

ヒト由来下痢原性大腸菌の病原性および  
薬剤耐性とインテグロンの関連性に関する研究  
(Characterization and investigation of antimicrobial resistance,  
and its relevance to class 1 integrons of diarrheagenic  
*Escherichia coli* isolated from humans in Japan)

2020 年 10 月

窪村 亜希子

## 目次

序論.....	6
第1章 腸管凝集性大腸菌および腸管病原性大腸菌の分離率および細胞付着性試験と細胞付着関連遺伝子等の検出による病原性の検討.....	12
第1節 緒言 .....	12
第2節 材料および方法 .....	14
2-1 供試検体 .....	14
2-2 EAEC および EPEC の分離同定 .....	14
2-3 O 血清型別 .....	15
2-4 H 抗原の特定.....	15
2-5 細胞付着性関連遺伝子の検出 .....	15
2-6 HEp-2 細胞による細胞付着性試験.....	16
2-7 病原性関連遺伝子の検出およびインチミン遺伝子型別 .....	17
第3節 実験結果 .....	18
3-1 EAEC および EPEC の分離率.....	18
3-2 O 血清型と H 抗原型.....	18
3-3 EAEC の細胞付着率および病原性関連遺伝子の検出.....	18
3-4 EPEC の細胞付着率および病原性関連遺伝子とインチミン型の検出 .....	19
第4節 考察 .....	20
第5節 結語 .....	22
第2章 腸管凝集性大腸菌の O:H 抗原と薬剤耐性状況の確認および分子疫学解析による検討 .....	31
第1節 緒言 .....	31
第2節 材料および方法 .....	33
2-1 供試菌株 .....	33
2-2 O 抗原の特定.....	33
2-3 H 抗原の特定.....	33
2-4 細胞付着性試験 .....	33
2-5 バイオフィーム形成試験.....	34
2-6 薬剤感受性試験 .....	34
2-7 ESBL 遺伝子の検出および同定 .....	34
2-8 マルチローカスシーケンスタイピング .....	35
第3節 実験結果 .....	36
3-1 O:H 抗原型 .....	36
3-2 細胞付着性とバイオフィーム形成試験結果の比較 .....	36

3-3	薬剤感受性試験と ESBL 遺伝子保有状況 .....	37
3-4	マルチローカスシーケンスタイピング .....	37
第 4 節	考察 .....	38
第 5 節	結語 .....	40
第 3 章	各下痢原性大腸菌の薬剤耐性状況と次世代シーケンサー等により検出されるイン テグロン内部の薬剤耐性遺伝子の比較検討 .....	46
第 1 節	緒言 .....	46
第 2 節	材料および方法 .....	48
2-1	供試菌株 .....	48
2-2	薬剤感受性試験 .....	48
2-3	ESBL 遺伝子の検出および同定 .....	49
2-4	インテグロン保存領域に関する遺伝子の検出 .....	49
2-5	サンガーシーケンス解析による遺伝子カセットの検出 .....	49
2-6	次世代シーケンサーによる遺伝子カセットの検出および 3' -CS 部分の検討 .....	50
2-7	統計学的処理 .....	50
第 3 節	実験結果 .....	51
3-1	薬剤感受性試験および ESBL 遺伝子の検出 .....	51
3-2	<i>intI1</i> 、 <i>sul1</i> および <i>qacEΔ1</i> 遺伝子保有状況 .....	51
3-3	各下痢原性大腸菌のインテグロン保有状況と薬剤耐性率との比較 .....	51
3-4	インテグロン内部に含まれる薬剤耐性遺伝子および不完全型インテグロンの 3' -CS 部分の構造解析 .....	52
第 4 節	考察 .....	53
第 5 節	結語 .....	55
結論	.....	65
謝辞	.....	66
参考文献	.....	68

略号

AA	Aggregative adherence	凝集性付着
AAF	Aggregative adherence fimbriae	凝集性付着線毛
ABPC	Ampicillin	アンピシリン
AMR	Antimicrobial resistance	薬剤耐性
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute	米国臨床検査標準化委員会
CP	Chloramphenicol	クロラムフェニコール
CPFX	Ciprofloxacin	シプロフロキサシン
CTX	Cefotaxime	セフトキシム
DA	Diffuse adherence	散在性付着
EAEC	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>	腸管凝集性大腸菌
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	腸管侵入性大腸菌
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	腸管病原性大腸菌
ESBL	Extended spectrum $\beta$ -lactamase	基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	腸管毒素原性大腸菌
FBS	Fetal bovine serum	ウシ胎子血清
FOM	Fosfomycin	ホスホマイシン
GM	Gentamicin	ゲンタマイシン
HUS	Hemolytic uremic syndrome	溶血性尿毒症症候群
IMP	Imipenem	イミペネム
IS	Insertion sequences	挿入因子
JANIS	Japan Nosocomial Infections Surveillance	院内感染対策サーベイランス
JVARM	Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System	動物由来薬剤耐性菌モニタリング
KM	Kanamycin	カナマイシン
LA	Localized adherence	局在性付着
MEPM	Meropenem	メロペネム
NA	Nalidixic acid	ナリジクス酸
NESID	National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease	感染症サーベイランスシステム
NFLX	Norfloxacin	ノルフロキサシン
OUT	O-untypable	O 血清型別不能

PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝食塩水
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
STEC	Shigatoxin-producing <i>Escherichia coli</i>	志賀毒素産生大腸菌
SXT	Sulfamethoxazole-Trimethoprim	ST 合剤
TC	Tetracycline	テトラサイクロン
WHO	World Health Organization	世界保健機関
3'-CS	3' -conserved segment	3' 側保存領域
5'-CS	5' -conserved segment	5' 側保存領域

## 序論

下痢原性大腸菌はヒトに下痢や嘔吐などの消化器症状を発症させる大腸菌の総称であり、発症機序や保有する病原性関連遺伝子等により腸管凝集性大腸菌 (Enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC)、腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、腸管出血性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC)、腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC) などに分類される(1, 2)。下痢原性大腸菌は、その分類ごとに複数の特異的な O:H 抗原が報告されていることから、分離同定には簡便で迅速性の高い O 血清型別がよく用いられている。しかしながら、近年、下痢原性大腸菌のうち EAEC および EPEC については、実際には O 血清型に多様性があること報告された(3, 4)。また EAEC および EPEC はいずれも病原性の発現には細胞への付着が重要となる。しかし、細胞付着性を確認するための細胞付着性試験には、手技が煩雑であること、検査結果を得るまでに数時間または数日を要すること、多くの株数を対象に検査を行う施設では実施が難しいことなどの問題があった。そのため、EAEC および EPEC は分離同定が困難な下痢原性大腸菌であった。

EPEC は 1945 年に小児の下痢症として初めて報告され、その後も約 30 年間は主に途上国における小児科領域の下痢症の原因微生物として知られていた(5)。O:H 血清型別技術の発展に伴い、EPEC の分離同定は O:H 血清型に基づき行われてきた。しかしながら、1995 年にサンパウロで開かれた第 2 回 EPEC 国際シンポジウムにおいて「腸管細胞に attaching and effacing lesion (A/E 障害)を起こし、志賀毒素を産生しない下痢原性大腸菌」と決定した(2)。さらに 1998 年に Natero らは不明瞭であった EPEC 病原性の機序について、小腸粘膜上皮細胞への接着と粘膜上皮細胞の微絨毛を破壊することで A/E 障害を起こすこと、さ

らに A/E 障害の形成に重要な遺伝子として染色体上に存在する外膜蛋白質インチミンの遺伝子 (*eae*) を示した(1, 5)。これにより EPEC の分離同定は、遺伝子検査と細胞付着性等の表現型により同定されることとなるが、遺伝子検査技術の発展に伴い *eae* を保有する大腸菌の事例が多く報告されるようになったことから、EPEC は下痢症の小児のみならず成人や健康者からの分離も報告されるようになった(6, 7)。

EAEC については、1979 年に Cravioto らが実施した EPEC の調査において、その細胞付着形態から EPEC や既知の下痢原性大腸菌に分類できない大腸菌として示され、1987 年の Nataro らの追加調査によって新たな分類として正式に報告された(8, 9)。EAEC の細胞付着形態は、EPEC や STEC が示す局在性付着 (localized adherence, LA) とは異なり、「レンガを積んだ (stacked brick)」と比喻される特徴的形態である凝集性付着 (aggregative adherence, AA) を示す。また EAEC が細胞への付着に必要な線毛遺伝子として凝集性付着線毛遺伝子

(Aggregative adherence fimbriae, AAF) があり、現在、そのバリエーションは AAF/I ~ V までの 5 つの型が報告されている(10, 11)。EAEC が保有するプラスミドである pAA 上に存在する *aggR* は AAF やその他の病原性遺伝子等の総合的制御因子であり、EAEC の病原性発揮に重要な遺伝子であることから、近年 EAEC 分離同定を行う際の指標として多く用いられる(10, 12)。EAEC についても以前は、途上国における小児の長引く下痢症の原因菌として知られ、さらに HIV 感染者などの免疫力の低下を伴う疾患を持つ場合は、重篤な症状となることもある(2, 13)。近年では先進国や途上国、さらには成人や小児に関わらず分離報告があり、また先進国においても海外渡航歴のある下痢症患者から ETEC に次いで多く分離されるなど旅行者下痢症としても認知されるようになった(14)。

さらに EAEC は食中毒原因微生物としても複数報告されるようになり、2011 年にドイツで発生したフェヌグreek 種子の汚染を原因とする、患者 3,922 名、死者 47 名となる大規模な食中毒では、EAEC と STEC のハイブリッド型の大腸菌 0104:H4 が原因微生物として報告されている(15, 16)。さらにこの株は基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL) を保有していたことにより第 3 世代セファロスポリンに耐性を示した。このハイブリッド型の大腸菌 0104:H4 は原型となる EAEC がファージ感染によりベロ毒素産生性を獲得したことで、EAEC の強力な細胞付着性とベロ毒素産生性を併せ持つ強毒株となったことが解明されている。実際、0104:H4 の O:H 抗原有する STEC の報告は少ないが、EAEC では複数報告される(2, 12, 17)。また、2008 年のイタリアにおいては 092 : H33 による食中毒が、2013 年の韓国においては O 血清型と H 抗原ともに型別不能である EAEC による食中毒が発生するなど、EAEC においては多様な血清型が先進国や途上国に関わらず下痢症の原因微生物として報告されるようになったものの、国内における流行状況や O:H 型の調査をした報告は少ない(18, 19)。

EAEC の ESBL 保有率は他の下痢原性大腸菌に比べ有意に高いことが報告されている(12)。薬剤耐性は世界的な問題として認知されつつあり、2015 年の世界保健機関 (World Health Organization, WHO) の総会において「薬剤耐性対策グローバル・アクションプラン」が採択されたことで、WHO は加盟各国に対して 2 年以内に自国の行動計画を策定するよう求めた(20)。この「薬剤耐性対策グローバル・アクションプラン」では動物において発生した薬剤耐性菌が人にも影響していることが明らかになったとして、いわゆる” One Health” の視点が強調された。2016 年には、国内においても厚生労働省が「薬剤耐性 (Antimicrobial resistance, AMR) 対策アクションプラン」を発表した(21)。



その中において大腸菌は薬剤耐性の指標細菌として用いられ、畜産分野で用量の多いテトラサイクリンや、2006年に食品安全委員会がヒトの医療上きわめて高度に重要とランク付けした第3世代セファロスポリンに対する大腸菌の耐性状況について示した(22)。EAECは、海外の調査においてESBL遺伝子の保有率に加えアンピシリンやテトラサイクリンなど複数の薬剤耐性率についても他の下痢原性大腸菌より高値を示すことが報告され、さらにMostafaらの調査においては多剤耐性率が高いことも示されていることから、病原性のみならず薬剤耐性の観点においても重要である(23, 24)。

我が国における下痢原性大腸菌の流行状況は、厚生労働省が行っている感染症サーベイランスシステム(National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases, NESID)の病原体検出報告により、保健所や地方衛生研究所等からの報告が集計されることで行われている。地方衛生研究所における下痢原性大腸菌の検査は主に、国内で市販される43種類の病原大腸菌免疫血清により特定されるO血清型から下痢原性大腸菌の分類を推測後、病原毒素や病原遺伝子等を検出するための検査を行うことで分離同定されてきた。以前は、EAECが下痢原性大腸菌分類に含まれておらず、EPECの報告についてはO血清型により分離同定されたものであり*eae*の検出は必須ではなかった。しかしながら近年、遺伝子検査が常態的に実施されるようになったことで、O血清型からEPECであると同定した大腸菌であっても*eae*を保有しない株が存在することや、新たに*aggR*を保有している大腸菌による食中毒が国内においても報告されるようになった。そのような事例を鑑み、2012年に国立感染症研究所は感染症サーベイランスシステムの病原体検出報告の下痢原性大腸菌分類や指標を変更し、EAECおよびEPECともにそれぞれに特定の遺伝子を分離同定の指標として示した(25)。しかし、遺伝子を指標として分離されるEAECおよびEPECは、地方衛生

研究所における食中毒等の調査対象者のうち消化器症状を示さない非発症者や調理従事者など、健康者の検便検体からも分離され、その解釈が困難となった。

国内の薬剤耐性菌サーベイランスについては、2000年から厚生労働省が開始した院内感染対策サーベイランス（Japan Nosocomial Infections Surveillance, JANIS）があり、主に医療機関においてヒトから分離される細菌を対象に薬剤耐性菌の集計を行っている(26)。JANISの検査部門における第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の分離率は2013年には1.4%であったが2017年には2.35%へと微増している(27)。家畜から分離される細菌については動物由来薬剤耐性菌モニタリング（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System, JVARM）が知られている。JVARMレポートにおいて、大腸菌の第3世代セファロスポリン耐性は減少傾向にあるものの、2014年から2015年のJVARMレポートでは肉用鶏のテトラサイクリン、アンピシリンおよびナリジクス酸の耐性率においては今もなお42.5-49.0%と高値であることが示されている。しかしながら、いずれも下痢原性大腸菌について集計を行ったデータは含まれていない(28)。

