

氏名(本籍)	窪村 亜希子(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第438号
学位授与年月日	令和2年10月26日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 阪口 雅弘 (副査) 村上 賢 長井 誠

論文内容の要旨

下痢原性大腸菌はヒトに下痢等の腸管感染症を引き起こす大腸菌の総称であり、腸管出血性大腸菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)が代表的な分類として知られている。一方で腸管凝集性大腸菌(Enteroaggregative *E. coli*, EAEC)は、2012年に国立感染症研究所の感染症サーベイランスシステムに下痢原性大腸菌の新たな分類として追加され、分離同定の指標として *aggR* などの遺伝子が示された。EAECは海外の調査において、健康者からも高率で分離され、分離されたEAECのO抗原型には多様性があること、さらに他の下痢原性大腸菌分類に比べ薬剤耐性率が高いことなどが報告されている。しかしながら、国内ではEAECについて十分な調査がされていない。そこで本研究は、(1)2012年から2013年にヒトの便検体から分離されるEAECについて、その分離状況や病原性について調査を行い、(2)EAEC40株についてO:H抗原型と薬剤耐性状況について確認を行い、(3)各下痢原性大腸菌分類の薬剤耐性状況の比較、およびインテグロンと薬剤耐性の関連性について検討を行った。

第1章においてはEAECの分離率とその病原性、およびO血清型について検討を行った。近年、地方衛生研究所においても *aggR* を保有する大腸菌であるEAECが新たな下痢原性大腸菌として認知されるようになった。しかしEAECは、地方衛生研究所における食中毒等の調査において、消化器症状を示さない健康者の検便検体からも分離されるが、その分離率や病原性等については明らかになっていない。そこで、本研究ではEAECの分離率とその病原性、およびO血清型について検討することとした。

2012年から2013年までに川崎市健康安全研究所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（健康者 682 名、有症者 347 名）を供試検体とした。1,029 検体のうち 32 検体から EAEC が 32 株が分離され、分離率は 3.1 %（健康者 3.2 %、有症者 2.9 %）であった。さらに 32 株のうち 24 株（75.0 %）は市販される 43 種類の O 血清に該当しないことから、O 血清型別不能（O-untypable, OUT）となった。細胞付着性試験では EAEC 32 株中 16 株（50.0 %）が凝集性付着を示した。さらに遺伝子検査の結果から、凝集性付着線毛遺伝子が 32 株中 30 株（93.8 %）で検出された。

以上により、EAEC の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り、またヒトが EAEC を保菌している可能性も示唆された。しかしながら細胞付着性試験及び遺伝子検査結果から、EAEC の病原性は否定できないため、EAEC を下痢症等の病原微生物と特定するには、症状や疫学情報等と併せて検討する必要があると考えられた。また、多くの株が OUT となったことから、国内の市販血清により EAEC の O 血清型別を行う事は困難であると考えられた。

第 2 章においては、第 1 章で OUT となった EAEC の株を中心に遺伝子検査により O 抗原の特定を行い、さらに H 抗原と薬剤耐性状況についても併せて検討した。Nataro らは下痢原性大腸菌の病原性は O : H 抗原型に関連すると報告している。また海外の調査では、EAEC の薬剤耐性率は他の下痢原性大腸菌に比べて高く、特にアンピシリン（ABPC）、ST 合剤（SXT）、テトラサイクリン（TC）の耐性率が高いことが示されている。しかしながら国内で EAEC の O : H 抗原型や薬剤耐性状況を調査した報告は少ない。本研究では、OUT であった EAEC の O 抗原型について遺伝子検査により特定することで EAEC の O : H 型の流行状況について確認するとともに、薬剤耐性状況についても調査を行った。

2012 年から 2014 年に川崎市内のヒト検便検体から分離された EAEC 40 株を供試菌株とした。結果から、EAEC の主な O : H 型は O131 : H27, O99 : H10 および O176 : H34 であった。薬剤感受性試験では、供試した 12 薬剤のうち 9 薬剤で耐性株が認められ、ABPC（82.5 %）、SXT および TC（52.5 %）の順に最も高い耐性率を示した。

