

山梨県における下痢原性大腸菌の 細胞付着性因子保有状況

大沼正行 野田裕之 金子通治

Prevalence of Adherence Factors of Diarrheagenic Escherichia coli in Yamanashi Prefecture

Masayuki OHNUMA, Hiroyuki NODA and Michiharu KANEKO

はじめに

ヒト下痢症の原因菌である下痢原性大腸菌は、病原機序の違いにより腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管組織侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC, EAEC) 等に分類されている。下痢原性大腸菌の同定にはその病原因子の確認が必要である。ETEC, EIEC, EHEC については病原因子が明らかにされ、その検査法として簡便かつ迅速な PCR 法が確立されている。EPEC, EAEC の病原因子の確認は従来特異プローブを用いたハイブリダイゼーションや、培養細胞を用いた細胞付着性試験を行っていたため、煩雑となり判定に熟練を必要とする。近年、PCR 法が開発され、従来法に比べ簡易、迅速性に優れているとの報告があり¹⁾、病原因子の保有状況が明らかになりつつある²⁻⁵⁾。しかし、医療機関等における日常検査では血清型別により下痢原性大腸菌の分類を行う施設が多いため、分離された下痢原性大腸菌が実際に病原因子を保有しているかどうかの検査は一部を除いてほとんど行われてはいない現状にある。

そこで今回、すでに報告⁶⁾されている成績と合わせ、山梨県内で発生した食中毒事例等の原因菌として分離された大腸菌および散発下痢症患者から分離された大腸菌を対象に、病原因子の保有状況および EHEC について

はさらに薬剤感受性試験、プラスミドプロファイルについても検討したので報告する。

材料および方法

2000 年度までに県内の医療機関から搬入されたヒト下痢症由来株および食中毒事例由来株について検討を試みた。内訳は EHEC 59 株, ETEC 26 株, EPEC 71 株である。

PCR 法は平成 11 年度厚生科学研究健康科学総合研究事業の分担研究「調査研究機能の強化に関する総合的研究」(分担研究者: 江部高廣) のうち、公衆衛生分野における緊急課題のモデル研究としての【細胞付着性大腸菌の実態の把握とその検査法の確立に関する共同研究】(研究班班長: 江部高廣, 研究協力者代表: 小林一寛)⁷⁾ の方法によった。すなわち、細胞付着性因子のうち 3 種類の遺伝子 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*) と耐熱性毒素様毒素 (EAST 1) の遺伝子 (*astA*) を標的として PCR 法を実施した。他の病原因子は常法どおりに行った。PCR 用試薬は Ready-To-Go (ファルマシア) を使用し、標的遺伝子のプライマーは研究班で配布されたもの (八柳ら, 伊藤らが設計) をそれぞれ使用した (表 1)。増幅条件はアニーリング 55°C, 2 分で実施した。電気泳動での DNA 分子量マーカーは 100bp DNA ladder を用いた。

表 1 標的遺伝子および増幅遺伝子のサイズ

	標 的 遺 伝 子	サイズ (bp)
<i>eaeA</i>	A/E (attaching and effacing) の病変形成に関与する外膜タンパクを制御する遺伝子	454
<i>aggR</i>	EaggEC の凝集性接着に関与する繊毛の形成に関する遺伝子	254
<i>bfpA</i>	BFP (bundle forming pili) 繊毛構造遺伝子	326
<i>astA</i>	耐熱性毒素様毒素 (EAST1) に関する遺伝子	106

表2 EHECにおける細胞付着性因子保有状況

血清型	毒素型	菌株数	<i>eaeA</i>	<i>eaeA + astA</i>
O157:H7	Stx1, Stx2	39	38	1
O157:H7	Stx2	12	12	
O157:HNM	Stx2	3	3	
O26:H11	Stx1	3	3	
O111:HNM	Stx1	2	2	
計 (%)		59(100)	58(98.3)	1(1.7)

表3 ETECにおける細胞付着性因子保有状況

血清型	毒素型	菌株数	陽性株数 <i>astA</i>	陰性株数
O6:HNM	ST, LT	7	3	4
O6:H16	ST, LT	3	1	2
O128:H12	ST	7	0	7
O148:H28	ST	8	7	1
O159:HUT	LT	1	0	1
計 (%)		26(100)	11(42.3)	15(57.7)

