

家畜病原性大腸菌の接着因子の 解析と疫学…私の雑感…

疫学研究部 臨床疫学研究室

小林 秀樹

KOBAYASHI, Hideki



1996年7月中旬におきた腸管出血性大腸菌(EHEC) 0157 集団食中毒は、当時、ブタの肺炎を中心とした細菌研究をしていた私にも多大な影響をあたえた。農林水産省は「農林水産物における病原性大腸菌等の汚染防除に関する研究(病原性大腸菌)」と題した緊急特別研究をうちだし、私もそれに組み込まれた。公衆衛生上の観点から、家畜の病原性大腸菌の迅速スクリーニング法を開発することが課題となった。細菌学に携わる者にとっての大腸菌は基本中の基本といわれるが、それは細菌の培養法、取り扱い方や染色法等の一般手技についてであり、病原体としての各論となると、大腸菌はおそらくもっとも診断の難しい細菌ではないだろうかという不安が文献を読むにつれ募った。すなわち、第一に、病原細菌は一般的に健康動物には存在しないため、菌分離があれば病気と何らかの関係があると推察できる。一方、非病原性の大腸菌は家畜の腸内細菌叢の一部として必ず多数存在し、病原性のそれと人工培地上での鑑別が困難である。第二に、180種類を越えるO抗原(菌体抗原)と数多くの病原因子や接着因子が複雑に絡み合っていること、そのために病状も下痢をはじめ浮腫、敗血症、脳脊髄膜炎あるいは関節炎等様々であることである。

さて、上述の研究課題の遂行であるが、EHEC 0157を含む志賀毒素産生性大腸菌(STEC)に焦点をあて、ウシの糞便からのスクリーニングおよび分離を実施した。スクリーニングは志賀毒素遺伝子(stx)を標的としてPCRで実施した。このころ、いくつかの畜産先進国ではウシ糞便からのSTEC分離成績を報告していたため、それらの報告に基づいて行ったわけである。結果はスクリーニングで650頭の糞便のうち7割近くの糞便がSTECを保有することが示唆され、検体あたり20コロニーの大腸菌

を釣菌して検査した成績でも3割近くの糞便からSTEC株が分離された。これらの成績は諸外国のものより高かった。STEC分離株は多くのO群血清型に分類されたが、0157、026、0103あるいは0111等のヒトEHECとして分離されるO群血清型に分類された株はSTEC分離株のうちの2割に満たなかった。しかしこれらのポテンシャルEHEC株のほぼ全てがeae遺伝子を保有していることが判明した。この遺伝子は、大腸菌外膜タンパク質の一部であるインチミンをつくり、さらにインチミンは小腸粘膜上皮細胞のレセプターと結合することが解っていた。当所の横溝部長(当時上席)がこのインチミン等に着目し、0157ワクチン開発をはじめたのもこの頃である。

病原細菌による腸内感染は組織への定着によって成立する。強力な毒素を産生する細菌であっても定着機能がないなら通過菌として体外に放出されてしまい病気はおこらない。病原性大腸菌の小腸粘膜への定着は大きく分類して2つある。先に述べたインチミンによる定着と線毛抗原(F抗原)によるものである。後者は腸管毒素産生大腸菌(ETEC)のF抗原による定着機構がほぼ完全に解明されているが、インチミンのそれは不明瞭であった。幸運にもその当時家畜由来STECとインチミンを研究課題としているフィンランド国立獣医食品研究所(EELA)へSTAフェロー研究員として1年7ヶ月間招聘されることになった。しかしながら、まさに渡航のための手続きをしていたとき、インチミンによる定着機構の全容がイギリス、ドイツおよびフランスの合同チームにより解明され、雑誌Cellに報告された。驚いたことに、小腸粘膜上皮細胞表層にあるインチミンのレセプタータンパクはEHEC自身で前駆体がつくられ3型分泌システムにより上皮細胞に打ち込



まれて発現したものだったのである。EHEC 以外にも、インチミンやこのレセプタータンパクおよび 3 型分泌システムに関与するタンパク質群を発現する一連の遺伝子群（LEE 遺伝子カセットという）を保有する大腸菌があり、微絨毛消失性粘着性大腸菌（AEEC）と呼ばれる。ヒトの腸管病原性大腸菌（EPEC）も AEEC の範疇に入る。

このような背景のもと、EELA に赴任して私がまず手がけたのは各種動物からの STEC および eae 保有大腸菌の保有状況と菌分離であり、特に eae 保有菌株については eae の他、LEE 遺伝子カセット内の複数の遺伝子を解析した。その結果、2 割近くの LEE 遺伝子に欠失や変異部分がみうけられ、これらの LEE 遺伝子を持つ大腸菌は小腸に微絨毛消失性粘着性病変（A/E 病変）を誘導できない可能性を EU 主催の病原性大腸菌国際会議（ベルギー、リエージュ）で報告した。この会議には、インチミンの定着機構を解明したフランケル博士らの発表もあり、LEE 遺伝子を持つ株のうち *in vitro* では 2 ~ 3 割程度しか細胞付着能を有してなかったことに続けて、LEE 発現のための炭酸ガス濃度、pH、胆汁酸塩の濃度等を検討したがよい成績が得られなかったことを報告していた。現在はウサギやモルモット等から摘出した腸管を利用し、種々の因子と A/E 病変の関係を検討している。このように LEE 由来タンパク発現のための遺伝子調節因子は何なのかということが今もっとも熱いところなのである。一方、私はインチミンの遺伝子である eae の解析から、既知のインチミンサブタイプ α 、 β 、 γ および ε （ δ は β に編入）に加え、 ζ （ゼータ）をトナカイ分離株から発見し、国際会議で報告した。インチミンサブタイプは分子疫学的にもインチミンワクチン開発にとっても重