EAEC の主な O : H 型（O99 : H10, O131 : H27 および O176 : H34）はいずれも食中毒等患者からの分離報告があることから、病原性を有する可能性が示唆された。薬剤感受性試験から EAEC の薬剤耐性パターンは海外の報告と同様であることが確認された。

第 3 章においては、第 2 章で確認された EAEC の薬剤耐性率について、他の下痢原性大腸菌の薬剤耐性率と比較を行った。さらに薬剤耐性に関与するインテグロンとその可動領域に含まれる薬剤耐性遺伝子の検出も併せて行った。インテグロンは、*intI1* により可動領域部分に薬剤耐性遺伝子を取り込むことが確認されている。さらにインテグロンを保有する大腸菌は非保有菌に比べ高い薬剤耐性率を示すことが知られている。しかしながら、ヒト由来の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の遺伝子について調査した報告は少ない。そこで本研究では、下痢原性大腸菌の各分類について薬剤耐性状況を確認することで、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について比較を行うとともに、各下痢原性大腸菌についてインテグロン保有の有無や

その可動領域部分から検出される薬剤耐性遺伝子と実際の薬剤耐性パターンについて比較検討を行った。

2012年から2014年までにヒトの検便検体から分離された EAEC 40 株、腸管病原性大腸菌 37 株、STEC 83 株、腸管毒素原性大腸菌 2 株の合計 162 株の下痢原性大腸菌を供試菌株とした。下痢原性大腸菌 162 株の薬剤感受性試験の結果、10 薬剤のうち 7 薬剤で EAEC は他の下痢原性大腸菌より高い耐性率を示した。遺伝子検査結果から 162 株のうち 27 株がインテグロンを保有していた。さらに薬剤耐性率の比較によりインテグロン保有株は、非保有株に比べ 7 薬剤で耐性率が有意に高いことが示された。しかしシーケンス解析結果から、可動領域部分に含まれる薬剤耐性遺伝子は主に *aadA* と *dfxA* の 2 種類のみであることが確認された。

以上より、EAEC は他の下痢原性大腸菌に比べ高い薬剤耐性率を示すことが確認された。さらに下痢原性大腸菌においてもインテグロン保有株の方が 7 薬剤で耐性率が有意に高いことが示された。しかし可動領域に含まれる薬剤耐性遺伝子の種類は少なく、インテグロンが取り込んだ薬剤耐性遺伝子による薬剤耐性の表現型への影響は少ないことが示唆された。

以上、本研究は、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 の分離率や O : H 型について明らかにし、さらに病原性を有する可能性についても示した。また同時に、各下痢原性大腸菌の薬剤耐性状況や検出したインテグロンと薬剤耐性との関連性についても示したことで今後の薬剤耐性菌研究に寄与する研究となった。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の内容

下痢原性大腸菌の 1 つである腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の分離状況と各下痢原性大腸菌の薬剤耐性を調査し、各種下痢原性大腸菌の薬剤耐性に与える影響について調べることを目的として研究を行った。

第 1 章では腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の分離率とその病原性、および O 血清型について検討を行った。EAEC の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り、またヒトが EAEC を保菌している可能性も示唆された。また、多くの株が血清型別不能となったことから、国内の市販抗血清により EAEC の O 血清型別を行う事は困難であると考えられた。

第 2 章では第 1 章で血清型別不能となった腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の株を中心に遺伝子検査により O 抗原の特定を行い、さらに H 抗原と薬剤耐性状況についても併せて検討した。主な O : H 型はいずれも食中毒等の下痢症患者から分離報告のある型であった。腸管凝集性大腸菌の多くの株が示した分子疫学解析結果や薬剤耐性パターンから、腸管凝集性大腸菌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示唆された。

