付着タイプ	遺伝子検出		
		<i>eae</i>	<i>bfpA</i>	<i>aggR</i>
020:H6(1)	LA	+	-	-
0157:H45(1)	LA	+	+	-
055:H-* (1)	LA	+	-	-
0114:H2*(1)	LA	+	-	-
0114:H2*(1)	LA	-	-	-
086a:H-* (1)	AA	-	-	+
018:H-* (1)	PA	-	-	-
020:H-* (1)	PA	-	-	-
0128:H-* (1)	PA	-	-	-
026:H-* (1)	N**	-	-	-
044:H18*(2)	N	-	-	-
0119:H-* (2)	N	-	-	-

\* :EPEC血清型

\*\* :培養細胞付着性は認められなかった。

3.2 既知病原菌検出状況

大腸菌が分離されなかった21名を含む259名からの、腸管病原菌検出状況のまとめを表4に示す。下痢原性大腸菌のうち *eae* 遺伝子保有大腸菌, ETEC, 赤痢菌, サルモネラおよびエロモナス菌は、健康小児に比べ下痢症者から明らかに高率に分離された。*aggR* 遺伝子保有大腸菌は、下痢症小児および健康小児からはほぼ同じ割合で検出された。一方EIECは、6名(3.3%)の健康小児から分離されたが、下痢症小児からは分離されなかった。分離された赤痢菌の血清型は、*S.flexneri 2a* 2株及び *S.sonnei*

1株で、サルモネラの血清型は、*S. Typhimurium* 4株、*S. Newport* 1株であった。エロモナス菌は、すべて *A. hydrophila* であった。また、分離された ETEC の毒素型は、いずれも ST 単独産生型であった。

表4 フィリピン・ボホール島の小児下痢症患者からの既知病原菌の分離

腸管病原菌	菌陽性者数 (%)	
	下痢症小児 (n=86)	健康小児 (n=173)
下痢原性大腸菌		
<i>eae</i> (+)	3 (3.5)	1 (0.6)
<i>aggR</i> (+)	4 (4.7)	8 (4.6)
EPEC (gene-)	3 (3.5)	4 (2.3)
ETEC	5 (5.8)	1 (0.6)
EIEC	0 (0)	6 (3.5)
赤痢菌	3 (3.5)	0 (0)
サルモネラ	4 (4.7)	1 (0.6)
チフス菌	1 (1.2)	0 (0)
エロモナス菌	2 (2.4)	1 (0.6)
合計	21 (24.4)	17 (9.8)

#### 4. 考 察

HeLa 細胞付着性大腸菌は、その付着パターンで LA, AA, DA の3種に分類される。LAは、菌が細胞あるいはプラスチック上にマイクロコロニーを形成して付着し (図1A), AAは、ジグザグに重ねた積み木のように、菌が紐状に重なり合って細胞およびプラスチックに付着する (図1C) 特徴を持つ。DAは、細胞表面に一樣に菌が付着するので分類は比較的容易であるが、LAとAAでは、典型的な付着パターンを示さない株の場合、区別を付けにくいことがある。Gironら<sup>16)</sup>は、菌株名を伏せて実

験を行い2名で判定を行うなどして、客観的な結果を得る工夫をしている。我々の試験では、マイクロコロニーの形成が認められるものをLA、菌がいくつかつながって紐状に伸びている状態が観察されるものをAAと判定した。

今回我々が行ったフィリピンの小児の調査の結果、*eae* 遺伝子はLAを示す4株で認められた。これらの *eae* 遺伝子を保有する株の分離頻度は、健康者 (0.6%) に比べて下痢症患者 (3.5%) で高率であったことから、*eae* 保有大腸菌は、小児下痢症と関連が深いことが考えられる。これらの *eae* 遺伝子保有大腸菌のうち2株は従来の EPEC 血清型には属さない、0157:H45 および 020:H6 に型別された。Pedrosoら<sup>17)</sup>は、ブラジルの小児下痢症患者から高頻度に分離される EPEC 血清型に属さない株が、EPEC 株と同じようにヒト小腸粘膜に A/E 病変を引き起こすことを報告した。また、EPEC の血清型に属さない株が国内の散发下痢症患者から分離されることが、山崎ら<sup>18)</sup>によって明らかにされている。EPEC はこれまで、疫学的背景から特定の血清型と病原性を結びつけて分類されてきたが、病原因子検索から得られたこれらの結果は、これからの EPEC の分類を考える上で重要な知見となるとと思われる。一方、HeLa 細胞に LA 型付着を示した株で、*bfpA* 遺伝子を保有する株は1株のみであった。この結果は、LA 大腸菌の99%が *bfpA* プローブ陽性であったという Giron らの報告<sup>16)</sup>と異なる。我々が分離した *eae* 陽性、*bfpA* 陰性株は、確かに HeLa 細胞に LA 型付着を示す (図1B)。毒素原性大腸菌では、数種類のコロニゼーションファクターの存在が知られている。我々の結果は、EPEC においても菌の細胞粘着に関与する *bfpA* 以外の因子が存在する可能性を示している。