EHEC 59 株については、薬剤感受性試験およびプラスミドプロファイルの検討も行った。

薬剤感受性試験は、NCCLS 法の規格に準拠した一濃度ディスク法 (BBL センシディスク) により測定した。使用薬剤は、サルファ剤がスルファメトキサゾール (S A), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC) クロラムフェニコール (CP), カナマイシン (K M), アミノベンジルペニシリン (ABPC), セファロチン (CET), セフォキシチン (CFX), ラタモキシフ (L MOX), スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合剤 (ST), ノルフロキサシン (NFLX), ホスホマイシン (FOM), ゲンタマイシン (GM) およびナリジク酸 (NA) の 14 薬剤である。

プラスミドプロファイルは、Kado と Liu の方法⁸⁾ に準拠して行った。1 晩培養した供試菌のプラスミド DNA を抽出後、0.65% のアガロースを使用し、100V で約 2 時間 30 分電気泳動した。アガロースゲルをエチジウムブロマイド液に浸し、プラスミド DNA を染色、水洗後に紫外線照射下で撮影しプラスミドを観察した。

結 果

1. 細胞付着性因子保有状況

山梨県内で分離された下痢原性大腸菌 156 株のうち、いずれかの細胞付着性因子を保有していたのは 105 株で

表4 EPEC の血清型表

O1:NM	O111:H21	O128:H35
O1:H7	O111:H27	O128:H47
O1:H42	O114:NM	O142:NM
O18:NM	O114:H2	O142:H6
O18:H7	O114:H10	O142:H21
O18:H12	O114:H21	O146:NM
O18:H14	O114:H32	O146:H6
O20:NM	O114:H49	O146:H10
O20:H26	O119:NM	O146:H19
O20:H51	O119:H4	O146:H21
O26:NM	O119:H6	O151:NM
O26:H2	O119:H27	O151:H10
O26:H7	O125:NM	O151:H50
O26:H8	O125:H6	O158:NM
O26:H11	O125:H11	O158:H6
O26:H12	O125:H19	O158:H23
O26:H32	O125:H32	O158:H55
O28:NM	O125:H49	O159:NM
O44:NM	O126:NM	O159:H7
O44:H18	O126:H2	O159:H12
O44:H34	O126:H12	O159:H27
O55:NM	O126:H19	O166:H4
O55:H6	O126:H21	
O55:H7	O126:H27	
O86:NM	O127:NM	
O86:H2	O127:H6	
O86:H7	O127:H9	
O86:H18	O127:H10	
O86:H21	O127:H12	
O86:H27	O127:H21	
O86:H34	O128:NM	
O111:NM	O128:H2	
O111:H2	O128:H7	
O111:H12	O128:H12	

あった。内訳として *eaeA* は 73 株, *astA* は 28 株, *aggR* は 18 株が保有していた。 *bfpA* を保有する株は無かった。

2. EHEC の細胞付着性因子保有状況

表2で示すように、山梨県内で分離された EHEC 59 株はすべて *eaeA* を保有し、うち 1 株は *astA* も同時に保有していた。最も多く分離された血清型は O157:H7 で 51 株、ついで O157:HNM, O26:H11 とともに 3 株ずつであった。 *aggR* の保有はみられなかった。

3. ETEC の細胞付着性因子保有状況

表3で示すように、山梨県内で分離された ETEC 26 株のうち、11 株が *astA* を保有していたが他の細胞付着性因子の保有はみられなかった。11 株の内訳として、ST 単独産生株が 7 株、ST, LT 産生株が 4 株であった。

4. EPEC の細胞付着性因子保有状況

表4には研究班で作成した EPEC の分類を、表5には該当した 71 株の成績を示した。

山梨県内で分離された EPEC 71 株のうち、いずれかの細胞付着性因子を保有していたのは 35 株であった。内訳として *eaeA* は 14 株, *astA* は 3 株, *aggR* は 5 株, *aggR* と *astA* を同時に保有したのは 13 株であった。O1 (17 株) と O18 (11 株) はいずれの細胞付着性因子