要である。なぜならサブタイプ間の血清学的な交差がほとんど無いだけでなく、サブタイプの違いがレセプターや種々の LEE 内各遺伝子の差異に大きく影響するからである。現時点でインチミンのサブタイプは ζ に続き、 η 、 θ 、 ι および κ まで報告されており、これら $\alpha \sim \kappa$ まで全てのサブタイプはウシ由来の大腸菌からも分離される。現在、ウシ由来 eae 保有大腸菌株のインチミンサブタイプと O 群血清型との関連性について調べており、血清型によってはかなり深い関係があることが判明している。しかしながら、今のところインチミン $\alpha \sim \zeta$ は PCR 型別可能であるが、それ以降は全て DNA シークエンスによる解析が必要である。同一サブタイプの株数がある程度そろえば PCR 構築も可能となるのだが、所詮マイナーなタイプなのでなかなか株が集まらないのが辛いところである。

話は変わるが、離乳後の子ブタに浮腫病（ED）や離乳後下痢（PWD）を惹起する病原性大腸菌がいる。この大腸菌は小腸定着因子として F18 線毛抗原を保有するのが大半であるがインチミンによるものも報告されている。ED は起因大腸菌が定着後、外毒素である Stx2e によって全身性の浮腫が起こる疾病で、PWD は ED とよく類似した大腸菌により起こる水様性下痢症を典型症状とし、起因大腸菌は通常、LT、ST あるいは EAST 1 等のエンテロトキシン産生性のものである。すなわち、ED も PWD も起因大腸菌の O 群血清型は O138、O139、O141 および O149 が主であり、エンテロトキシンの遺伝子を除くと各種病原遺伝子の保有状況が酷似している。私も機会があつて 2 回ほどベトナムで仕事をさせてもらった。この時、下痢を伴わない浮腫病豚の小腸から分離した浮腫病起因大腸菌株（F18+、stx2e+）はいずれのエンテロトキシン遺伝子も保



有しておらず、0138 と 0141 に型別されたものは全て β 溶血性を示した。前にも述べたように F 抗原による小腸粘膜上皮の微絨毛定着様式は ETEC で詳しく解明されている。ETEC の F 抗原に対するレセプターは動物の新生時期のみ小腸粘膜上皮にあるため、この時期が過ぎれば感染しない。従って、母獣に F 抗原を免疫することにより初乳を介して ETEC の F 抗原が不活化できる。現在、日本においては ETEC の症例はほとんどみられない。一方、ED や PWD の F 抗原 (F18) は離乳期子ブタの小腸に定着する。離乳は 3 ~ 4 週齢で実施するのでワクチネーションは難しい。しかも粘膜感染の防除であるから血中の IgG を増やしてもほとんど意味がない。国内でも平成 10 年頃から PWD とと思われる症例が数多く報告されるようになってきた。診断は剖検材料 (小腸粘膜、腸管膜リンパ節等) から分離される大腸菌株について F18、F4、eae、stx、エンテロトキシンの各遺伝子検出と O 群型別で充分と思われる。現在これらの病気に対する受動型ワクチンとして発育鶏卵を利用してつくられた経口のものがある。また、ブタのなかには F18 抗原のレセプターが発現されない品種もあり、動物サイドからの本疾病解決の糸口も検討されている。しかしながら、これらの疾病排除には F18 抗原やインチミンが発現可能なベクターを用いた新しいタイ

プの粘膜ワクチンシステムが必要であろう。

家畜衛生とは疾病の的確な診断からはじまり、原因の追及、治療あるいは対処および予防という一連のながれがある。臨床疫学を担う者は、現在どのような疾病が家畜に対し問題となっているか、今後どのような疾病が問題となりうるか、そしてどのような手段で診断すればよりの確かつ効率的かということを数値化する研究をしなければならない。この数値はまた、応用部門の研究者に利用されるものでなければならない。すなわち、臨床疫学部門は軍隊でいう斥候部隊であり、その情報は的確でなければならない。この情報をもとに主力部隊や後方支援部隊は適切な武器弾薬 (診断液、ワクチンおよび診断技術等) を開発、運用していくことになる。そうして開発された新兵器の一部は兵站部隊を通じ、再び斥候部隊にも還元されなければならないし、兵器の大量生産は民間に協力をしてもらわねばならない。このような循環は至極当然のことであるが、先の大戦をみても、どうも日本人には馴染まないことらしく思える。個人の研究内容と意義について理解に乏しいことに加え、組織運営能力にもまた乏しいからなのか。最後に、疾病の的確かつ効率的な診断を数値化して評価する仕事はとても地味な割に手間と費用がかかることを知っておいて欲しい。