EAggEC は、組織培養細胞に EPEC の局在性付着とは明らかに異なる、“積み木状”の付着 (aggregative adherence, AA) を示すことが特徴とされている。しかし実際には検査法によって付着パターンに違いが生じ<sup>19)</sup>、付着パターンのみで EAggEC と同定することはできない。野外株の細胞付着性の観察では、付

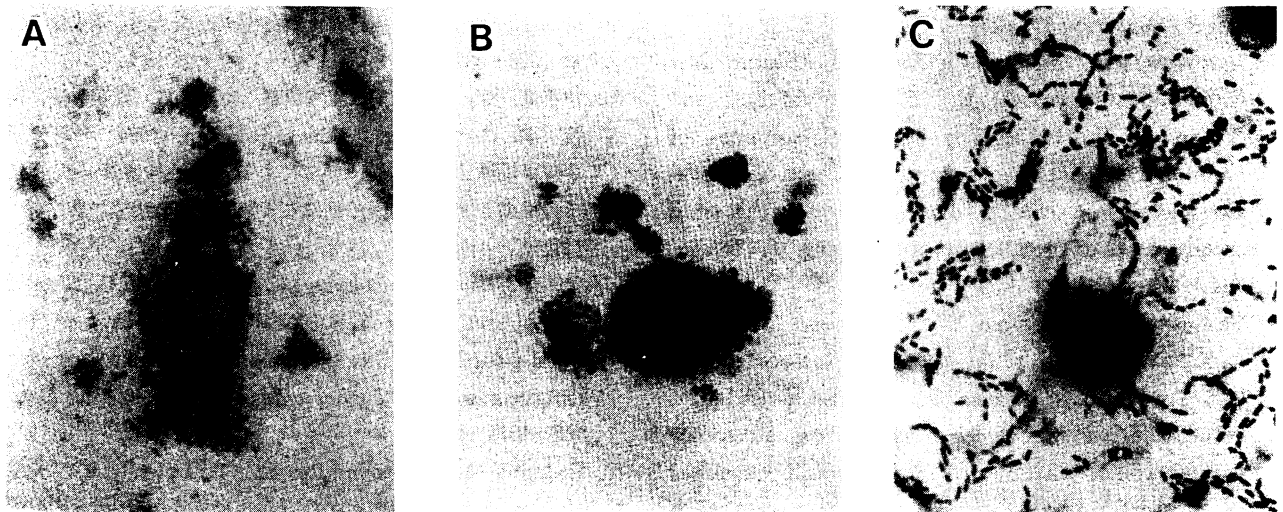


図1 光学顕微鏡で観察した大腸菌の HeLa 細胞への付着パターン

- (A) LA : 20P66株 (*eae*+, *bfpA*+, *aggR*-), 菌がマイクロコロニーを形成して細胞に付着している。
- (B) LA : 238P221株 (*eae*+, *bfpA*-, *aggR*-), 菌がマイクロコロニーを形成して細胞に付着している。
- (C) AA : 263P257株 (*eae*-, *bfpA*-, *aggR*+), 菌が積み木状につながりながら細胞に付着している。