表5 EPECにおける細胞附着性因子保有状況

血清型	株数	陽性株数					陰性株数
		<i>eaeA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	
O1:H7	9						9
O1:HNM	8						8
O18:H12	7						7
O18:H7	3						3
O18:HNM	1						1
O26:HNM	3						3
O26:H11	1	1					
O26:H12	1	1					
O28:HNM	1			1			
O55:H7	5	4					1
O55:HNM	1	1					
O55:HUT	1	1					
O86:H27	1		1				
O86:HNM	1		1				
O86:H7	1	1					
O111:HUT	1				1		
O111:H21	9		3		6		
O119:HNM	2	2					
O119:HUT	1	1					
O126:H12	1						1
O126:HNM	3			1	1		1
O126:H27	3				3		
O127:H21	2				2		
O128:HNM	3			1			2
O128:H2	2	2					
計 (%)	71 (100)	14 (19.7)	5 (7.0)	3 (4.2)	13 (18.3)		36 (50.7)

も保有していなかった。また、O26:HNM (3株) と O126:H12 (1株) も同様に保有はみられなかった。O55 は7株のうち6株が *eaeA* を、O119 は3株、O128:H2 は2株すべてが *eaeA* を保有していた。O111 は9株すべてが *aggR* を保有していた。うち、7株が *astA* も同時に保有していた。同様に O126:H27 も3株すべてが *aggR* と *astA* を同時に保有していた。以上のように血清型によって病原因子を保有するパターンに特徴がみられた。

5. EHEC の薬剤感受性試験およびプラスミドプロファイル

表6に EHEC 59株の薬剤耐性型と株数および保有プラスミドを血清型、薬剤耐性型と組み合わせて示した。EHEC O157:H7 50株はいずれも約92kb付近のプラスミドを保有し、うち13株がほかに50kb (3株)、55kb (2株)、60kb (2株)、75kb (2株)、80kb (3株)、110kb (1株)、140kb (1株) プラスミドを保有していた。図1に2000年度に分離された EHEC のプラスミドプロファイルを示した。サイズマーカー株としてレーン M₁に *Salmonella* Enteritidis L156 (200, 60kb)、レーン M₂に *Escherichia coli* W677 (94.5kb) およびレーン M₃に *Escherichia coli* V517 (55kb) を泳動した。薬剤感受性については、前報^{9,10)}で報告した結果と比べると、新たに SA 耐性株が分離されており今後も薬剤耐性型の変化に注目していく必要があると思われる。

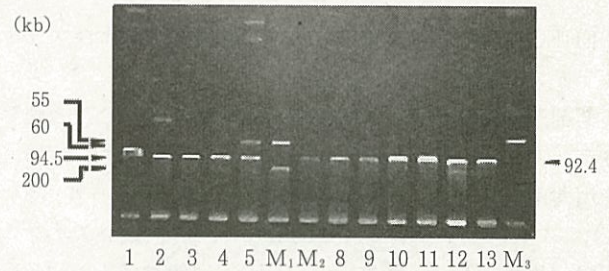


図1 2000年度分離された EHEC のプラスミドプロファイル

考 察

全国の EHEC 感染症に占める O157:H7 の割合は1995年以前は高かったが (83%)、年々減少し2000年は56%となっている¹¹⁾。県内で分離された EHEC の血清型は分離株59株のうち O157:H7 が51株 (86.4%) であり、全国の状況に比べ O157:H7 が原因菌株の血清型となる事例が多かった。今回検討したすべての血清型が *eaeA* を保有しており、岡崎ら¹²⁾の報告と同様のものであった。

EPEC は、今回検討した細胞附着性因子を保有しておらず、11株が *astA* を保有していた。耐熱性毒素様毒素 EAST1 (EAEC heat-stable enterotoxin 1) の構造遺伝子である *astA* は、EPEC の産生する ST (heat-stable enterotoxin) とは遺伝的に異なり¹³⁾、EAEC

表6 EHEC 59株の血清型、薬剤耐性型およびプラスミドプロファイル

血清型	薬剤耐性型	株数	プラスミド (kb)											
			92	92,50	92,55	92,60	92,75	92,80	92,110	92,140	75,50	110	110,75	none
O157:H7	感受性	45	36	3	2	1	—	2	—	1	—	—	—	—
	SA,SM	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	SA,SM, ABPC	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	
	SM,TC	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
	SM, ABPC	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	
O157:HNM	感受性	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	SA,SM	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	ABPC	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	
O26:H11	感受性	3	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	
O111:HNM	SM,TC	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	
	SM,TC,KM, ABPC	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
計		59	39	5	2	2	3	2	1	1	1	1	1	

