




## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 435号	氏 名	成松 浩志
審査委員会委員	主査氏名	山岡 吉生	
	副査氏名	川本 文彦	
	副査氏名	平松 和史	
論文題目 Distribution of non-LEE pathogenic island-related genes in <i>Escherichia coli</i> carrying <i>eae</i> from patients with diarrhea and healthy individuals in Japan (日本の下痢症患者及び健康者由来 <i>eae</i> 保有大腸菌における Non-LEE 病原性関連遺伝子の分布)			
論文掲載雑誌 Journal of Clinical Microbiology			
<p>腸管病原性大腸菌(EPEC)は下痢症を起こす重要な菌であるが、その病原因子は未だ完全には解明されていない。特徴的な病理像とされる腸管上皮細胞への接着と微絨毛の破壊には、染色体上の LEE 遺伝子座の中の <i>eae</i> およびプラスミド(EPEC 接着因子:EAF)の存在が関与していると報告されているが、実際には先進国では EPEC のほとんどは EAF プラスミドを欠く非典型的 EPEC である。最近ノルウェーのグループが多量の遺伝子を網羅的に解析し、新規の病原遺伝子の候補を多数報告した。そこで今回の研究では、日本において分離された下痢症および健康者由来の非典型的 EPEC(<i>eae</i> は陽性で志賀毒素遺伝子を保有しない菌株)を対象に、彼らが報告した遺伝子から5つの遺伝子の有無をPCR法で解析した。測定した遺伝子は、EspC pathogenicity island (PAI)上の <i>espC</i> 遺伝子、OI-122 様 PAI 上の <i>efal/lifA</i> と <i>nleB</i>、系統分類用の遺伝子 <i>yjaA</i> および EAF 上の <i>bfpA</i> 遺伝子である。対象菌株は、下痢症由来 83 株、健康者由来 38 株であり、さらに <i>eae</i> と <i>espC</i> の遺伝子型は、Heteroduplex Mobility Assay で測定した。</p> <p>結果として、下痢症由来株：健康者由来株で <i>bfpA</i> 陽性は、13.3%：7.9%で、多くが非典型的 EPEC であることが確認された。<i>efal/lifA</i> だけが保有率に統計的に有意な差を認めた。また遺伝子間相互の関連では、<i>espC</i> と <i>yjaA</i> および <i>efal/lifA</i> と <i>nleB</i> の相関、<i>espC</i> と <i>efal/lifA</i> および <i>efal/lifA</i> と <i>yjaA</i> の逆相関が有意であった。<i>efal/lifA</i> と <i>espC</i> の保有パターンで4群に分けた場合、<i>espC</i> 陰性かつ <i>efal/lifA</i> 陽性の群が下痢症で高頻度に見られ、<i>espC</i> 陽性かつ <i>efal/lifA</i> 陽性であった症例はわずか2例であったが、いずれも下痢症患者由来であった。しかし <i>efal/lifA</i> と <i>espC</i> の保有パターンと疾患との関係に統計的有意差は認めなかった。また <i>espC</i> には6種の多型を認めた。</p> <p>今回の研究により、<i>efal/lifA</i> のみが、下痢との関連性が示唆された。しかし重要な点は、<i>efal/lifA</i> が陰性であっても下痢症患者は存在し、また陽性でも健康者は存在するわけで、臨床的に用いることのできる疾患マーカーとはなりえないことがわかった。今後は、多数の遺伝子を組み合わせ、一定のパターンの場合は、必ず下痢症であるなど、臨床応用できる遺伝子群が見つかることを期待したい(<i>espC</i> 陽性かつ <i>efal/lifA</i> 陽性は症例数が少なく有意差は出なかったが、ひとつの候補かもしれない)。さらに <i>espC</i> の遺伝子多型が疾患形成と何らかの関連を持つ可能性も考えられ、申請者の研究は今後のさらなる研究の礎となる可能性を秘めている。腸管病原性大腸菌の研究は奥が深く、未解決の問題を多く抱えており、今後さらに研究が発展していくことを期待したい。以上、審査員の合議により、本論文は学位(博士)に値するものと判定した。</p>			

別記様式第4号

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 成 松 浩 志

## 論 文 題 目

Distribution of Non-LEE Pathogenic Island-related Genes in *Escherichia coli* Carrying *eae* from Patients with Diarrhea and Healthy Individuals in Japan (日本の下痢症患者及び健康者由来 *eae* 保有大腸菌における Non-LEE 病原性アイランドの病原性関連遺伝子の分布)