薬剤耐性に関与する因子として、特にグラム陰性菌においてはインテグロンが知られている(29, 30)。インテグロンは1989年にHallらによって初めて報告された可動因子である(31)。インテグロンは3'側保存領域（3'-conserved segment, 3'-CS）に存在する*intI*が薬剤耐性遺伝子などの遺伝子カセットを可動領域に取り込み、上流に存在する強力なプロモーターにより取り込んだ遺伝子を発現させる(32)。*intI*はその配列の違いにより*intI1*から*intI4*に分けられ、それぞれの遺伝子の存在によりクラス1からクラス4までのインテグロンに分類され、大腸菌を含む腸内細菌科においては主にクラス1インテグロンが検出される(32)。Phongpaichitらの調査においては、大腸菌の51%から*intI1*

が検出され、インテグロンを保有する大腸菌は、インテグロンを保有しない大腸菌に比べ複数の薬剤に対し有意に高い耐性を示すと報告している(33)。さらにLeversteinらはインテグロンを保有する大腸菌は多剤耐性傾向が強いことを示した(34)。しかしながら、インテグロン可動領域に含まれる遺伝子カセットを検出した報告は少ない。さらにPartridgeらはIS1、IS26、ISEcp1cおよびIS6100などのsmall mobile elementがインテグロンの3'-CSに挿入されることで、3'-CSが欠損しているインテグロンが存在すると報告している(29)。3'-CSが欠損したインテグロンにおいてはPCR法による可動領域の遺伝子増幅が困難であり、遺伝子増幅を認めないインテグロンについては可動領域部分の薬剤耐性遺伝子等の遺伝子カセットは不検出としている報告もある(35)。しかし、実際はその可動領域に薬剤耐性遺伝子等の遺伝子カセットが含まれている可能性があるものの十分な調査は行われていない。それゆえ、保有するインテグロン内部の薬剤耐性遺伝子と薬剤耐性の表現型との関連性は不明瞭である。

本研究においては、第一章で遺伝子を指標として分離されるEAECおよびEPECの分離状況やその病原性について調査を行った。第二章では、O血清型別不能であるEAECのO抗原の特定と第3世代セファロスポリンを含む12種類の薬剤耐性状況について調査を行った。第三章では下痢原性大腸菌全体の薬剤耐性状況に加え、インテグロンの保有状況とインテグロン内部に含まれる薬剤耐性遺伝子について調査を行った。

## 第1章 腸管凝集性大腸菌および腸管病原性大腸菌の分離率および細胞付着性試験と細胞付着関連遺伝子等の検出による病原性の検討

### 第1節 緒言

下痢原性大腸菌のうち、腸管凝集性大腸菌 (Enteroaggregative *E. coli*, EAEC) や腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC) は、以前は途上国における小児下痢症の起因菌として認識されていた(36-38)。しかしながら EAEC と EPEC は、O 血清型別試験において多様な血清型が報告されており、O 血清型により EAEC または EPEC であることを推定するのが困難である。さらに同定のために実施される病原性の発現に重要な細胞付着性を確認するための細胞付着性試験は、その手技自体が煩雑であることや検査結果を得るまでに長い時間を要する。そのため、多くの株数の検査を行っている検査施設において EAEC や EPEC は、分離同定が困難な下痢原性大腸菌であった(2-4)。しかしながら、遺伝子検査技術の発展に伴い、EAEC や EPEC の病原性やその関連遺伝子が複数報告されるようになり、1990 年代にそれぞれ分離同定のための定義が報告されるようになった(1, 2)。さらに近年では、先進国においても渡航歴を有する下痢症患者から EAEC の分離が報告されるようになったことから旅行者下痢症の起因菌としても認知されるようになり、EPEC においても食中毒や散発下痢症等の原因菌として報告されている(14, 18, 19, 39)。

国内においては、2012 年に国立感染症研究所は、感染症サーベイランスシステムの EAEC および EPEC における分離同定の指標としてそれぞれ *aggR* や *eae* など特定の遺伝子を示した(25)。感染症サーベイランスシステムにおける下痢原性大腸菌検査は、従来、市販される数種類の病原大腸菌免疫血清により特定される O 血清型からどの下痢原性大腸菌分類に該当するか推定し、必要に応じて毒素やその遺伝子の検出を行ってきた。しかし、EAEC については下痢原性大腸

菌分類に規定されておらず、EPECについては *eae* の検出は必須ではなかった(40, 41)。1990年代頃から、地方衛生研究所においても遺伝子検査が常態的に実施されるようになったことで、O血清型によりEPECであると同定した大腸菌であっても *eae* を保有しない株の存在や、新たな食中毒起因菌として *aggR* を保有する大腸菌の存在が認知されるようになった(41-43)。このような事例を鑑み、厚生労働省が実施する感染症サーベイランスシステムの病原体検出報告の下痢原性大腸菌の検出法や分類について変更が行われた。しかし、遺伝子を指標として分離同定されるEAECおよびEPECは、地方衛生研究所における食中毒等の調査対象者のうち消化器症状を示さない非発症者や調理従事者など、健康者の検便検体からも分離され、その解釈が困難となった。

そこで第一章では、遺伝子を指標として分離同定されるEAECおよびEPECの流行状況および病原性について確認するため、2012年から2013年に搬入されたヒトの検便検体からEAECおよびEPECの分離を行い、分離された菌株について細胞付着性試験および病原性関連遺伝子の検出により病原性の検討を行った。

## 第2節 材料および方法

### 2-1 供試検体

2012年4月から2013年12月までに川崎市健康安全研究所（川崎、日本）に搬入された検便検体のうち大腸菌様コロニーが分離可能であった1,029名（細菌性腸管感染症患者108名とその接触者436名、および食中毒関連485名）の検便を供試検体とした。この細菌性腸管感染症患者とは、腸管出血性大腸菌または腸チフスの患者であり、食中毒関連においてはEAECまたはEPECが原因とされる食中毒事例は含まれていない。細菌性腸管感染症患者のうち下痢や嘔吐等の消化器症状を有していた88名に加え、食中毒関連において有症者または患者と記載されていた259名の合計347名を「有症者」とした。さらに細菌性腸管感染症患者の接触者や細菌性腸管感染症患者であっても消化器症状を発症しなかった456名、および食中毒関連において健康者または調理従事者と記載されていた226名の合計682名を「健康者」とした(表1)。

### 2-2 EAEC および EPEC の分離同定

検体を deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose (DHL) 寒天培地に直接塗抹し 37°C 一晚培養後、濃厚発育部分のスライスをサンプルとした polymerase chain reaction (PCR) 法をスクリーニングとして実施し、*eae* および *aggR* の検出を行った(44)。大腸菌の DNA は、滅菌蒸留水 100  $\mu$ L に菌体を懸濁した菌液を 100°C で 5 分間加熱した後、10000  $\times$  g で 5 分間遠心することにより得られた菌液の上清を使用した。スクリーニングにて陽性であった検体については、同じ平板培地から大腸菌様コロニーを 3~5 コロニー釣菌し、それぞれ triple sugar iron (TSI) および lysine indole motility (LIM) 培地に接種後 37°C 一晚培養を行った。TSI および LIM 培地で大腸菌の生化学的性状を確認後、各菌株につい

て同じプライマーを用いて PCR 法により *eae* および *aggR* の検出を再度行った。陰性であった場合は、別のコロニーを TSI および LIM 培地へ接種し直して再検を行い、陽性であった場合はその菌株のうち他の大腸菌病原関連遺伝子 (*stx*, *stp*, *sth*, *elt*, *invE* および *ipaH*) が陰性であった株をそれぞれ EPEC または EAEC と同定した (図 1)。

2-3 0 血清型別

分離された EAEC および EPEC 菌株については、病原大腸菌免疫血清（デンカ、東京、日本）の 43 種類（01, 6, 8, 15, 18, 20, 25, 27, 26, 28ac, 29, 44, 55, 63, 78, 86a, 111, 112ac, 114, 115, 119, 124, 125, 126, 127a, 128, 136, 142, 143, 144, 146, 148, 151, 152, 153, 157, 158, 159, 164, 166, 167, 168 および 169）の O 血清を用いて、添付の取扱説明書に準拠しスライド凝集法により O 血清型の同定を行った。

## 2-4 H 抗原の特定

EAEC および EPEC 菌株について Prager ら (45) の PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法により H 抗原型の特特定を行った。すなわち、2 種類のプライマーセットを用いて PCR 法を行い、得られた増幅産物にそれぞれ異なる制限酵素 (*RsaI*, *CfoI*) を添加し、37℃で 4 時間インキュベート後に電気泳動により得られた切断パターンの組み合わせから H 抗原の特特定を行った。

## 2-5 細胞付着性関連遺伝子の検出

EAEC および EPEC 株について、細胞付着に関連する遺伝子の検出を行った。EAEC については凝集性付着線毛 (aggregative adherence fimbriae, AAF) 遺伝子で

ある AAF/I~V の保有を確認するため、それぞれ *aggA* (AAF/I) , *aafA* (AAF/II), *agg3A* (AAF/III) , *agg4A* (AAF/IV) および *agg5A* (AAF/V) について PCR 法により検出を行った(10, 11)。EPEC については収束線毛遺伝子である *bfp* (bundle forming pili) の検出を PCR 法にて実施した(44)。なお、EPEC は *bfp* の有無により typical-EPEC と atypical-EPEC に区別される。

## 2-6 HEp-2 細胞による細胞付着性試験

EAEC および EPEC 菌株について HEp-2 細胞を用いた細胞付着性試験を実施した。EPEC については CVD (Center for Vaccine Development) 法により細胞付着性試験を実施した。すなわち、HEp-2 細胞を 10 % fetal bovine serum(FBS)加 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) で 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 50~70 % confluence になるよう培養し、FBS-free DMEM で 1 回洗浄、1 % D-mannose 加 DMEM、および供試菌を 10<sup>7</sup>/mL 程度になるよう接種し、1,000×g で 1 分間遠心後、37°C で 1 時間、5 %CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。培養後、リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で 3 回洗浄し、再度 1 % D-mannose 加 DMEM を加え、さらに 37°C で 3 時間、5 %CO<sub>2</sub> 存在下で培養した(46)。EAEC については、HEp-2 細胞を 90 %confluence で使用し 1 回目の菌培養後の PBS による洗浄を 6 回実施する UTH (University of Texas Medical School and School of Public Health) 法により細胞付着性試験を実施した(47)。いずれも最終培養後に PBS にて 6 回洗浄し、メタノール固定およびギムザ染色後に鏡検を行った。鏡検では細胞への付着の有無、および EAEC においては凝集性付着 (aggregative adherence, AA)、EPEC においては *eae* を有する腸管出血性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC) においても同様に認められる局在性付着 (localized adherence, LA) について確認した。



## 2-7 病原性関連遺伝子の検出およびインチミン遺伝子型別

EAEC 菌株については、EAEC の病原性に関連がある毒素として *astA* (EAEC heat stable toxin, EAST-1) を PCR 法により検出を行った(44)。EPEC については、外膜蛋白質のインチミン (intimin) の遺伝子型別を Ramachandran らの報告(48)の PCR-RFLP 法に準拠し、実施した。すなわち、4 つの primer を用いて実施した PCR 法により得られる 1 つの増幅産物(840~880bp)を 10  $\mu$  L ずつ 3 つに分注し、それぞれ *AluI*, *RsaI* および *HhaI* の制限酵素を添加し、37°C で 4 時間インキュベート後に電気泳動により得られた切断パターンの組み合わせからインチミン遺伝子型の特定を行った (図 2 A)。

### 第3節 実験結果

#### 3-1 EAEC および EPEC の分離率

供試検体 1,029 検体から EAEC が 32 検体、EPEC が 30 検体から分離され、分離率はそれぞれ 3.1 % および 2.9 % であった（表 2）。EAEC および EPEC の有症者と健康者の分離率は 2.2-3.4 % であり、いずれも健康者の分離率で高値を示した。なお、スクリーニング陽性であった全ての検体から EAEC または EPEC が分離可能であったが、EAEC と EPEC が共に検出された検体はなかった。

#### 3-2 O 血清型と H 抗原型

EAEC の血清型別を実施した結果、32 株のうち 8 株（25.0 %）が 6 種類の O 血清型（O126 が 3 株、O44, O55, O86, O127 および O153 が 1 株ずつ）に型別され、残り 24 株（75.0 %）は O 血清型別不能（O-untypable, OUT）であった。EAEC の H 抗原型において、32 株が 8 種類の H 抗原型に型別され、H27 が 13 株で最も多く、次いで H34 が 9 株、H18 が 3 株、H21 および H33 が 2 株、H2、H8 および H10 が 1 株であった。EPEC の O 血清型別については、30 株のうち 9 株（30.0 %）が 8 種類の O 血清型（O124 が 2 株、O15, O55, O63, O114, O125, O145 および O164 が 1 株）に型別され、残り 21 株（70.0 %）が OUT であった。EPEC の H 抗原型は、30 株が 14 種類の H 抗原型に型別され、H6（5 株）が最も多く検出され、次いで H8 や H31 などに型別された（表 3）。

#### 3-3 EAEC の細胞付着率および病原性関連遺伝子の検出

細胞付着性試験では EAEC 32 株中 16 株（50.0 %）が凝集性付着（Aggregative adherence, AA）を示した（図 3A）。毒素遺伝子である *astA* は 20 株（62.5 %）から検出され、凝集性付着線毛遺伝子（AAF）は 32 株中 30 株（93.8 %）から、

*aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A* および *agg5A* のいずれか 1 つが検出された。検出された各遺伝子から最も多い AAF 型は AAF/Ⅲで 10 株、次いで AAF/Ⅰが 9 株、AAF/Ⅱが 6 株、AAF/Ⅳが 4 株、AAF/Ⅴが 1 株であった。特定の O 血清型や検出遺伝子の違いにより細胞付着率に大きな差は認められなかった (表 4)。

#### 3-4 EPEC の細胞付着率および病原性関連遺伝子とインチミン型の検出

細胞付着性試験では EPEC30 株中 1 株 (3.0 %) で局在性付着 (Localized adherence, LA) が認められた (図 3B)。さらに EPEC に特異的ではないが大腸菌において稀に認められる散在性付着 (Diffuse adherence, DA) を示す株も 1 株検出された。細胞の付着に関与する *bfp* は全株で陰性であり、いずれも atypical-EPEC であった。またインチミン型別では 30 株で 9 種類のインチミン型が検出され、最も多く検出されたインチミン型は intimin- $\epsilon$ ,  $\theta$  の 5 株であり、次いで intimin- $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\iota$  が 4 株ずつ、intimin- $\lambda$  が 2 株、intimin- $\kappa$ ,  $\xi$  が 1 株ずつであった (図 2 B, 表 5)。