のみならず、EHEC、ETEC、EPECも保有していることが明らかとなっており¹⁴⁾、今回のわれわれの結果も同様のものではあった。

EPECは検討した71株の約半数の36株が細胞付着性因子を保有していなかった。森屋ら¹⁵⁾、西ら¹⁶⁾、木村ら¹⁷⁾は下痢症患者および健常者から分離された下痢原性大腸菌の血清型はO1、O18、O6、O111が大部分を占め、健常者からも高率に分離されたと報告し血清型のみで病原性の判断はできないことを示唆している。今回の結果でも細胞付着性因子を保有していないEPECのうち、O1、O18が78% (28/36株)と大半を占め、今後他の病原因子の検討を含め病原性の検討が必要である。

O55は7株のうち6株、O119は3株、O128:H2は2株が、*eaeA*を保有していた。これらの株は、腸管細胞にA/E障害を形成して付着するEPECであると考えられた。

O111は9株すべてが*aggR*を保有し、そのうち7株が同時に*astA*を保有する株であった。同様に*aggR*と*astA*を同時に保有していた血清型は、O126:H27、O127:H21であった。これらの血清型のうち、O126:H27、O111:H21については森屋ら¹⁵⁾も*aggR*、*astA*を同時に保有すると報告している。これらの株は、腸管細胞に凝集的に付着するEAECであると考えられた。

PCR法を用いた細胞付着性因子の検出は、従来の方法に比べ簡易、迅速であり非常に有用な手段である。しかし、一部の医療機関を除き、下痢原性大腸菌の病原因子の検出にPCR法を導入している機関はなく、さらに簡便な検出方法の開発が望まれる。また細胞付着性因子を保有する下痢原性大腸菌は有意にヒト下痢症患者から分離されるという報告¹⁸⁾がある一方、ヒト下痢症患者と健常者間で細胞付着性因子の保有率に有意差はないとの報告^{15, 19)}もあり、今後菌株の供試数を増やしさらにデータを蓄積する必要があると考えられた。

なお、1998年度から1999年度は、浅川洋美も携わった。

文 献

- 1) 塚本定三：感染症誌，70，569～573 (1996)
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，22，135～136 (2001)
- 3) 紫竹美和子ら：新潟県保健環境科学研究所年報，16，71～75 (2001)
- 4) 石 史ら：福井県衛生研究所年報，39，43～47 (2000)
- 5) 倉本早苗，黒崎直子，芹川俊彦：石川保環研報，38，14～18 (2001)
- 6) 地方衛生研究所の機能強化に関する総合的研究「細胞付着性大腸菌の実態把握とその検査法の確立に関する共同研究」－抜粋－ (2001)
- 7) 地方衛生研究所の機能強化に関する総合的研究分担研究「調査研究機能の強化に関する研究」研究報告書 (2001)
- 8) Kado,C.I.&Liu,S.T. : J.Bacteriol. , 145, 1365～1373 (1981)
- 9) 金子通治ら：山梨衛公研年報，42，17～24 (1998)
- 10) 金子通治，野田裕之，浅川洋美：山梨衛公研年報，43，9～13 (1999)
- 11) 河野喜美子，山田亨，八木利喬：宮崎県衛生環境研究所年報，12，67～70 (2000)
- 12) 岡崎充宏ら：感染症誌，74，372～377 (2000)
- 13) Savarino,S.J.et al. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 90, 3093～3097 (1993)
- 14) Savarino,S.J.et al. : J.Infect.Dis. , 173, 1019～1022 (1996)
- 15) 森屋一雄ら：感染症誌，74，134～142 (2000)
- 16) 西順一郎ら：感染症誌，73，1104～1109 (1999)
- 17) 木村晋亮ら：感染症誌，73，53～61 (1999)
- 18) Ogata,K.et al. : Jpn.J.Infect.Dis. , 55, 14～18 (2002)
- 19) Biswas,R.et al. : J.Clin.Microbiol. , 34, 3233～3234 (1996)