腸管毒血症性大腸菌 O 群139の HEp-2 細胞への付着

中澤 宗生¹・片岡 康²・大宅 辰夫³

¹ 家畜衛生試験場九州支場, ² 家畜衛生試験場製剤研究部, ³ 家畜衛生試験場飼料安全性研究部
¹ 〒891-01 鹿児島市中山町2702, ^{2,3} 〒305 つくば市観音台3-1-1

〔受付: 1994年 7 月11日, 受理: 1994年 9 月12日〕

ブタの浮腫病の原因菌である腸管毒血症性大腸菌 O 群139の HEp-2 細胞への付着性を検討した。その結果, 供試した O 群139の計101株すべてにマンノース耐性の細胞付着性が認められた。この付着性は, F107 線毛保有の有無に関係なくみられた。また, 菌体の熱処理の成績から, 熱安定性の高い抗原の付着への関与が示唆された。さらに, 抗体を用いた付着阻止テストにより, 付着にかかわる抗原を調べたところ, 供試大腸菌 O139:K12:H1:F107 の付着性は, 抗 K12 抗体処理により付着率, 付着菌数とも有意に低下した。以上の成績から, 莢膜 K12 抗原が本菌型の培養細胞付着性に関与しており, 腸管毒血症性大腸菌 O 群139の付着に関連する病原因子の一つであることが示唆された。

獣医学領域では, 大腸菌性腸管毒血症の原因菌を腸管毒血症性大腸菌 Enterotoxemic *Escherichia coli* (ETEEC) と総称している (1)。本毒血症は, 原因大腸菌の小腸内定着とその結果産生された毒素が吸収され, 標的組織に障害を引き起こすことにより発生する (5)。ブタの浮腫病は大腸菌性腸管毒血症の典型であり, 原因菌は血清型 O139:K12 が主体で, ペロ細胞毒 (VT2v) 産生菌である (1, 5, 7)。したがって, 本菌型はペロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) の範疇にも入る。また, 本病の病態はヒトの溶血性尿毒症症候群, 血栓性血小板減少性紫斑病と類似性があるといわれている (4)。

浮腫病の発生においては, 大腸菌性下痢の主因である毒素原性大腸菌の感染 (6) と同様に, 原因菌の小腸内定着が感染の第一歩と考えられ, 付着因子として線毛 F107 が報告されている (2)。本来, ブタを用いて ETEEC の付着・定着性を検討することが望ましいが, ブタの系統により感受性に相違が認められており (2), 非感受性のブタでは原因菌を経口投与しても, 投与菌の小腸内定着が不定であり, その解析が容易でない。

一方, ブタはヒトの腸管病原性大腸菌 (EPEC) (10), 腸管出血性大腸菌 (EHEC) (11) あるいは腸管凝集粘性大腸菌 (EAggEC) (12) の有用な感染モデルとして使用されており, 両者にはこれら大腸菌に対する共通のレセプターが存在する可能性が窺える。

そこで, 本研究では, ヒトの EPEC の付着性の検索に使用されている HEp-2 細胞 (3, 9) を用いて, ETEEC O 群139の付着性を調べ, 付着に関与する抗原について若干の検討を加えたので報告する。

使用菌株は, わが国で発生した浮腫病から分離

Muneo NAKAZAWA¹, Yasushi KATAOKA² and Tatsuo OHYA³
Adherence to HEp-2 Cells of Enterotoxemic *Escherichia coli* O-group 139 from Pigs with Edema Disease

¹ Kyushu Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, Kagoshima 891-01

² Biological Products Research Division, National Institute of Animal Health, Tsukuba 305

³ Feed Safety Research Division, National Institute of Animal Health, Tsukuba 305

表 1. 腸管毒血症性大腸菌の細胞付着性

F107の有無	検査菌株数	付着率 (%) ^{*1}			付着菌数 (個) ^{*2}			
		81-85	86-90	91-95	21-30	31-40	41-50	51-60
有	20	12 ^{*3} (60.0)	8 (40.0)	0	7 (35.0)	11 (55.0)	2 (10.0)	0
無	81	49 (60.5)	30 (37.0)	2 (2.5)	24 (29.6)	46 (56.8)	10 (12.4)	1 (1.2)
計	101	61 (60.4)	38 (37.6)	2 (2.0)	31 (30.7)	57 (56.4)	12 (11.9)	1 (1.0)