第 3 章では、第 2 章で確認された腸管凝集性大腸菌 (EAEC) の薬剤耐性率について、他の下痢原性

大腸菌の薬剤耐性率と比較を行った。さらに薬剤耐性に関与するインテグロンとその可動領域に含まれる薬剤耐性遺伝子の検出も併せて行った。腸管凝集性大腸菌（EAEC）の薬剤耐性率は他の下痢原性大腸菌に比べて高いことが確認された。またインテグロン保有株の方が非保有株に比べ、耐性率が有意に高いことが認められた。

以上、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中で知見が少なかった腸管凝集性大腸菌の流行状況について明らかにした。さらに腸管凝集性大腸菌が病原性を有する可能性や国内肉用鶏から分離される大腸菌との関連性について示した。また下痢原性大腸菌のうちインテグロン保有株の方が非保有株に比べ耐性率が有意に高いことが示された。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は川崎市に勤める研究員であり、本学位論文にかかわる研究のほとんどが川崎市健康安全研究所で行われ、明確なテーマとして設定されている。申請者が日常的に行っている業務の中で公衆衛生上、重要で現場で直面している課題を研究課題として選んだもので、わかりやすく整理されている。

2) 研究の背景

下痢原性大腸菌は、その病原性によって6種の分類されている。特にO-157を代表とする腸管出血性大腸菌は研究が進んでいる。しかし、腸管凝集性大腸菌（EAEC）の流行状況の知見は少なかった。本研究では我が国においてヒトから分離される腸管凝集性大腸菌の分離状況と各下痢原性大腸菌の薬剤耐性率を明らかにし、さらに薬剤耐性に関与する因子であるインテグロンが下痢原性大腸菌の薬剤耐性に与える影響について調べた。これまでの先行研究をよく分析し、本研究との関連も明らかにしている。

3) 研究の方法

腸管凝集性大腸菌（EAEC）の国内の市販血清によるEAECのO血清型別では、多くの株が血清型別不能となった。本研究では遺伝子検査による型別を行うことにより、血清型別不能菌の型別を行った。詳細な型別したうえで、細胞付着性試験による病原性、薬剤耐性の分析およびその機序としてのインテグロンの解析も行った。このように明確な分析視点から研究目的に対して複数の研究方法を組み合わせ解析を行っている。

4) 研究の結果

国内で流行している腸管凝集性大腸菌（EAEC）の血清型別を行った。主なO:H型はいずれも食中毒等の下痢症患者から分離報告のある型であった。細胞付着性試験ではEAECの50.0%が凝集性付着を示した。さらに遺伝子検査の結果から、凝集性付着線毛遺伝子が93.8%で検出された。EAECの多

くの株が示した薬剤耐性パターンや分子疫学解析結果からこの大腸菌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示唆された。EAEC の薬剤耐性率について、他の下痢原性大腸菌の薬剤耐性率と比較を行ったところ、EAEC の薬剤耐性率は他の下痢原性大腸菌に比べて高いことが確認された。また下痢原性大腸菌のうちインテグロン保有株の方が非保有株に比べ 7 薬剤で耐性率が有意に高いことが示された。

5) 考察と結論

本学位論文はヒト由来下痢原性大腸菌の中で知見が少ない腸管凝集性大腸菌 (EAEC) に焦点を当て、その分離状況や細胞付着性試験を用いた病原性などについて調査を行った。さらに大きな問題となっている薬剤耐性状況とその関連遺伝子の研究に発展させ、それらのデータに基づいて考察を行った重要な研究と考えられる。

6) 引用論文

本研究において必要と思われる文献は必要な数だけ引用されている。

3. 審査の結果

本論文の内容、専門分野および外国語の学力と発表会での質疑に対する適切な応答を考慮すると、博士としての専門知識を有することが認められる。また、本研究は獣医公衆衛生学上、意義ある業績として評価できることから、本学の獣医学研究科学学位論文審査基準を十分に満たす論文と判定する。