## 要 旨

1 緒 言: 腸管病原性大腸菌(EPEC)は最初に下痢症を起こすことが見つかった大腸菌であるが、長らくその病原因子は解明されていない。近年、EPEC の病理像とされている腸管上皮細胞への接着と微絨毛の破壊には、外膜タンパク質 Intimin や集束形成線毛(BFP)が関与するとされ、前者をコードする遺伝子として染色体上の LEE (Locus of enterocyte effacement)遺伝子座の中に *eae* が、後者についてはプラスミド(EPEC 接着因子, EAF)上に *bfpA* が、発見された。この他にも LEE や EAF 上にさまざまな機能を持つ多くのエフェクター遺伝子や制御遺伝子が存在する。しかし、研究の進展につれ先進国で分離される EPEC のほとんどは EAF プラスミドを欠く非典型的 EPEC(a-EPEC)であり、過去の国内外の調査においても、下痢症由来と健康者由来の菌株の *eae* など付着関連遺伝子の保有率には統計的に有意な差が認められず、これらの遺伝子検査だけで下痢症の原因菌と推定することはできないことがわかった。そこで LEE 及び LEE 以外の病原性アイランド(PAI)上の遺伝子についても新たな視点から EPEC(a-EPEC を含む) の病原性と密接に関連する因子の解明が世界的に求められている。そこで、今回、下痢症及び健康者由来の EPEC について、EspC PAI 上の EspC 遺伝子(*espC*)、OI-122 様 PAI 上の遺伝子 *efal/lifA* と *nleB*、系統分類用の遺伝子 *yjaA*、EAF 上の *bfpA* の保有状況を調べ、LEE 以外の PAI 上の遺伝子と下痢症との関連性を検討した。

**2 材料および方法:** 菌株は、過去に国内で下痢症患者および健康者(下痢なし)から分離された大腸菌で、*eae* を保有し、かつ、志賀毒素遺伝子を保有しない菌株について血清型が異なるものは全て調査対象とした。同一血清型の場合は、由来(集団、地域、時期)が異なるものとした。対象菌株数は、下痢症由来 83 株、健康者由来株 38 となった。これらを対象に *espC*、*efal/lifA*、*nleB*、*yjaA* および *bfpA* の各遺伝子を PCR 法にて検索した。*eae* と *espC* の遺伝子型は、各々 HMA(Heteroduplex Mobility Assay)法で調べた。

統計的解析は Fisher's exact test. で独立性の検定を行った。検定を繰り返すことの多重性は BH 法で有意水準を考慮し、FDR(False Discovery Rate)を 0.05 とした。

**3 結果:** 各遺伝子の保有率を下痢症由来:健康者由来で表すと、*bfpA*(+)は、13.3%:7.9%で、多くは非典型的 EPEC(a-EPEC)であることを示した。*espC*(+)は 25.3%:36.8%、*efal/lifA*(+)は 32.5%:13.2%、*nleB*(+)は 63.9%:60.5%、*yjaA*(+)は 42.2%:55.3%であり、*efal/lifA* だけが保有率に統計的に有意な差 ( $p<0.05$ )があった。遺伝子間相互の関連の統計解析では、*espC* と *yjaA*、*efal/lifA* と *nleB* の相関、*espC* と *efal/lifA* および *efal/lifA* と *yjaA* の逆相関が有意であった( $P<0.05$ )。

調査菌株は *efal/lifA* と *espC* の保有パターンで 4 群に分けられ、*espC*(-)/*efal/lifA*(+)は下痢症由来の 30.1%(25/83)、健康者由来 13.2%(5/38)で分布の差が大きい傾向にあった。一方、*espC*(+)/*efal/lifA*(+)群は稀で、下痢症から 2 株のみだった。しかし、4 群とも統計的有意差はなかった( $P<0.05$ )。

*espC* は *eae* HMA a1,a2,c2 の型、*efal/lifA* は b1,b2,c1 の型の菌株に多く分布していた。*bfpA* は a1,b2,d1 型の菌株に分布し、特に a1 型に集中(9/14)していた。さらに *espC* には 6 種類の多型が発見された。

**4 考察:** *efal/lifA* のみが、下痢との関連が示唆されたが、一方で上記の 4 遺伝子は独立ではなく相互に関連する傾向にあり、また、各遺伝子の分布は *eae* 型に関連することがわかった。*efal/lifA* は、下痢に直接関与しているというよりも、その遺伝子を保有するグループの感染機会が多い何らかの疫学的背景、感染性や定着性において有利に作用する因子や未知の下痢原性因子とリンクしている可能性が考えられる。

一方、*espC* は、下痢原性の指標にはならないと考えられたが、遺伝子型多型が発見されたことから、今後、炎症を悪化させる要因として、各型の毒性の差を検討する必要性が示唆された。