#### 第4節 考察

EAEC および EPEC の分離率は、海外の報告に比べ低値を示したものの、本研究においても症状の有無に関わらずいずれも 3 %程度(2.0-3.4 %)であった。海外における調査のうち、本研究と同様に O 血清型に依らず大腸菌病原遺伝子の検出を行った調査においては、症状の有無に関わらず 4.0-14.8 %程度で検出されている。特に途上国や小児を対象とした調査において高値を示し、また健康者については他の下痢原性大腸菌より高率に分離されることも報告されている(6, 7, 49, 50)。本研究においては有症者より健康者の方がわずかに高い分離率を示したが、有症者の示す消化器症状の起因菌となっている細菌が EAEC や EPEC の分離に影響を与えた可能性も考えられた。本研究において、国内においても EAEC および EPEC は検査対象者の症状の有無に関わらず同等の割合で分離されることが示された。国内における同様の調査は少なく、大分県および東京都で実施された健康者または有症者のみを対象とした調査において、分離率は本研究と同様の値を示しており、さらに健康者の分離率は他の下痢原性大腸菌より高い値であったことが報告されている(51, 52)。

本研究において EAEC および EPEC のいずれも半数以上の株で OUT となったことから、国内で市販される O 血清のみで EAEC や EPEC を推測または特定することは困難であると考えられた。大腸菌の O 血清型は、その型から大腸菌の病原性が推測されるとともに、地方衛生研究所においては食中毒や感染症の発生機序の特定においても重要な情報の 1 つとなる(1, 2)。さらに、海外で同様の 43 種類の免疫血清により O 血清型別を行った調査においても、EAEC および EPEC のいずれも半数以上の株で OUT となったことから、海外と同様の結果であったと考えられる(12, 37)。しかしながら、本研究において EAEC は EPEC に比べ検出された H 抗原型の種類が少なく、OUT であっても同じ O 抗原型が複数含まれる可

能性が示唆された。EPEC は病原性に関連があるとされる O:H 型が複数報告されており、本研究においてもそれらの報告と同じ O 血清型 (055、0125) が検出されたが H 抗原は異なり、いずれも細胞付着性が認められなかったことから、O:H の組み合わせの重要性を認識した (1, 2)。また、EPEC のうち細胞に付着を示した 2 株 (LA と DA) はともに OUT であったが、いずれも intimin- $\beta$  であった。インチミン型についてはその型により病原性に差があるという報告があり、STEC のうち溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) を発症させる危険性が高いなど高病原性があると認識されている 0157 や 0145 はいずれも intimin- $\gamma$  であり、026 はいずれも intimin- $\beta$  である (53-55)。今回の研究においては細胞付着性を示した株数が少ないことから、今後も検討が必要ではあるが、EPEC における病原性の検討や、さらには OUT である株から得られる情報の 1 つとしても intimin 型の特定は有用であると考ええる。

EPEC の病原性発揮には細胞への付着が重要である (1)。実際、EPEC が原因と推測される患者から分離された EPEC 株について細胞付着性試験を実施した調査においては、多くの株で LA を示している (51, 56)。さらに *bfp* を保有する typical-EPEC より *bfp* を保有しない atypical-EPEC の方が病原性が低いことも知られている (1, 39)。本研究において分離された EPEC は全て atypical-EPEC であり、LA を示した株はわずか 1 株 (3.0%) のみであったことから、今回分離された EPEC が病原性を有する可能性は低いと考えられた。一方で、EAEC の病原性についても細胞付着性は重要であり、本研究結果における細胞付着率は 50.0%、細胞付着関連遺伝子である AAF 遺伝子は 93.8%、病原毒素遺伝子である *astA* は 62.5% から検出されたことから、EAEC は EPEC に比べ病原性を有する可能性が高いことが示唆された。

## 第5節 結語

EAEC および EPEC は、健康者または本菌が原因と特定されない場合の有症者においても同様の割合で分離され、健康者における分離率は他の下痢原性大腸菌よりも高値であると考えられた。また、いずれも多く株が OUT となったことから、国内で市販される大腸菌免疫血清により EAEC および EPEC の分離を行う事は困難であると考えられた。EPEC のうち LA を示したのはわずか1株(3.0%)であり、全ての株が atypical-EPEC (*bfp* 陰性)であったことから、本研究で分離された EPEC が病原性を有する可能性は低いことが示唆された。しかしながら、EAEC については、EPEC に比べ病原性を有する可能性が高いことが示唆され、分離同定された場合には疫学情報を加味した解釈が重要であると考えられる。

図 1. 腸管凝集性大腸菌および腸管病原性大腸菌分離同定のフローチャート

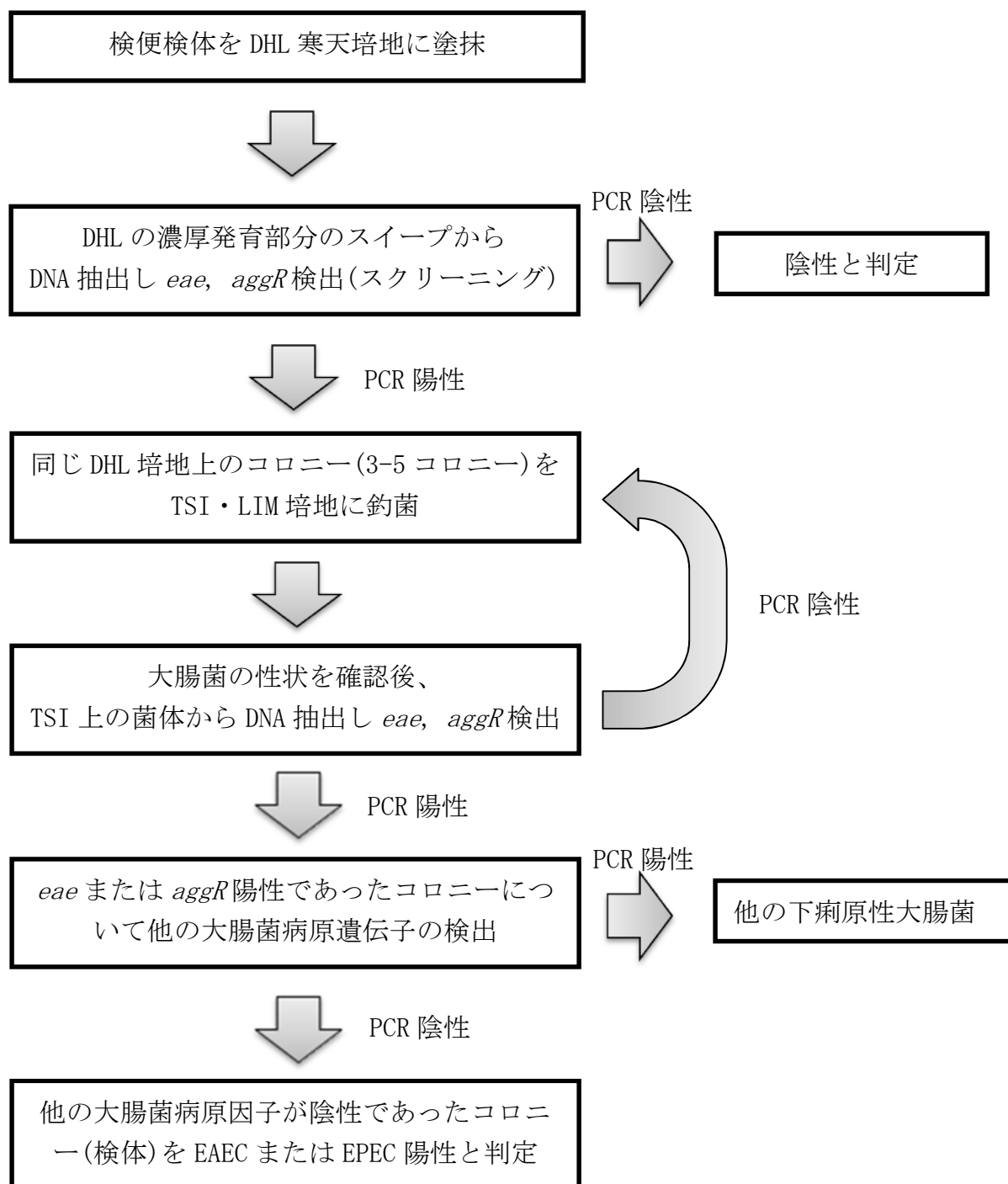
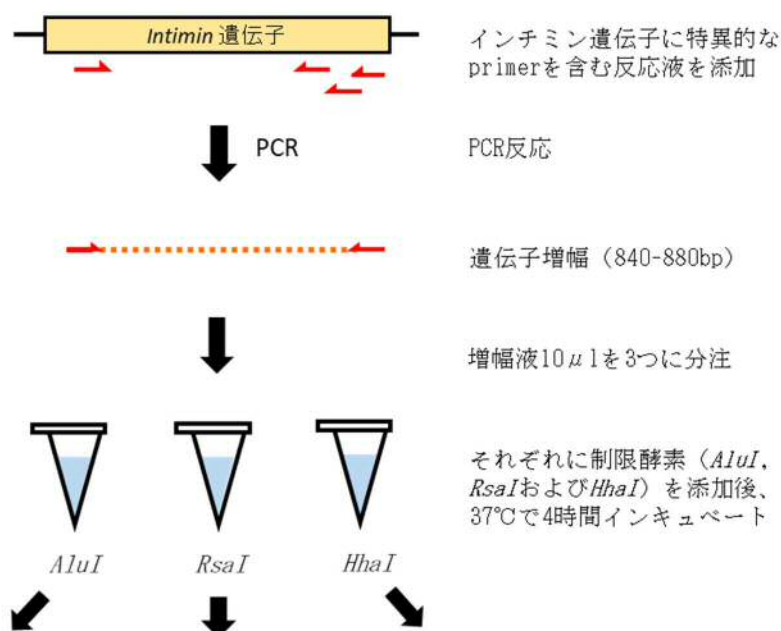
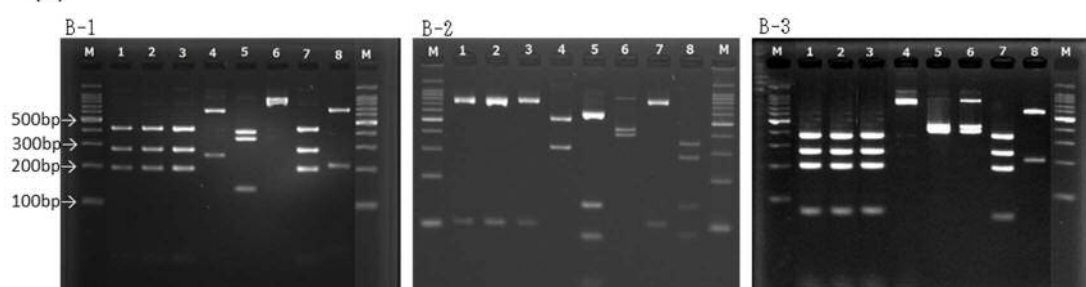


図 2. 腸管病原性大腸菌の分離同定のインチミン遺伝子型別法と結果

(A)



(B)



(A) インチミン型別のフローチャート

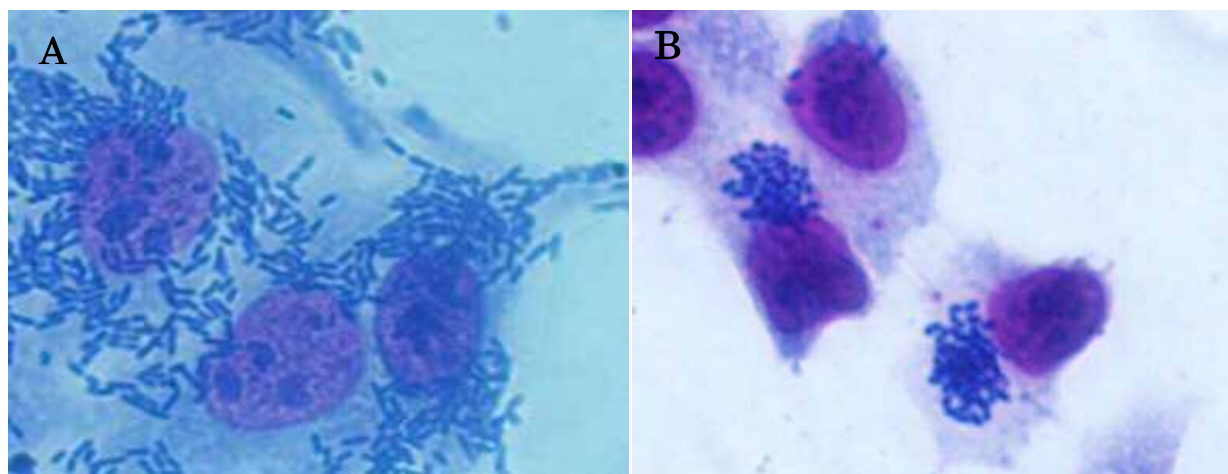
赤矢印はプライマー (reverse primer はインチミン型により異なる3種類の配列を使用)

(B) 制限酵素切断後の泳動像 (B-1, *AluI*による切断画像; B-2, *RsaI*による切断画像; B-3, *HhaI*による切断画像)

M, 100bp マーカ; Lene-1, 2, 3, 7, intimin- $\epsilon$ ; Lene-4, intimin- $\iota$ ; Lene-5, intimin- $\alpha$ 2; Lene-6, intimin- $\beta$ ; Lene-8, intimin- $\zeta$



図 3. 腸管凝集性大腸菌および腸管病原性大腸菌の HEp-2 細胞による細胞付着性試験



(A) 腸管凝集性大腸菌の凝集性付着、(B) 腸管病原性大腸菌の局在性付着

表 1. 供試検体の有症者および健康者の由来および検体数

	Bacterial diarrhea		Food poisoning	Total
	Patient	Contact person		
Symptomatic	88	0	259	347
Asymptomatic	20	436	226	682
Total	108	436	485	1029