^{*1} 細胞100個当たりの菌付着細胞数の比率

^{*2} 菌付着細胞30個の平均付着菌数

^{*3} 菌株数, カッコ内は%

された O 群139の100株 (7) (このうち, 19株は O139:K12:F107⁺, 81株は O139:K12:F107⁻), ATCC 23546 (O139:K12:H1:F107⁻), チューリッヒ大学の Bertschinger 教授より分与された 107/86株 (O139:K12:H1:F107⁺), 及びモントリオール大学の Fairbrother 教授より分与された 4787株 (O115:K” V165”:H51:F165⁺) の計103株である。

培養細胞付着テストは, ATCC 23546 を除く 102株について, Lab-Tek チャンバースライド (Nunc 社) で48時間培養した HEp-2 細胞 (ATCC CCL 23) を用い, 1%マンノース存在下で Cravioto ら (3) の方法に準じて行った。

その結果, 供試102株のうち, O 群115の4787

株を除く O 群139の計101株すべてに細胞付着性が認められた。表 1 に示すように, 付着率は 81%以上, 細胞 1 個当たりの平均付着菌数は菌株によるばらつきはあるが21~60個であった。また, 本菌型は線毛 F107 保有の有無にかかわらず細胞付着性を有し, かつ, 線毛形成が抑制される 18°C 培養菌においても細胞付着性が認められた。さらに, この付着性は 65°C, 25分間あるいは 100°C, 5 分間の加熱処理に対しても抵抗性であった。したがって, 本菌型の付着性は熱安定性の高い物質が関与していると思われる。なお, 菌の付着像は図に示すように, 菌体が細胞辺縁部に沿い二重・三重に重なるように付着し, EPEC の局在性あるいは拡散性付着 (9) とは異なる像

腸管毒血症性大腸菌 O 群139の HEp-2 細胞付着像 (倍率: 1,000倍)

表2. 抗体による付着阻止テスト

菌株 ^{*1}	抗体 ^{*2} (希釈倍数)	付着率 (%)	付着菌数 (個) ^{*3}	阻止率 (%)
107/86	O139(1:160)	85.2	29.8±6.3	1.7
	K12 (1:160)	18.9	10.5±4.5	65.3
	F107(1:80)	86.0	31.4±5.7	0
	F165(1:20)	83.4	30.3±5.1	
IW-2	O139(1:160)	81.3	32.5±6.6	5.8
	K12 (1:160)	16.0	12.6±5.8	63.5
	F107(1:80)	84.8	35.3±7.3	0
	F165(1:20)	82.1	34.5±6.1	

*¹ 血清型O139:K12:H1:F107⁺*² 抗O139血清の凝集素価 1:1,280

抗K12 " " 1:1,280

抗F107 " " 1:640

抗F165 " " 1:640

*³ 平均値±標準偏差

を示した。

次に、付着に関与する抗原を探るために、家兎免疫血清を用い、抗体による付着阻止テストを行った。用いた抗体は、抗O139、抗K12、抗F107 (Bertschinger 教授分与) 及び対照の抗F165血清 (Fairbrother 教授分与) である。このうち、抗K12及び抗O139血清は、ATCC 23546のホルマリン不活化全菌体免疫家兎血清から既報(8)に従い吸収操作により調製した。付着阻止テストは、非働化した抗体を各々2倍段階希釈し、大腸菌10⁸個と等量混和後、37°Cで2時間感作した。その後、抗体感作菌液は十分洗浄し、上記の付着テストを行い、付着阻止率(平均付着菌数の減少率)を求めた。

表2に示すように、供試した血清型O139:K12:H1:F107⁺の2菌株は、抗K12抗体処理により付着率、付着菌数とも低下し、その阻止率は63~65%であった。しかし、抗F107抗体では、対照の抗F165抗体と同様に全く付着阻止は認められず、また、抗O139抗体の阻止能も微弱であった。この結果は、本菌型の付着には線毛F107ではなく、莢膜K12抗原が関与していることを示していると考えられた。

本研究において、ETEECの感染の第一歩である上皮細胞付着性を*in vitro*の培養細胞系を用いて検討したところ、浮腫病原因菌の主体をなすO群139に属する大腸菌すべてに細胞付着性を見い