着性が弱い株ではしばしばLAとの判別が困難な場合がある。そこで、Nataroら<sup>13)</sup>が報告したEAggEC 17-2株由来のaggR遺伝子を検出するプライマーを用いて、細胞付着型と遺伝子保有の相関性を検討した。AA型付着を示した19株のうち11株(57.9%)および細胞付着性が典型的ではないためLAと判定した1株からaggR遺伝子を検出することができ、EAggECの同定に、aggRを用いた遺伝子検査が有用であることが示された。しかし、フィリピンの小児からのaggR遺伝子保有EAggEC検出率は、塚本ら<sup>20)</sup>、Bhanら<sup>11)</sup>、Levineら<sup>12)</sup>のそれぞれブラジル、ミャンマー、インド、チリにおけるEAggECプローブを用いた成績と比べると低率であった。またaggR遺伝子保有EAggECは、下痢小児、健康小児においてほぼ同じ割合で検出され、aggR遺伝子保有菌と下痢症の関連については、さらに検討が必要であると思われる。

## 5 文 献

- 1) Donnenberg, M.S., and Kaper J.B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 60 : 3953-3961.
- 2) Scaletsky I.C.A., Silva M.L.M., and Tarabulsi L.R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun., 45 : 534-536.
- 3) Vial P.A., Robbins-Browne R., Lior H., Prado V., Kaper J.B., Nataro J.P., Maneval D., Elsayed A., and Levine M.M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis. 158 : 70-79.
- 4) Levine M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155 : 377-389.
- 5) Levine M.M., Nataro J.P., Karch H., Baldini M., Kaper J.B., Black R.E., Clements M.L., and O'Brien A.D. 1985. The Diarrheal response of humans to some classic sero-types of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect. Dis., 152 : 550-559.
- 6) Yamamoto T., Koyama Y., Matsumoto M., Sonoda E., Nakayama S., Uchimura M., Paveenkittiporn W., Tamura K., Yokota T., and Escheverria P. 1992. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. J. Infect. Dis., 166 : 1295-1310.
- 7) Giron J.A., Ho A.S.Y., and Schoolnik G.K. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science. 254 : 710-713.
- 8) Sohel I, Puente J.L., Murray M.J., Vuopio-Varkila J., and Schoolnik G.K. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. Mol. Microbiol. 7 : 563-575.
- 9) Law D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 7 : 152-173.
- 10) Jerse A.E., Yu J., Tall B.D., and Kaper J.B. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesion on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 : 7839-7843.
- 11) Bhan M.K., Raj P., Levine M.M., Kaper J.B., Bhandari N., Srivastava R., Kumar J.B., and Sazawal S. 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. J. Infect. Dis., 159 : 1061-1064.
- 12) Levine M.M., Prado V., Robbins-Browne R., Lior H., Kaper J.B., Moseley S.L., Gicquelais K., Nataro J.B., Vial P., and Tall B. 1988. Use of DNA probes and HEp-2 cell adherent assay to detect diarrheagic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 158 : 224-228.
- 13) Nataro J.P., Yikang D., Yingkang D., and Walker K. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176 : 4691-4699.
- 14) Nataro J.P., Scaletsky I. C.A., Kaper J.B., Levine M.M., and Trabulsi L.R. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 48 : 378-383.
- 15) 伊藤健一郎, 田村和満, 渡邊治雄, 山崎 貢, 齊藤 眞, 船橋 満, Orn-anong Ratchtrachenchai. 1994. PCR及び酵素標識DNAプローブ法による病原性大腸菌 eae 遺伝子の検出と "cold" SSCP による型別. 感染症学雑誌. 68 : 139.
- 16) Giron J.A., Donnenberg M.S., Martin W.C., Jarvis K.G. and Kaper J.B. 1993. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 168 : 1073-1041.
- 17) Pedroso M.Z., Freymuller E., Trabulsi L.R., and Gomes T.A.T. 1993. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. Infect. Immun. 61 : 1152-1156.

- 18) 山崎 貢, 斉藤 眞, 船橋 満, 伊藤健一郎. 1994. 散発下痢患者由来大腸菌における Attaching and effacing *E. coli* の検出状況について. 感染症学雑誌. 68 : 204.
- 19) Vial P.A., Mathewson J.J., DuPont H.L., Guers L., and Levine M.M. 1990. Comparison of two assay methods for patterns of adherence to HEp-2 cells of *Escherichia coli* from patients with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 28 : 882-885.
- 20) 塚本定三, 竹田美文. 1994. ブラジル, ミャンマーおよびわが国の下痢症患者, 健康者からの拡散性の腸管付着性大腸菌の検出と血清型. 感染症学雑誌., 67 : 753-757.