表 2. 腸管凝集性大腸菌および腸管病原性大腸菌の分離率

Pathogen	No. (%) of positive		Total
	Symptomatic (n = 346)	Asymtomatic (n = 683)	
EAEC	10 (2.9)	22 (3.2)	32 (3.1)
EPEC	7 (2.0)	23 (3.4)	30 (2.9)

EAEC: Enteroaggregative *Escherichia coli*, EPEC: Entropathogenic *E. coli*

表 3. 腸管凝集性大腸菌および腸管病原性大腸菌の O:H 抗原型

O:H type	No. of EAEC strains	No. of EPEC strains
O15:H21		1
O44:H18	1	
O55:H12		1
O55:H21	1	
O63:H6		1
O86:H27	1	
O114:H30		1
O124:H14		2
O125:H49		1
O126:H27	3	
O127:H21	1	
O145:H47		1
O153:H2	1	
O164:H51		1
OUT:H6		4
OUT:H8	1	4
OUT:H9		2
OUT:H10	1	
OUT:H11		1
OUT:H18	2	
OUT:H21		2
OUT:H27	9	
OUT:H30		2
OUT:H31		4
OUT:H33	2	
OUT:H34	9	
OUT:H45		1
OUT:H51		1
Total	32	30

EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; OUT,

O-untypable

表 4. 腸管凝集性大腸菌 (EAEC) 32 株の O : H 型、遺伝子検査および細胞付着性  
試験結果

O-type	H-type	Status	AAF	<i>astA</i>	HEp-2 adhesion
44	18	Healthy	II	+	AA
55	21	Healthy	IV	—	NA
86	27	Healthy	IV	—	NA
126	27	Healthy	II	+	NA
126	27	Healthy	II	+	AA
UT	10	Healthy	I	—	AA
UT	27	Healthy	I	+	AA
UT	27	Healthy	I	+	NA
UT	27	Healthy	II	+	AA
UT	27	Healthy	II	+	NA
UT	27	Healthy	IV	—	NA
UT	33	Healthy	I	—	AA
UT	33	Healthy	—	—	AA
UT	34	Healthy	III	+	NA
UT	34	Healthy	III	+	AA
UT	34	Healthy	III	+	AA
UT	34	Healthy	III	+	NA
UT	34	Healthy	III	+	AA
UT	34	Healthy	III	+	AA
UT	34	Healthy	III	+	AA
UT	34	Healthy	III	+	AA
UT	34	Healthy	III	+	AA
UT	34	Healthy	III	+	NA
126	27	Patient	II	+	NA
127	21	Patient	V	—	AA
153	2	Patient	III	+	NA
UT	8	Patient	—	+	NA
UT	18	Patient	I	—	NA
UT	18	Patient	IV	—	NA
UT	27	Patient	I	—	NA
UT	27	Patient	I	—	AA
UT	27	Patient	I	+	NA
UT	27	Patient	I	—	AA

UT, untypable; AA, aggregative adherence; NA, non-adherent

表 5. 腸管病原性大腸菌 (EPEC) 30 株の O:H 型、遺伝子検査および細胞付着性試験結果

O-type	H-type	Status	<i>bfp</i>	intimin type	HEp-2 adhesion
63	6	Healthy	—	$\alpha 2$	NA
UT	6	Healthy	—	$\alpha 2$	NA
125	49	Healthy	—	$\alpha 2$	NA
UT	9	Healthy	—	$\beta$	NA
UT	11	Healthy	—	$\beta$	LA
15	21	Healthy	—	$\beta$	NA
UT	21	Healthy	—	$\beta$	DA
UT	8	Healthy	—	$\varepsilon$	NA
UT	8	Healthy	—	$\varepsilon$	NA
114	30	Healthy	—	$\varepsilon$	NA
UT	30	Healthy	—	$\varepsilon$	NA
UT	31	Healthy	—	$\zeta$	NA
UT	31	Healthy	—	$\zeta$	NA
UT	31	Healthy	—	$\zeta$	NA
UT	8	Healthy	—	$\theta$	NA
UT	21	Healthy	—	$\theta$	NA
UT	51	Healthy	—	$\theta$	NA
UT	6	Healthy	—	$\iota$	NA
UT	8	Healthy	—	$\iota$	NA
145	47	Healthy	—	$\iota$	NA
UT	45	Healthy	—	$\kappa$	NA
124	14	Healthy	—	$\lambda$	NA
124	14	Healthy	—	$\lambda$	NA
UT	6	Patient	—	$\alpha 2$	NA
UT	30	Patient	—	$\varepsilon$	NA
UT	31	Patient	—	$\zeta$	NA
55	12	Patient	—	$\theta$	NA
164	51	Patient	—	$\theta$	NA
UT	9	Patient	—	$\iota$	NA
UT	6	Patient	—	$\xi$	NA

UT, untypable; NA, non-adherent; LA, localised adherence; DA, diffuse adherence

## 第2章 腸管凝集性大腸菌の O:H 抗原と薬剤耐性状況の確認および分子疫学解析 による検討

### 第1節 緒言

EAEC の O 抗原は多様性を有することが知られ、近年海外では O1 から O181 までの O 血清を用いた調査が行われている。しかしながら 2004 年のブラジルでは O86:H11 が、2012 年のマリでは O99:H33 が最も多い血清型であるなど、調査ごとに有意となる O 血清型は異なっていた (17, 57)。2011 年にドイツを中心として発生した死者 47 名の大規模食中毒は、EAEC と STEC のハイブリッド型である大腸菌 O104:H4 が原因微生物として報告されており、さらに本菌は基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL) 遺伝子も保有していたことが知られている (15, 16)。O104 の抗原型については、下痢原性大腸菌のうち EAEC の調査において複数報告があるが STEC では稀であり、実際、このハイブリッド型強毒株の発生は EAEC がベロ毒素産生性 (*stx*) を獲得したことに起因していると報告されていることから流行する EAEC の O 抗原型の把握は重要である (2, 12, 17)。国内の調査においては、国内で一般的に市販される 43 種類の O 血清に該当しない、いわゆる OUT の EAEC が多く報告されている。本研究の第一章においても EAEC の 75 % が OUT となるなど、網羅的に O 抗原を調査した報告は少なく、国内に分布する EAEC の O 抗原は十分に把握されていない。

EAEC の薬剤耐性率や ESBL 遺伝子保有率は、他の下痢原性大腸菌に比べ高い値を示すことが海外の調査により示されている (12, 23, 24)。ESBL 遺伝子が関与する第 3 世代セファロスポリン耐性については、2006 年に食品安全委員会がヒトの医療上きわめて高度に重要とランク付けしている (22)。さらに、2015 年に世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は「薬剤耐性対策グローバル・アクションプラン」を示したことで、世界的にも薬剤耐性が注目されてい

る(20)。2016年には厚生労働省が「薬剤耐性 (Antimicrobial resistance, AMR) 対策アクションプラン」を発表し、国内においても薬剤耐性や、耐性菌が動物から人へ伝播する可能性が懸念されることから One Health 概念への関心が高まった(21)。AMR 対策アクションプランの冒頭部分である「我が国における薬剤耐性の現状とその課題」においても代表的なものとして大腸菌の第3世代セファロスポリン耐性状況が示めされている。しかしながら、第一章の調査から有症者のみならず健康者からも一定の割合で分離される EAEC の薬剤耐性状況についての報告は少ない。

そこで第二章では、OUT 株の EAEC について O 抗原型の特定を行うことで EAEC の O:H 型の流行状況や病原性、および第3世代セファロスポリンを含む12種類の薬剤に対する薬剤感受性状況について調査を行うとともに、分子疫学解析による検討を行った。



## 第2節 材料および方法

### 2-1 供試菌株

前章で使用した EAEC 32 株に 2013 年から 2014 年に分離された 8 株を追加した、EAEC 40 株を供試菌株とした。40 株のうち 23 株は健康者の検体から、17 株は EAEC が原因微生物であると特定されないが下痢等の消化器症状を示す有症者の検体から分離された株であった。分離同定は第一章で示した方法（図 1）に準拠して実施した。

### 2-2 O 抗原の特定

病原大腸菌免疫血清（デンカ、東京、日本）の 43 種類の O 血清を用いてスライド凝集法により O 血清型の特定を行った。O 血清型別不能であった株については E. coli O-genotyping PCR (ECOG-PCR)（宮崎大学、宮崎、日本）を用いて 22 種類の multiplex PCR を実施し、遺伝子検査による O 抗原型（Og）の特定を行った(58)。各菌株の DNA は、QIAamp DNA Stool Mini Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて付属の説明書に準拠し抽出を行った。

### 2-3 H 抗原の特定

Prager ら(45)の示す 2 セットのプライマーと制限酵素（*RsaI*, *CfoI*）を使用した PCR-RFLP 法を実施し H 抗原型の特定を行った。PCR サンプルは 2-2 で抽出した DNA を用いた。

### 2-4 細胞付着性試験

HEp-2 細胞を用いて UTH 法により細胞付着性試験を実施し、付着形態が AA を示す株の確認を行った。また、付着が認められなかった株は NA (non adherent)

と判定した(47)。

#### 2-5 バイオフィルム形成試験

細胞付着性との関連性が示されているバイオフィルム形成試験を Albert らの方法に準拠し実施した(2, 59)。すなわち DHL 寒天培地で一晚培養後に形成されたコロニーを 5mL のミュラーヒントン液体培地（関東化学、東京、日本）に接種し、37℃ で 20 時間、80rpm で振盪培養後に培養液表面部分管壁のバイオフィルム形成を確認し、形成されたバイオフィルムの厚さにより強陽性（++）、陽性（+）に評価し、形成が認められない場合は陰性（-）と判定した。

#### 2-6 薬剤感受性試験

薬剤感受性検査は Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) の M100-S25 に準拠し、BD センシ・ディスク（日本 BD、東京、日本）を用いてディスク拡散法により実施した(60)。供試薬剤は、アンピシリン(ampicillin, ABPC)、セフトキシム (Cefotaxime, CTX)、ST 合剤 (sulfamethoxazole-trimethoprim, SXT)、テトラサイクリン(tetracycline, TC)、ストレプトマイシン(streptomycin, SM)、ゲンタマイシン (gentamicin, GM)、カナマイシン (kanamycin, KM)、シプロフロキサシン (ciprofloxacin, CPFX)、ノルフロキサシン (norfloxacin, NFLX)、ナリジクス酸 (nalidixic acid, NA)、クロラムフェニコール (chloramphenicol, CP)、ホスホマイシン (fosfomycin, FOM) の 12 種類とした。

#### 2-7 ESBL 遺伝子の検出および同定

第 3 世代セファロスポリンである CTX に耐性を示した株については、ESBL の

遺伝子として *bla*<sub>CTX</sub>、*bla*<sub>TEM</sub> および *bla*<sub>SHV</sub> の検出を PCR 法にて行った (61, 62)。各菌株の DNA は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて付属の説明書に準拠し抽出を行った。さらに各遺伝子が陽性であった株については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定後、遺伝子のアミノ酸配列が示されるウェブサイト (<http://www.lahey.org/Studies/>) によりバリエーションの決定を行うことで、再度 ESBL 遺伝子であるか確認を行った。

#### 2-8 マルチローカスシーケンスタイピング

ABPC, SXT および TC の 3 薬剤全てに耐性を示した株については、マルチローカスシーケンスタイピング (MLST) を Wirth らの方法を用いて実施した (63)。すなわち、ハウスキーピング遺伝子である *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* および *recA* を PCR 法により増幅後、ダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、MLST のデータベース (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) からそれぞれの遺伝子の配列の差異をパターン化 (alleles) した後、7 つの alleles の組み合わせからシーケンスタイプ (ST)、および類似する複数の ST グループの総称である STcomplex (STcplx) を決定した。

### 第3節 実験結果

#### 3-1 O:H 抗原型

40 株のうち 12 株が血清による O 型別が可能であり、8 種類 (0126 が 3 株、0127 と 086 が 2 株、044, 055, 0111, 0125 および 0153 が 1 株) の O 血清型に分類された。OUT であった残り 28 株については、ECOG-PCR キットにより O 抗原遺伝子の検出を行い、24 株が 10 種類 (0g99, 0g131 および 0g176 が 5 株、0g130 と 0g92 が 2 株、0g6, 0g15, 0g65, 0g86 および 0g175 が 1 株) の O 抗原型に分類された (表 6)。遺伝子検査においても特定の O 抗原に分類不可能であった 4 株のうち 2 株は、複数の O 抗原の可能性を含むことからグループとして示されている 0gGP9 (0g17, 0g44, 0g73 または 0g106) に分類され、残り 2 株は遺伝子検査においては増幅バンドが確認されなかったことから O 抗原特定不可能 (0gUT) であった。

H 抗原の結果については、EAEC 40 株から H 抗原が 10 種類検出され、O 抗原の結果と合わせることで 20 種類の O:H の組合せが確認され、099:H10 および 0131:H27 が 5 株で最も多く、次いで 0176:H34 (4 株)、0126:H27 (3 株) であった。

#### 3-2 細胞付着性とバイオフィーム形成試験結果の比較

細胞付着性試験の結果、40 株のうち 20 株が AA を示した。バイオフィーム形成試験では強陽性 (++) を示した株が 20 株、陽性 (+) が 11 株、バイオフィームの形成を認めなかった株が 9 株認められた (図 4)。細胞付着性試験とバイオフィーム形成試験を比較した結果を表 7 に示した。

### 3-3 薬剤感受性試験と ESBL 遺伝子保有状況

40 株に対して 12 の薬剤を用いて薬剤感受性試験を行った。供試した 12 薬剤のうち 1 株以上に耐性を示した薬剤は 9 薬剤あり、耐性率は ABPC が最も高く 82.5 %、次いで SXT と TC が 52.5 %であった(表 8)。これら 3 薬剤全てに耐性であった株は 19 株確認された。また、CTX 耐性であった株は 3 株 (7.5 %) 認められ、それらの株について ESBL 遺伝子の検出を行った結果、3 株全てから *bla*<sub>CTX-M</sub> が、1 株から *bla*<sub>TEM</sub> が検出された。検出された各遺伝子についてシーケンス解析により各遺伝子のバリエントを確認した結果、*bla*<sub>TEM</sub> は *bla*<sub>TEM-1</sub> に分類されたことから ESBL 遺伝子ではないことが確認され、*bla*<sub>CTX-M</sub> は *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が 2 株、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> が 1 株に分類された。