だした。ETEECのブタ小腸内定着にはブタの遺伝形質、例えば付着因子に対するレセプター発現の遺伝的支配の存在、が大きく関与するため(2)、常時、ブタを使用して付着・定着性を調べるのが難しい状況にある。今後、HEp-2細胞付着性とブタの腸上皮細胞付着性の関連を検討する必要があるが、ここに報告した培養細胞を用いるアッセイ系は、ETEECの付着性を解析するための有用な方法と考えられた。

また、付着阻止テストにより付着関連抗原を検討したところ、莢膜K12抗原が本菌型の付着に関与しており、本抗原は病原因子の一つと考えられた。したがって、K12抗原に対する免疫グロブリン製剤を調製し、ブタに給与することで、本菌の感染及び発病を抑制できる可能性も考えられる。

一方、著者らが文献検索した範囲では、ヒトの症例から血清型O139:K12の大腸菌を分離した報告を見いだすことはできなかった。しかし、今回の成績は、本菌に対するレセプターがヒト由来HEp-2細胞に存在することを示唆しており、ヒトにおける本菌感染の可能性は否定できないものと思われる。

文 献

- 1) Bertschinger, H.U. and Nielsen, N.O. (1992): Edema disease. 498-509, *In* Leman, A.D., Straw,

- B.E., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J. [eds.], Diseases of swine, 7th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 2) Bertschinger, H.U., Stamm, M., Vögel, P. (1993): Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: Experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. Vet. Microbiol., **35**, 79–89.
 - 3) Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B. (1979): An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. **3**, 95–99.
 - 4) Francis, D.H., Moxley, R.A., Andraos, C.Y. (1989): Edema disease-like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O157:H7. Infect. Immun., **57**, 1339–1342.
 - 5) Imberechts, H., De Greve, H., Lintermans, P. (1992): The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. Vet. Microbiol., **31**, 221–233.
 - 6) Nakazawa, M., Haritani, M., Sugimoto, C., Kashiwazaki, M. (1986): Colonization of enterotoxigenic *Escherichia coli* exhibiting mannose-sensitive hemagglutination to the small intestine of piglets. Microbiol. Immunol., **30**, 485–489.
 - 7) 中澤宗生, 大宅辰夫, 片岡 康, 甲斐明美 (1991) : 家畜の大腸菌症における Vero 毒素産生大腸菌の分布と血清学的性状. 日細菌誌, **46**, 125.
 - 8) Nakazawa, M., Sugimoto, C., Isayama, Y., Kashiwazaki, M. (1987): Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from piglets with neonatal and post-weaning diarrhea in Japan. Vet. Microbiol., **13**, 291–300.
 - 9) Scotland, S.M., Willshaw, G.A., Smith, H.R., Gross, R.J., Rowe, B. (1989): Adhesion to cells in culture and plasmid profiles of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks and sporadic cases of infant diarrhoea. J. Infect., **19**, 237–249.
 - 10) Staley, T.E., Jones, E.W., Corley, L.D. (1969): Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. Am. J. Pathol., **56**, 371–392.
 - 11) Tzipori, S., Gibson, R., Montanaro, J. (1989): Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. Infect. Immun., **57**, 1142–1150.
 - 12) Tzipori, S., Montanaro, J., Robins-Browne, R.M., Vial, P., Gibson, R., Levine, M.M. (1992): Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect. Immun., **60**, 5302–5306.

**Adherence to HEp-2 cells of enterotoxemic *Escherichia coli*
O-group 139 from pigs with edema disease**

Muneo NAKAZAWA¹, Yasushi KATAOKA², Tatsuo OHYA³

¹ Kyushu Branch Laboratory, National Institute of Animal Health,
2702 Nakayama-cho, Kagoshima 891-01

² Biological Products Research Division, and ³ Feed Safety Research Division,
National Institute of Animal Health, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba 305, Japan

One hundred and one strains of enterotoxemic *Escherichia coli* (ETEEC) O-group 139 isolated from swine with edema disease were investigated for their adherence to HEp-2 cells in the presence of D-mannose. All strains adhered in large numbers to the cells (21 to 60 bacteria/cell). No correlation was found between the presence of F107 fimbria on the organisms and the adherence to the cells. Adhesion-inhibition tests showed that anti-K12 serum inhibited the adhesion ETEEC O-group 139 (an inhibition rate of 63 to 65%), but anti-F107 or anti-O139 sera did not. These results indicate that the capsular K12 antigen may be one of the pathogenic factors of ETEEC O-group 139.