### 3-4 マルチローカスシーケンスタイピング

3-3 から ABPC, SXT および TC の 3 薬剤に耐性であった 19 株について MLST を実施した結果、ST34 (STcplx 10) が 5 株、ST130 (STcplx 31) および ST5533 (STcplx 無し) が 4 株ずつ、ST10 (STcplx 10) が 3 株、ST31 (STcplx 31)、ST394 (STcplx 394) および ST3032 (STcplx 無し) が 1 株ずつ分類された。なお ST5533 は、ST10 とは *fumC* のみが異なる single locus variant (SLV) であることから、19 株のうち 12 株 (63.2 %) は ST10、または ST10 cplex や ST10 と SLV であるなど、ST10 と関連性のある ST であった (表 9)。

#### 第4節 考察

本研究において 0104:H4 の EAEC は検出されなかったものの、主に検出された O:H 抗原型 (099:H10, 0131:H27 および 0176:H34) の EAEC はいずれも食中毒原因微生物または散発下痢症患者からの分離報告がある。099:H10 などの H10 を示す EAEC については、Nataro らが OUT:H10 を病原性と関連している EAEC の O:H 型の 1 つであると示しており、実際、日本において OUT:H10 の EAEC による食中毒の発生報告がある (1, 64)。0131:H27 および 0176:H34 については、Nataro らの報告では示されていないが、海外において散発下痢症患者からの分離報告があることから、市内で流行していたこの 3 つの O:H が病原性を有する可能性が示唆された (65, 66)。また、本研究結果において同じ O:H 型であっても細胞付着性の有無に違いが認められたことから、O:H の組み合わせのみで病原性を判断することは困難であると考えられた。一方で、バイオフィーム形成試験において強陽性 (++) を示した株の 75.0 % が AA を示した。しかし、陽性 (+) を示した株で AA を示したのは 36.4 % であったことから、バイオフィーム形成試験結果については、その厚さにより段階的に判定を行うことで EAEC の細胞付着性、つまりは病原性の推定が可能であると考ええる。

ヒトから分離される EAEC の一部と国内農場、特に肉用鶏から分離される大腸菌の薬剤耐性パターンや ST は類似していることが示された。ESBL 遺伝子保有率については、2013 年の中国 (40.7 %) や 2014 年のエジプト (78.3 %) など海外の調査結果に比べ低いことが示唆された (12, 24)。しかしながら ABPC, SXT および TC の 3 薬剤については、海外の報告と同様に本研究においても高い耐性を示した (12, 49)。当該 3 薬剤 (ABPC, SXT および TC) については、JVARM において、国内農場、特に肉用鶏で用いられる主な抗菌薬であり、分離される大腸菌の耐性率が高いことも示されている (28)。MLST の結果については、海外の

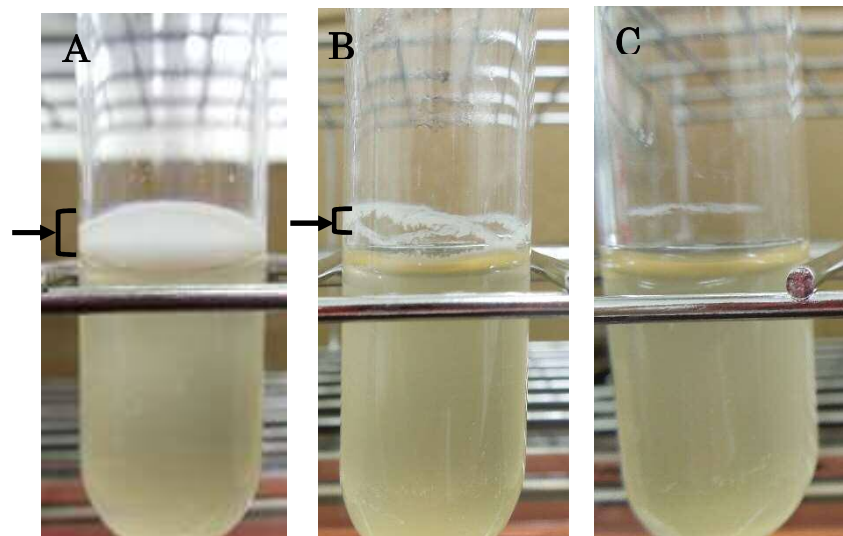
調査においても、EAEC の多くが ST10 または ST10 cplx であることが示されている (67, 68)。さらに国内の調査においても、比企らが肉用鶏から分離される大腸菌の多くは ST10 であったことを示していることなどから、ヒトから分離される EAEC のうち、それらの 3 薬剤に耐性を示す EAEC については農場に分布する大腸菌との関連性が示唆された (69)。

## 第 5 節 結語

2012 年から 2014 年に分離された EAEC の主な O:H の組合せは、099:H10, 0131:H27 および 0176:H34 であったが、いずれの O:H 型においても食中毒や散発下痢症等の患者からの分離報告があることから、症状の有無に関わらずヒトが保菌する EAEC においては病原性を有する可能性が示唆された。また O:H 型から細胞付着性を推定することは困難であるが、段階的に評価を行ったバイオフィルム形成試験結果は有用であると考えられた。薬剤耐性試験で高い耐性率を示した ABPC, SXT および TC は、農場、特に肉用鶏で使用される主な抗菌薬であり、これら 3 薬剤全てに耐性を示した株の MLST から ST10 や ST10cplx などが複数検出されたことなどから、ヒトから分離される EAEC の一部においては、肉用鶏で分離される大腸菌との関連性が示唆された。



図 4. 腸管凝集性大腸菌のバイオフィーム形成試験結果



矢印はバイオフィームを指示、(A) 強陽性 (++)、(B) 陽性 (+) および (C) 陰性

表 6. 川崎市内で分離された腸管凝集性大腸菌 40 株の O:H 抗原型

O-serotyping/ genotyping	O-type	H type	No. of strains
O-serotyping ( <i>n</i> =12)	O44	H18	1
	O55	H21	1
	O86	H27	1
	O86	ND	1
	O111	H21	1
	O125	H8	1
	O126	H27	3
	O127	H21	2
	O153	H2	1
O-genotyping ( <i>n</i> =28)	Og6	H18	1
	Og15	H12	1
	Og65	H12	1
	Og86	H27	1
	Og92	H33	2
	Og99	H10	5
	Og130	H27	2
	Og131	H27	5
	Og175	H27	1
	Og176	H33	1
	Og176	H34	4
	OgGP9	H18	2
	OgUT	H10	1
	OgUT	H36	1

Og, O-genotype; OgGP9, OgGP9 represented O serogroups O17, O44, O73, and O106; OgUT, Og-untypable; ND, not detected.

表 7. 細胞付着性試験およびバイオフィルム形成試験の結果

Cell adhesion	No. of strains	Biofilm score		
		-	+	++
AA	20	1	4	15
NA	20	8	7	5
Total	40	9	11	20

AA: Aggregative adherence, NA: Non-adherent

表 8. EAEC40 株の薬剤感受性試験結果

Antimicrobial agent	No. (%) of resistance strains
Ampicillin	33 (82.5)
Sulfamethoxazole-trimethoprim	21 (52.5)
Tetracycline	21 (52.5)
Nalidixic acid	16 (40.0)
Streptomycin	14 (35.0)
Chloramphenicol	7 (17.5)
Cefotaxime	3 (7.5)
Gentamicin	2 (5.0)
Norfloxacin	1 (2.5)
Ciprofloxacin	0 (0)
Kanamycin	0 (0)
Fosfomicin	0 (0)
Imipenem	0 (0)
Meropenem	0 (0)

表 9. アンピシリン、ST 合剤およびテトラサイクリンの 3 薬剤全てに耐性を示した腸管凝集性大腸菌のシーケンス型(ST)と ST complex

ST complex	ST	No. of strains
10	34	5
	10	3
31	130	4
	31	1
394	394	1
none	5533*	4
	3032	1

\*ST10 と *fumC* のみが異なる single locus variant

### 第3章 各下痢原性大腸菌の薬剤耐性状況と次世代シーケンサー等により検出されるインテグロン内部の薬剤耐性遺伝子の比較検討

#### 第1節 緒言

薬剤耐性に関与する因子として、インテグロンが知られている(29, 30)。インテグロンは、*intI*により薬剤耐性遺伝子を取り込み、強力なプロモーターによって取り込んだ遺伝子を発現させる(32)。それゆえ、インテグロンを保有する株は、インテグロンを保有しない株に比べ高い薬剤耐性を示し、また腸内細菌科細菌の多剤耐性に強く関与していることも知られている(33, 34)。インテグロンの構造は、5' 側保存領域 (5' -conserved segment, 5' -CS)、可動領域および3' 側保存領域 (3' -conserved segment, 3' -CS) の3つの領域からなり、*intI*は5' -CSに存在する(32)。*IntI*はその配列の違いにより *intI1* から *intI4* まで分類されるが、大腸菌からは主に *intI1* が検出される(32)。Liu らはインテグロンを保有する大腸菌が、インテグロンを保有しない大腸菌に比べ有意に高い割合で多剤耐性を示すと報告している(70)。さらに Phongpaichit らはインテグロンを保有する大腸菌の方がそうでない大腸菌に比べ有意に薬剤耐性数が高いことを示した(33)。すなわち、インテグロンは大腸菌の薬剤耐性において重要な役割を果たしていると考えられている。

下痢原性大腸菌におけるインテグロン保有状況やその可動領域に含まれる遺伝子カセットについて調査した報告は少ない。大腸菌については、韓国で行った調査において 14.5 %から *intI1* が検出され、インテグロン内部から主に *dfrA17-aadA5* の薬剤耐性遺伝子が検出されている(71)。下痢原性大腸菌については Shahcheraghi らがイランで分離される EPEC のインテグロン内部の遺伝子カセットを調査し、*aadA* と *dfrA* のみが検出されている(72)。さらに一部のインテグロンでは、その 3' -CS 部分に insertion sequences (IS) やトランスポゾ

ンが挿入されたことにより 3' -CS が欠損した不完全型インテグロンが存在する (29)。このような 3' -CS が欠損した不完全型のインテグロンにおいては PCR 法による可動領域の遺伝子増幅が困難であり、遺伝子増幅を認めないインテグロンについては可動領域の遺伝子カセットを不検出としている報告もある (35)。それゆえ、下痢原性大腸菌におけるインテグロンの保有状況に加え、保有するインテグロン内部の薬剤耐性遺伝子と薬剤耐性の表現型との関連性も不明瞭である。

そこで第三章では、下痢原性大腸菌の各分類について薬剤耐性状況の調査を行い、第二章では検討できなかった EAEC と他の下痢原性大腸菌の薬剤耐性率等について比較を行うとともに、3' -CS 部分が欠損した不完全型インテグロンを含むインテグロンの検出と可動領域部分に含まれる遺伝子カセットを確認することで下痢原性大腸菌が示す薬剤耐性との関連性について検討を行った。

## 第2節 材料および方法

### 2-1 供試菌株

2012年から2014年までに分離された下痢原性大腸菌162株を供試菌株とした(表10)。各下痢原性大腸菌の株数はEAECが40株、EPECが37株、STECが83株、腸管毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)が2株であった。なおSTECの83株のうち51株は市内医療機関で分離された株であり、残り32株は川崎市健康安全研究所で分離された株であった。なお、EAECの40株は第二章の供試菌株と同じ株を使用した。他の下痢原性大腸菌の分離についても第一章と同様の方法で分離し、STECおよびETECの同定には市販のプライマーセット(ELT-1/-2, EVC-1/-2; タカラバイオ、草津、日本)を使用したPCR法を添付の取扱説明書に準拠し実施した。

### 2-2 薬剤感受性試験

薬剤感受性検査はCLSIのM100-S25に準拠し、BD センシ・ディスク(日本BD、東京、日本)を用いてディスク拡散法により実施した(60)。供試薬剤は、第二章と同様の12薬剤(ABPC, CTX, SXT, TC, SM, GM, KM, CPMX, NFLX, NA, CPおよびFOM)に加えカルバペネム系抗菌薬であるイミペネム(imipenem, IMP)およびメロペネム(meropenem, MEPM)を加えた14薬剤とした。なおEAEC40株のカルバペネム系抗菌薬を除いた12薬剤の結果については第二章の結果を引用した。さらに、 $\beta$ -ラクタム系(ABPC, CTX, IMPおよびMEPM)、アミノグリコシド系(SM, KMおよびGM)、キノロン系(NA, CPMXおよびNFLX)、テトラサイクリン系(TC)、クロラムフェニコール系(CP)、およびST合剤(ST)の6系統に含まれる各薬剤のうち1薬剤以上に耐性を示す系統が3系統以上認められた場合を多剤耐性とした。



### 2-3 ESBL 遺伝子の検出および同定

第3世代セファロスポリンであるCTXに耐性を示した株については、ESBLの遺伝子として *bla*<sub>CTX</sub>、*bla*<sub>TEM</sub> および *bla*<sub>SHV</sub> の検出をPCR法にて行った(61, 62)。各菌株のDNAは、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて付属の説明書に準拠し抽出を行った。さらに各遺伝子が陽性であった株については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定後、各ESBL遺伝子分類のアミノ酸配列が示されるウェブサイト(<http://www.lahey.org/Studies/>)によりバリエーションの決定を行った。なお、EAEC 40 株については第二章の結果を引用した。

### 2-4 インテグロン保存領域に関する遺伝子の検出

全供試株についてインテグロンの5'-CSにある *intI1*、および3'-CSにある *sul1*、*qacEΔ1* の3つの遺伝子のをPCR法にて検出を行った(73)。大腸菌のDNAは、滅菌蒸留水 100 μL に菌体を懸濁後 100℃で5分間加熱し、遠心により得られた菌液の上清を使用した。なお *intI1* が陽性であった株をインテグロン陽性株とし、そのうち3'-CSにある2つの遺伝子 (*sul1*、*qacEΔ1*) がともに検出されないインテグロンを不完全型インテグロンとした。

### 2-5 サンガーシーケンス解析による遺伝子カセットの検出

インテグロン陽性であった株については、Karczmarczykらの示すプライマーを用いてインテグロンの稼働領域部分の増幅を行い(図5)、ダイレクトシーケンスにて配列を確認後、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 検索にて相同性の確認と ResFinder プラットフォーム

(<http://genomicepidemiology.org/>)により薬剤耐性遺伝子の特定を行った(73-75)。

## 2-6 次世代シーケンサーによる遺伝子カセットの検出および 3' -CS 部分の検討

2-5 において PCR の増幅を認めなかった株、すなわち不完全型のインテグロンであった株については、菌株から抽出した DNA を次世代シーケンサー(NGS)に供試し、全ゲノム解析により遺伝子カセットの検出を行った。DNA は Trypticase Soy Broth (日本 BD、東京、日本) で 15 時間培養した菌液を 70 °C、2 時間加熱することで抽出を行った。抽出した DNA を国立感染症研究所の病原体ゲノム解析センターに送付し NGS による解析の実施を依頼した。ライブラリーの調製は Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) により行い、Illumina NextSeq によりシーケンスを行った。データの解析と結果の共有は国立感染症研究所の病原体ゲノム解析センター黒田先生が開発した Genapid-J (<https://gph.niid.go.jp/genepid-j/>) により行った。

## 2-7 統計学的処理

各下痢原性大腸菌における *intI1* 保有の有無による各薬剤の耐性率の比較を Fisher の直接確率検定にて行い、 $P = 0.05$  (両側検定) を有意水準とした。

### 第3節 実験結果

#### 3-1 薬剤感受性試験およびESBL遺伝子の検出

下痢原性大腸菌 162 株の薬剤感受性試験を行った。供試した 14 薬剤のうち CPFX, FOM, IMP および MEPM は全ての株で感受性を示し、残りの 10 薬剤については 1 株以上に耐性株が認められた (表 11)。そのうち ABPC は 50 株 (30.9 %) で最も多く耐性が認められ、次いで TC が 39 株 (24.1 %)、SXT が 28 株 (17.3 %) であった。CTX は EAEC の 3 株以外では EPEC の 2 株で耐性が認められ、うち 1 株から *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が検出された。各下痢原性大腸菌の薬剤耐性率等の比較から、EAEC は 10 薬剤のうち 7 薬剤で他の下痢原性大腸菌より高い耐性率を示し、さらに多剤耐性率も他の下痢原性大腸菌に比べ高値を示した。

#### 3-2 *intI1*、*sul1* および *qacEΔ1* 遺伝子保有状況

162 株のうち 27 株で *intI1*、*sul1* および *qacEΔ1* のうち 1 つ以上の遺伝子が検出された。そのうち 13 株は 3 つの遺伝子が全て検出され、2 株は *intI1* および *qacEΔ1* が検出されたが、12 株は *intI1* のみで不完全型のインテグロンとして検出された。各下痢原性大腸菌のインテグロン保有率 (*intI1* 陽性率) は EAEC が最も高く 50.0 %、次いで EPEC が 13.5 %、STEC が 2.4 % であり ETEC は不検出であった (表 12)。

#### 3-3 各下痢原性大腸菌のインテグロン保有状況と薬剤耐性率との比較

各下痢原性大腸菌のインテグロン保有状況と薬剤耐性率について比較した結果、下痢原性大腸菌においては 7 薬剤 (ABPC, SXT, TC, NA, SM, CP および GM)、EAEC においては 5 薬剤 (ABPC, SXT, TC, NA および SM) でインテグロン保有株がインテグロン非保有株に比べて有意に高い耐性率を示した (図 6、表 13)。ま

た、各下痢原性大腸菌におけるインテグロン保有状況と耐性を示した薬剤数を確認すると、最も株数の多い耐性薬剤数はインテグロン非保有株では耐性薬剤数は0（全て感受性）であったのに対し、インテグロン保有株は不完全型であっても4～5薬剤と高値を示していた（表14）。

### 3-4 インテグロン内部に含まれる薬剤耐性遺伝子および不完全型インテグロンの3'-CS部分の構造解析

インテグロンの保有が認められた27株のうち *intI1* のみが陽性であった12株についてはNGSに供試し、残り15株はサンガーシーケンス法によりインテグロン内部の薬剤耐性遺伝子の確認を行った。27株から9種類の遺伝子が検出され、それぞれトリメトプリム耐性 (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA12*, *dfrA14* および *dfrA17*)、アミノグリコシド耐性 (*aadA1*, *aadA2* および *aadA5*)、またはβ-ラクタム系抗菌薬耐性 (*bla<sub>OXA-1</sub>*) に関与する遺伝子であった（図7 A, B）。さらに、NGSに供試した12株の不完全型インテグロンの3'-CS部分について確認を行うと、いずれも *su11* や *qacEΔ1* は検出されず、IS26 (6株)、IS1 (5株)、または transposon Tn3 (1株) が検出された（図7 B）。

#### 第4節 考察

本研究においても EAEC の薬剤耐性率や ESBL 遺伝子保有率は他の下痢原性大腸菌に比べ高い値であり海外の研究報告と同様の結果を得ることができたが、EAEC の ESBL 遺伝子保有率については海外の結果（40.7-78.3 %）に比べ低い値であった(12, 24)。さらに本研究により、図 6 から下痢原性大腸菌においてもインテグロン保有株の方が薬剤耐性数が高く、供試した 14 薬剤のうち 7 薬剤で有意に高い耐性率を示した。海外で大腸菌を対象に行われた調査においても有意に高い耐性を示す薬剤として ABPC, SXT, TC および SM などが示されており本研究と同様であったと考えられる(33, 70, 71)。しかしながら、インテグロン保有率は下痢原性大腸菌ごとに差が認められ、特に EAEC の保有率は高く、さらに EAEC はインテグロン保有の有無により ABPC, SXT および TC を含む 5 薬剤において有意に高い耐性率を示した。第二章においても EAEC と国内農場との関連性を示唆する結果が示されたが、本研究により EAEC のうち特にインテグロンを保有する株について関連性が強いと考えられた(28, 69)。

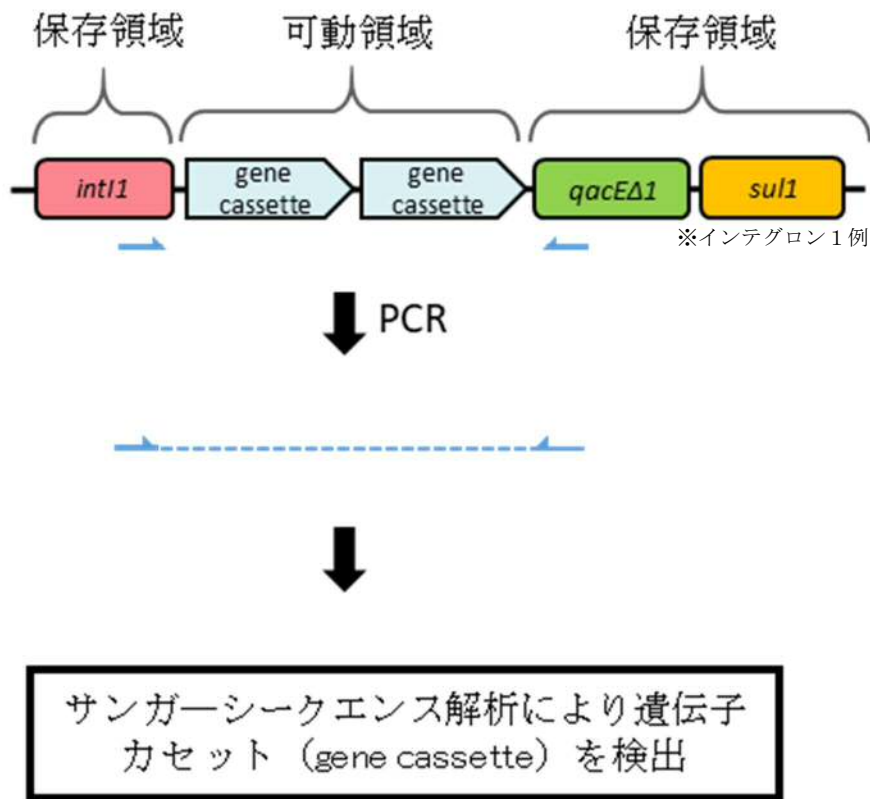
インテグロンの可動領域に含まれる遺伝子カセットは、主にアミノグリコシド耐性遺伝子 (*aadA*) とトリメトプリム耐性遺伝子 (*dfrA*) の 2 種類のみであり多様性が低いことが示唆された。大腸菌を対象としたインテグロンの遺伝子カセットの調査においても主にこれらの遺伝子が検出されているが、下痢原性大腸菌においても同様であることが確認された(70, 71, 73)。また、3' -CS が欠損しているか否かに関わらずインテグロンがその可動領域に取り込む遺伝子カセットに大きな差は認められなかった。しかしながら、図 7 から実際の薬剤耐性パターンと検出された遺伝子カセットでは多様性に差があり、インテグロンがその可動領域に取り込んだ薬剤耐性遺伝子が薬剤耐性の表現型として与える影響は限局的であると考えられた。

NGS を用いた不完全型インテグロンの確認は有用であった。NGS により解析を行った不完全型インテグロンの全ての株から遺伝子カセットを検出することが可能であり、さらに 3' -CS 部分に IS や transposon Tn3 が存在していることが確認された。Partridge らの調査においても 3' -CS 欠損型のインテグロンは IS6100, IS1 および IS26 の挿入により生じたと報告しており (29)、本研究においては IS1, IS26 および transposon Tn3 の挿入により欠損が生じたものと考えられた。さらに、本研究において最も多く検出された遺伝子カセットは *dfrA14* と *dfrA17* の単体であったが、インテグロンのデータベースである Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>) において、それらの遺伝子カセットの登録は少ない。*dfrA14* や *dfrA17* については主に NGS の解析により不完全型インテグロンから検出された配列であったことから、特定が困難な遺伝子カセットであると考えられた。

## 第 5 節 結語

本研究により、下痢原性大腸菌においてもインテグロン保有株の方が薬剤耐性率が高いことが示された。下痢原性大腸菌の各分類の薬剤耐性率の比較により、EAEC は他の分類に比べ多剤耐性率や ESBL 遺伝子保有率が高いことが確認された。さらに、インテグロンを保有する EAEC は ABPC, SXT および TC を含む 5 薬剤で有意に高い耐性を示したことから、国内農場、特に肉用鶏から分離される大腸菌との関連性が示唆された。さらにインテグロン保有株は、3' -CS が欠損した不完全型インテグロンであっても、その可動領域に含まれる薬剤耐性遺伝子の種類に大きな相違はないが、いずれも多様性が低く、またその薬剤耐性パターンからインテグロンが取り込んだ薬剤耐性遺伝子による表現型への影響は限局的であると考えられた。

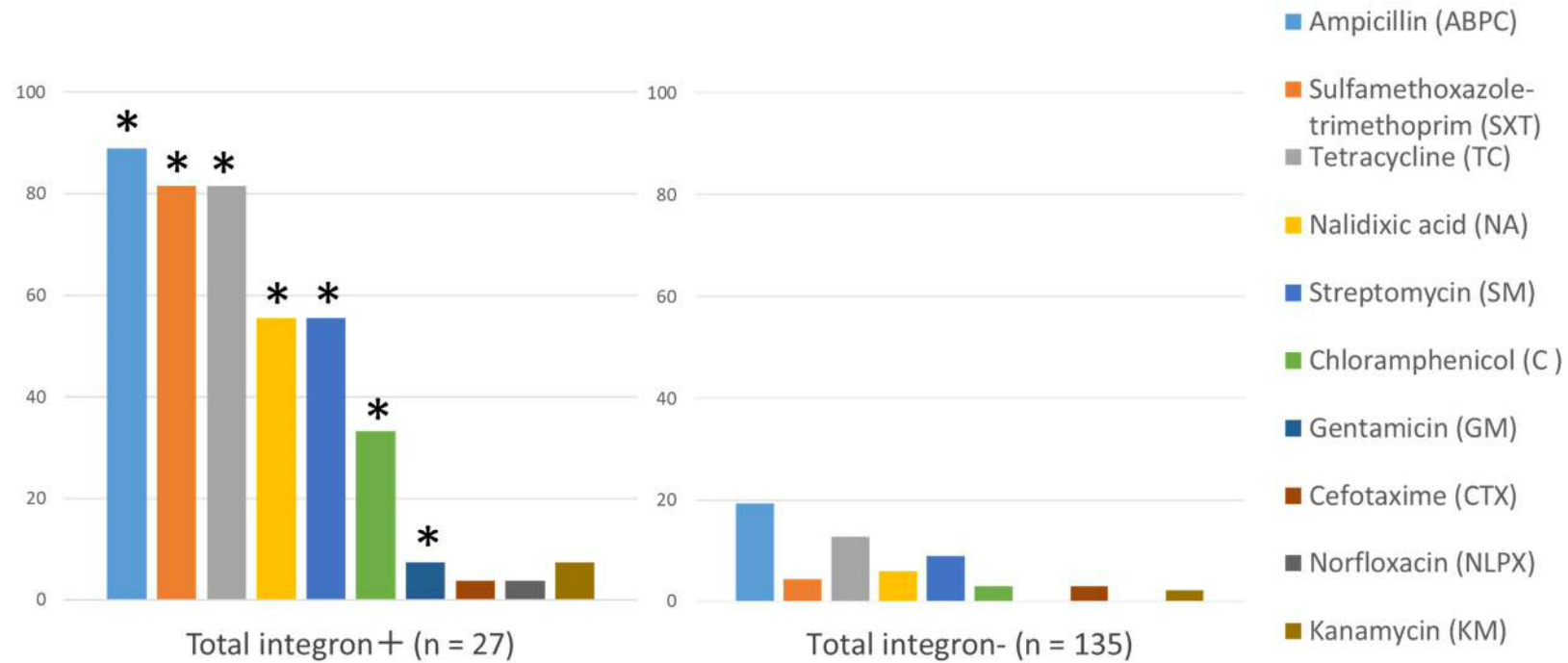
図 5. サンガーシーケンス解析によるインテグロン可動領域の遺伝子カセット  
ト検出のフローチャート



青矢印はプライマー、点線は増幅された遺伝子を示す（増幅サイズ(bp)は可動領域内の遺伝子カセットの数と種類により異なる）



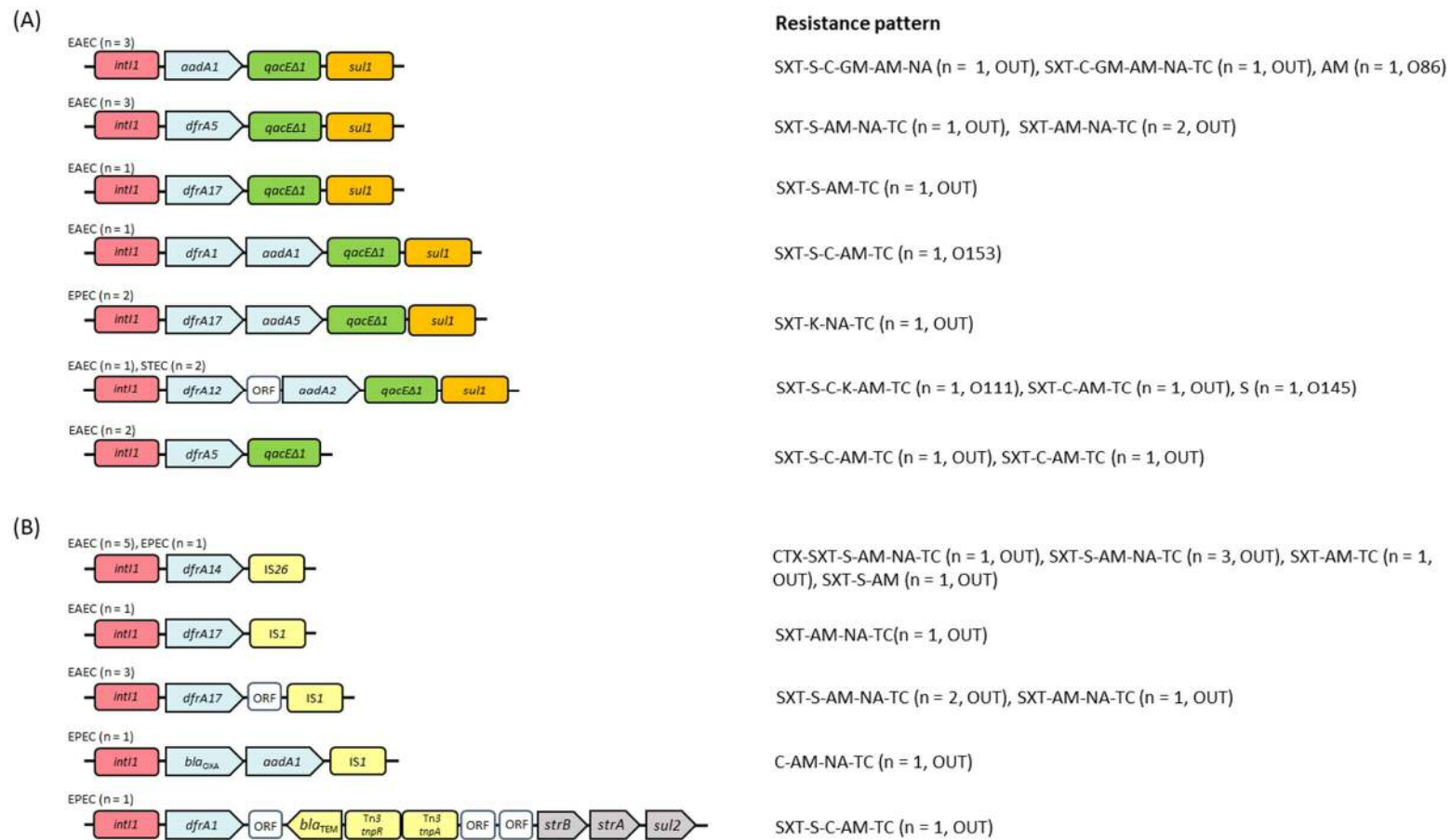
図 6. 下痢原性大腸菌 162 株のインテグロン保有株と非保有株の薬剤耐性率の比較



\*は Fisher の直接確率検定にて有意差が認められた薬剤 (P < 0.05)

(左) インテグロン陽性株 (27 株) の薬剤耐性率、(右) インテグロン陰性株 (135 株) の薬剤耐性率

図 7. 2012 年から 2014 年に分離されたヒト由来の各下痢原性大腸菌から分離されたインテグロン可動領域に含まれる薬剤耐性遺伝子と薬剤耐性状況



EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; STEC, Shiga toxin-producing *E. coli*; CTX, cefotaxime; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; S, streptomycin; C, chloramphenicol; K, kanamycin; AM, ampicillin; NA, nalidixic acid; TC, tetracycline.

(A) PCR 産物のシーケンス解析により特定した完全型インテグロン内部の遺伝子カセット配列と対応する薬剤耐性パターン、(B) 次世代シーケンサーを用いた解析により特定した不完全型インテグロン内部の遺伝子カセット配列と対応する薬剤耐性パターン

表 10. 2012 年から 2014 年にヒトから分離された下痢原性大腸菌 162 株

Pathogenic categories	No. of strains	Origin	O-serogroup	Isolation Year
EAEC	40	Symptomatic patient (n = 17)	86 (n = 1), 111 (n = 1), 125 (n = 1), 126 (n = 1), 127 (n = 2), 153 (n = 1), OUT (n = 10)	2012–2014
		Asymptomatic carrier (n = 23)	44 (n = 1), 55 (n = 1), 86 (n = 1), 126 (n = 2), OUT (n = 18)	2012–2014
EPEC	37	Symptomatic patient (n = 12)	55 (n = 1), 114 (n = 1), 164 (n = 1), OUT (n = 9)	2012–2014
		Asymptomatic carrier (n = 25)	15 (n = 1), 63 (n = 1), 124 (n = 2), 125 (n = 1), 145 (n = 1), 167 (n = 1), OUT (n = 18)	2013–2014
STEC	83	Symptomatic patient (n = 68)	26 (n = 3), 103 (n = 3), 111 (n = 4), 145 (n = 2), 157 (n = 54), 165 (n = 1), 186 (n = 1)	2012–2014
		Asymptomatic carrier (n = 15)	26 (n = 3), 157 (n = 12)	2012–2014
ETEC	2	Asymptomatic carrier (n = 2)	148 (n = 1), 169 (n = 1)	2013–2014

EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; STEC, shiga toxin-producing *Escherichia coli*; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; OUT, O-untypable.

表 11. 2012 年から 2014 年に分離されたヒト由来の各下痢原性大腸菌 162 株の各

種薬剤に対する耐性率と多剤耐性率

Antibiotics	EAEC (n = 40)	EPEC (n = 37)	STEC (n = 83)	ETEC (n = 2)	Total (DEC) (n = 162)
Ampicillin	33 (82.5)	7 (18.9)	9 (10.8)	1 (50.0)	50 (30.9)
Sulfamethoxazole-trimethoprim	21 (52.5)	4 (10.8)	2 (2.4)	1 (50)	28 (17.3)
Tetracycline	21 (52.5)	7 (18.9)	10 (12.0)	1 (50.0)	39 (24.1)
Nalidixic acid	16 (40.0)	5 (13.5)	-	2 (100)	23 (14.2)
Streptomycin	14 (35.5)	4 (10.8)	8 (9.6)	1 (50.0)	27 (16.7)
Chloramphenicol	7 (17.5)	4 (10.8)	2 (2.4)	-	13 (8.0)
Gentamicin	2 (5.0)	-	-	-	2 (1.2)
Cefotaxime	3 (7.5)	2 (5.4)	-	-	5 (3.1)
Norfloxacin	1 (2.5)	-	-	-	1 (0.6)
Kanamycin	-	2 (5.4)	3 (3.6)	-	5 (3.1)
Ciprofloxacin, fosfomycin, imipenem, or meropenem	-	-	-	-	-
Phenotype of multidrug resistance	21 (52.5)	7 (18.9)	3 (3.6)	1 (50.0)	32 (19.8)

EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli* ; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli* ; STEC, shiga toxin-producing *Escherichia coli* ; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli* ; DEC, diarrheagenic *Escherichia coli* .

表 12. 2012 年から 2014 年に分離されたヒト由来の各下痢原性大腸菌 162 株の  
インテグロン保有状況（％）と各遺伝子検査結果

Detected genes	EAEC (n = 40)	EPEC (n = 37)	STEC (n = 83)	ETEC (n = 2)	Total (DEC) (n = 162)
Integron positive†	20 (50.0)	5 (13.5)	2 (2.4)	0 (0)	27 (16.7)
<i>intI1</i> + <i>qacEΔ1</i> + <i>sulI</i>	9	2	2	0	13
<i>intI1</i> + <i>qacEΔ1</i>	2	0	0	0	2
only <i>intI1</i>	9	3	0	0	12
β-lactamase genes					
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	2	1	0	0	3
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	1	0	0	0	1
<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1	1	0	0	2

EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; STEC, shiga toxin-producing *Escherichia coli*; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; DEC, diarrheagenic *Escherichia coli*.

†Defined as *intI1* positive strains.

表 13. 2012 年から 2014 年に分離されたヒト由来の各下痢原性大腸菌 162 株におけるインテグロン検出状況と各種薬剤に対する耐性率

Antibiotics	EAEC*		EPEC*		STEC*		ETEC*		Total (DEC)	
	Integron + (n = 20)	Integron - (n = 20)	Integron + (n = 5)	Integron - (n = 32)	Integron + (n = 2)	Integron - (n = 81)	Integron + (n = 0)	Integron - (n = 2)	Integron + (n = 27)	Integron - (n = 135)
Ampicillin	20 (100)‡	13 (65.0)	3 (60.0)‡	4 (12.5)	1 (50.0)	8 (9.9)	-	1 (50.0)	24 (88.9)§	26 (19.3)
Sulfamethoxazole-trimethoprim	18 (90.0)§	3 (15.0)	3 (60.0)‡	1 (3.1)	1 (50.0)‡	1 (1.2)	-	1 (50)	22 (81.5)§	6 (4.4)
Tetracycline	18 (90.0)§	3 (15.0)	3 (60.0)‡	4 (12.5)	1 (50.0)	9 (11.1)	-	1 (50.0)	22 (81.5)§	17 (12.6)
Nalidixic acid	13 (65.0)‡	3 (15.0)	2 (40.0)	3 (9.4)	-	-	-	2 (100)	15 (55.6)§	8 (5.9)
Streptomycin	11 (55.0)‡	3 (15.0)	2 (40.0)	2 (6.3)	2 (100)‡	6 (7.4)	-	1 (50.0)	15 (55.6)§	12 (8.9)
Chloramphenicol	6 (30.0)	1 (5.0)	2 (40.0)	2 (6.3)	1 (50.0)‡	1 (1.2)	-	-	9 (33.3)§	4 (3.0)
Gentamicin	2 (9.52)	-	-	-	-	-	-	-	2 (7.4)‡	-
Cefotaxime	1 (10.0)	2 (10.0)	-	2 (6.3)	-	-	-	-	1 (3.7)	4 (3.0)
Norfloxacin	1 (5.0)	-	-	-	-	-	-	-	1 (3.7)	-
Kanamycin	-	-	1 (20.0)	1 (3.1)	1 (50.0)	2 (2.5)	-	-	2 (7.4)	3 (2.2)
Phenotype of multidrug resistance†	19 (95.0)‡	2 (10.0)	4 (80.0)‡	3 (9.4)	1 (50.0)	2 (2.5)	-	1 (50.0)	24 (88.9)‡	8 (5.9)

EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; STEC, shiga toxin-producing *Escherichia coli*; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; DEC, diarrheagenic *Escherichia coli*.

†Defined as resistance to three or more classes of antimicrobials.

‡Denotes significantly higher rate of resistance to antibiotics for integron-positive isolates compared with integron-negative isolates ( $p < 0.05$ )

§Denotes significantly higher rate of resistance to antibiotics for integron-positive isolates compared with integron-negative isolates ( $p < 0.001$ )

表 14. 2012 年から 2014 年に分離されたヒト由来の各下痢原性大腸菌の薬剤耐性数とインテグロン保有状況

Presence of integrons	Intact/truncated integron and pathotype	No. of strains	Number (%) of antibiotics to which each strain showed resistance <sup>†</sup>							
			None	One	Two	Three	Four	Five	Six	
Strains with integrons	Intact integron									
	EAEC*	11	0	1	0	0	5	3	2	
	EPEC*	2	0	0	0	0	1	0	1	
	STEC*	2	0	1	0	0	0	0	1	
	ETEC*	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Subtotal	15	1 (7%)	2 (13%)	0	0	6 (40%)	3 (20%)	3 (20%)	
	Truncated integron									
	EAEC	9	0	0	0	1	2	5	1	
	EPEC	3	0	0	0	1	1	1	0	
	STEC	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Subtotal	12	0	0	0	2 (16.7)	3 (25.0)	6 (50.0)	1 (8.3)	
	Strains without integrons	EAEC	20	6	6	5	1	1	1	0
		EPEC	32	25	2	2	1	1	0	1
		STEC	81	66	6	7	1	1	0	0
ETEC		2	0	1	0	0	0	1	0	
Subtotal		135	97 (71.6)	15 (11.1)	14 (10.4)	3 (2.2)	3 (2.2)	2 (1.5)	1 (0.7)	
Total		162	98 (60.5)	17 (10.5)	14 (8.6)	5 (3.1)	12 (7.4)	11 (6.8)	5 (3.1)	

EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; STEC, shiga toxin-producing *Escherichia coli*; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*.

<sup>†</sup>A total of 14 antimicrobials were tested (ampicillin, sulfamethoxazole-trimethoprim, tetracycline, nalidixic acid, streptomycin, chloramphenicol, gentamicin, cefotaxime, norfloxacin, kanamycin, ciprofloxacin, fosfomycin, imipenem, and meropenem).



## 結論

本研究では我が国においてヒトから分離される EAEC と EPEC の分離状況や、各下痢原性大腸菌の薬剤耐性率を明らかにし、さらにインテグロンが薬剤耐性に与える影響について調べた。

まず第一章では、2012 年から 2013 年までに搬入されたヒト由来便検体を健康者または本菌が原因とは特定されていない有症者に分類し、EAEC および EPEC の分離率や病原性等について調査を行った。第二章では EAEC 40 株を供試菌株として、O:H 型別の特定、薬剤耐性状況の確認と MLST による分子疫学解析を実施した。第三章においては、下痢原性大腸菌の薬剤耐性状況と保有するインテグロン、およびそれに含まれる薬剤耐性遺伝子について検討した。

以上の検討結果から、1) EAEC および EPEC のヒトからの分離率はいずれも同程度であるが EAEC の方が病原性を有する可能性が高く、健康者からの分離率は他の下痢原性大腸菌に比べ高い、2) EAEC については薬剤耐性率が他の下痢原性大腸菌に比べ高く、さらに EAEC の一部は国内肉用鶏から分離される大腸菌に由来する可能性があり、3) 下痢原性大腸菌の薬剤耐性についてはインテグロン保有株の方が有意に高いが、インテグロンが内部に取り込んだ薬剤耐性遺伝子による影響は限局的であることが示唆された。従って、本研究は我が国において、ヒトから分離される下痢原性大腸菌のうち極めて知見が少なかった EAEC および EPEC の流行状況について明らかにするのみならず、EAEC が病原性を有する可能性についても示した。また同時に、EAEC と国内肉用鶏から分離される大腸菌との関連性や、下痢原性大腸菌の薬剤耐性状況およびインテグロンの薬剤耐性への影響についても示し、今後の地方衛生研究所において食中毒等の検査結果を解釈する際や、我が国においても対策が求められている薬剤耐性菌について、その解明の一助となりうる重要な研究であったと考える。

## 謝辞

本研究の遂行とまとめにあたり終始懇切な御指導御鞭撻を賜り、かつ本論文の校閲の労をとっていただいた麻布大学 阪口雅弘教授に深甚の謝意を表します。

また、始終御指導と御激励を賜った国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター第四室室長 村上光一先生、並びに川崎市健康安全研究所 岡部信彦所長に心から感謝致します。

なお、本研究の遂行に当り御指導御便宜を賜った、高崎健康福祉大学 石岡大成准教授、パース大学 木村博一教授、国立感染症研究所 黒田誠先生 砂川富正先生、麻布大学 村上賢教授、永井誠教授、加藤行男准教授、川崎市保健所 松尾千秋様、川崎市健康安全研究所 三崎貴子部長、小嶋由香課長補佐および同僚諸氏の皆様に深謝致します。

本論文は以下に示す報告を主体にしてまとめたものである。

#### 基礎となる学術論文

- (1) 窪村亜希子, 小嶋由香, 岡部信彦. 2015. 川崎市における腸管病原性大腸菌及び腸管凝集性大腸菌の分離状況と細胞付着性試験等による病原性の検討. 感染症学雑誌 89: 37-45 (第一章)
- (2) Kubomura A, Misaki T, Homma S, Matsuo C, Okabe N. 2017. Phenotypic and molecular characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated in Kawasaki, Japan. Jpn J Infect Dis 70: 507-12 (第二章)
- (3) Kubomura A, Sekizuka T, Onozuka D, Murakami K, Kimura H, Sakaguchi M, Oishi K, Hirai S, Kuroda M, Okabe N. Truncated Class 1 Integron Gene Cassette Arrays Contribute to Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli*. BioMed Research International 2020 (第三章)

## 参考文献

1. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 142-201
2. 仲西寿男, 丸山務. 食品感染症と食品微生物. 中央法規出版; 2009. p.250-305.
3. Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juárez A, Bernardez MI, González EA. 2006. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology* 9: 103-10
4. Jenkins C, Tembo M, Chart H, Cheasty T, Willshaw GA, Phillips AD, Tompkins D, Smith H. 2006. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1493-7
5. Levine MM, Edelman R. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews* 6: 31-51
6. Afset JE, Bergh K, Bevanger L. 2003. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* 52: 1015-9
7. Franzolin MR, Alves RCB, Keller R, Gomes TAT, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 359-63
8. Cravioto A, Gross R, Scotland S, Rowe B. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology* 3: 95-9
9. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Disease Journal* 6: 829-31
10. Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. 2008. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infection and Immunity* 76: 3281-92
11. Toval F, Kohler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, Schmidt MA, Karch H, Bielaszewska M, Dobrindt U. 2014. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 407-18
12. Chen Y, Chen X, Zheng S, Yu F, Kong H, Yang Q, Cui D, Chen N, Lou B, Li X. 2014.

- Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. *Clinical Microbiology and Infection* 20: 52-8
13. Mathewson JJ, Jiang ZD, Zumla A, Chintu C, Luo N, Calamari SR, Genta RM, Steephen A, Schwartz P, DuPont HL. 1995. HEP-2 cell-adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodeficiency virus-associated diarrhea. *Journal of Infectious Diseases* 171: 1636-9
  14. Adachi JA, Jiang Z-D, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, Steffen R, Ericsson CD, DuPont HL. 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clinical Infectious Diseases* 32: 1706-9
  15. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin CS, Iliopoulos D, Klammer A, Peluso P, Lee L, Kislyuk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyert SR, Frimodt-Moller J, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE, Waldor MK. 2011. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *The New England Journal of Medicine* 365: 709-17
  16. Rohde H, Qin J, Cui Y, Li D, Loman NJ, Hentschke M, Chen W, Pu F, Peng Y, Li J, Xi F, Li S, Li Y, Zhang Z, Yang X, Zhao M, Wang P, Guan Y, Cen Z, Zhao X, Christner M, Kobbe R, Loos S, Oh J, Yang L, Danchin A, Gao GF, Song Y, Li Y, Yang H, Wang J, Xu J, Pallen MJ, Wang J, Aepfelbacher M, Yang R, Consortium EcOHGAC-S. 2011. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *The New England Journal of Medicine* 365: 718-24
  17. Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, Persson S, Simon J, Kotloff KL, Levine MM, Sow S, Tamboura B, Toure A, Malle D, Panchalingam S, Krogfelt KA, Nataro JP. 2012. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *Journal of Infectious Diseases* 205: 431-44
  18. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T. 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2546-50
  19. Shin J, Oh SS, Oh KH, Park JH, Jang EJ, Chung GT, Yoo CK, Bae GR, Cho SH. 2015. An Outbreak of Foodborne Illness Caused by Enteroaggregative *Escherichia coli* in a High School in South Korea. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 68: 514-9
  20. Organization WH. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance <https://www.who.int/>.
  21. 厚生労働省. 2016. 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン <https://www.mhlw.go.jp>.

22. 食品安全委員会. 2006. 食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについて <http://www.fsc.go.jp>.
23. Okhuysen PC, Dupont HL. 2010. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *Journal of Infectious Diseases* 202: 503-5
24. Ali MM, Ahmed SF, Klena JD, Mohamed ZK, Moussa TA, Ghenghesh KS. 2014. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. *Journal of Infection in Developing Countries* 8: 589-96
25. 国立感染症研究所. 2012. 下痢原性大腸菌 2011 年現在. 病原微生物検出情報
26. Morikane K, Honda H, Yamagishi T, Suzuki S, Aminaka M. 2014. Factors Associated with Surgical Site Infection in Colorectal Surgery: The Japan Nosocomial Infections Surveillance 1. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 35: 660-6
27. 厚生労働省. Accessed November 16, 2019. 院内感染対策サーベイランス事業 <https://janis.mhlw.go.jp/>.
28. 農林水産省. 2016. A Report on the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System: 2012 to 2013 <http://www.fsc.go.jp>.
29. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 757-84
30. Betteridge T, Partridge SR, Iredell JR, Stokes H. 2011. Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 3939-43
31. Stokes H, Hall RM. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site - specific gene - integration functions: integrons. *Molecular Microbiology* 3: 1669-83
32. Carattoli A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research* 32: 243-59
33. Phongpaichit S, Wuttananupan K, Samasanti W. 2008. Class 1 integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* isolates from human stools. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 39: 279
34. Leverstein-van Hall MA, M. Blok HE, T. Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. 2003. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *Journal of Infectious Diseases* 187: 251-9
35. Kotlarska E, Łuczkiewicz A, Pisowacka M, Burzyński A. 2015. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two

- wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environmental Science and Pollution Research* 22: 2018-30
36. Rosa A, Mariano A, Pereira A, Tibana A, Gomes TAT, Andrade J. 1998. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 47: 781-90
37. Ratchtrachenchai O-A, Subpasu S, Hayashi H, Ba-Thein W. 2004. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *Journal of Medical Microbiology* 53: 237-43
38. Bhan M, Bhandari N, Sazawal S, Clemens J, Raj P, Levine MM, Kaper J. 1989. Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. *Bulletin of the World Health Organization* 67: 281
39. Ochoa TJ, Contreras CA. 2011. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases* 24: 478
40. 森屋一男, 角典子, 中尾昌弘, 山崎貢, 斉藤眞, 伊藤健一郎. 2000. 散発下痢症患者及び健康乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌(EPEC, EAaggEC)関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA* の保有状況について. *感染症学雑誌* 74: 134-42
41. 潤祐一, 成松浩志, 緒方喜久代, 竹田義弘, 帆足喜久雄, 橘宣祥. 1997. 大分県で発生した下痢原性大腸菌食中毒の疫学的、細菌学的検討. *日本食品微生物学雑誌* 14: 115-22
42. 紫竹美和子, 川瀬雅雄, 白幡祐子, 大野祥子, 不二崎順二, 寺尾通徳. 2001. 新潟県における下痢原性大腸菌の付着性因子保有状況. *新潟県保健環境科学研究所年報* 16: 71-5
43. 中嶋洋, 山崎貢, 狩屋英明, 大畠律子. 2005. 腸管凝集性大腸菌 (enteroaggregative *Escherichia coli* : EAaggEC) の海外旅行者集団下痢症からの分離. *感染症学雑誌* 79: 314-21
44. 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 斉藤志保子, 寺尾通徳. 2002. 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察. *感染症学雑誌* 76: 911-20
45. Prager R, Strutz U, Fruth A, Tschape H. 2003. Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus *fliC* polymorphisms. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 477-86
46. Haider K, Faruque SM, Albert MJ, Nahar S, Neogi PK, Hossain A. 1992. Comparison of a modified adherence assay with existing assay methods for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 1614-6
47. Vial PA, Mathewson JJ, DuPont HL, Guers L, Levine MM. 1990. Comparison of two assay methods for patterns of adherence to HEp-2 cells of *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 882-5

48. Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Dowton M, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. 2003. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5022-32
49. Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, Ecker L, Barletta F, Hall E, Cleary TG, Lanata CF. 2009. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 296-301
50. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. 2005. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 755-60
51. 加藤玲, 尾形和恵, 山田澄夫. 2002. 散発下痢症患者由来大腸菌の腸管病原性大腸菌 (EPEC) *eaeA* 遺伝子および腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) *aggR* 遺伝子保有状況とその病原性の評価. *感染症学雑誌* 76: 721-29
52. 成松浩志, 緒方喜久代, 鷺見悦子, 帆足喜久雄. 2004. 健康人由来大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況調査. *大分県年報* 30: 47-52
53. Blanco M, Padola NL, Kruger A, Sanz ME, Blanco JE, Gonzalez EA, Dahbi G, Mora A, Bernardez MI, Etcheverria AI, Arroyo GH, Lucchesi PM, Parma AE, Blanco J. 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology* 7: 269-76
54. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, Gonzalez EA, Bernardez MI, Blanco J. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). *Journal of Clinical Microbiology* 42: 645-51
55. Son WG, Graham TA, Gannon VP. 2002. Immunological characterization of *Escherichia coli* O157:H7 intimin gamma1. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 46-53
56. Moyenuddin M, Wachsmuth IK, Moseley SL, Bopp CA, Blake PA. 1989. Serotype, antimicrobial resistance, and adherence properties of *Escherichia coli* strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 2234-9
57. Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Irino K, Teixeira LM. 2009. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 58: 414-22



58. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, Pathogenic EcWGiJ. 2015. *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology* 53: 2427-32
59. Albert MJ, Qadri F, Haque A, Bhuiyan NA. 1993. Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1397-9
60. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute "M100-S24. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing". USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. p.41-47.
61. Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y. 2006. PCR classification of CTX-M-type  $\beta$ -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50: 791-5
62. Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiology Letters* 184: 53-6
63. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology* 60: 1136-51
64. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T. 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2546-50
65. Dallman TJ, Chattaway MA, Cowley LA, Doumith M, Tewolde R, Wooldridge DJ, Underwood A, Ready D, Wain J, Foster K, Grant KA, Jenkins C. 2014. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. *PLoS One* 9: e98103
66. Hien BT, Trang do T, Scheutz F, Cam PD, Molbak K, Dalsgaard A. 2007. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and other causes of childhood diarrhoea: a case-control study in children living in a wastewater-use area in Hanoi, Vietnam. *Journal of Medical Microbiology* 56: 1086-96
67. Chattaway MA, Jenkins C, Rajendram D, Cravioto A, Talukder KA, Dallman T, Underwood A, Platt S, Okeke IN, Wain J. 2014. Enteroaggregative *Escherichia coli* have evolved independently as distinct complexes within the *E. coli* population with varying ability to cause disease. *PLoS One* 9: e112967
68. Okeke IN, Wallace-Gadsden F, Simons HR, Matthews N, Labar AS, Hwang J, Wain

- J. 2010. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. *PLoS One* 5: e14093
69. Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H, Kojima A, Asai T. 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary Journal* 67: 14
  70. Liu LT, Wan LH, Song XH, Xiong Y, Jin SJ, Zhou LM. 2013. Relevance of class 1 integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in drug-resistant *Escherichia coli*. *Molecular Medicine Reports* 8: 1251-5
  71. Lee JC, Kang HY, Oh JY, Jeong JH, Kim J, Seol SY, Cho DT, Lee YC. 2006. Antimicrobial resistance and integrons found in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy humans. *Journal of Bacteriology and Virology* 36: 133-9
  72. Shahcheraghi F, Ghezelgeh FR, Nobari S, Torabi E, Mousavi SF, Aslani MM, Shahcheraghi F. 2014. Identification and characterization of class 1 integrons among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age. *Iranian Journal of Microbiology* 6: 156
  73. Karczmarczyk M, Abbott Y, Walsh C, Leonard N, Fanning S. 2011. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a university veterinary hospital. *Applied Environmental Microbiology* 77: 7104-12
  74. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 2640-4
  75. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10