
短報

**散発下痢患者から分離された大腸菌
の血清型について**

垣田雅史¹⁾, 沖津忠行¹⁾, 佐多 辰¹⁾,
鈴木理恵子¹⁾, 山井志朗²⁾

**Studies on the serotype of
Escherichia coli isolated from
patients with sporadic diarrhea**

Masashi KAKITA, Tadayuki OKITSU,
Shin SATA, Rieko SUZUKI
and Shiro YAMAI

はじめに

病原大腸菌は現在、その発症機序の違いから毒素原性大腸菌 (ETEC), 組織侵入性大腸菌 (EIEC), 腸管出血性大腸菌 (EHEC), 腸管病原性大腸菌 (EPEC), 腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) の5カテゴリーに分類されている^{1,2,3)}。これらヒトに下痢や腸炎などを引き起こす病原大腸菌は、その分離・同定検査において通常の生化学的検査のみで非病原性大腸菌と区別することは難しい。病原大腸菌の各カテゴリーの中で、ETEC, EIEC, EHEC の病原因子は各々腸管毒素, 組織侵入因子, ペロ毒素が主要な因子として明らかにされ^{1,2)}、検査法も確立されている。しかし EPEC および EAggEC に関しては病原性関連因子の提案はあるが研究段階であり、その検査法が日常検査に導入されるには至っていない。一方、病原大腸菌はそれぞれのカテゴリーごとに一定の血清型に属することが示されており³⁾、市販の病原大腸菌 O (菌体抗原) および H (鞭毛抗原) 免疫血清による血清学的診断法が本菌の検査に一般的に用いられている。しかしながら、本検査法においても EPEC および EAggEC の血清型と病原因子との関係については未だ不明な点が多い^{4,5)}。

今回、急性期の下痢患者便から直接培養法で分離され下痢起因菌として有意と思われる大腸菌について、本菌のカテゴリーのうち特に分離頻度の高い EPEC の血清型スキームを検討するために、それらの血清型および病原因子または病原性関連因子などの病原性関連遺伝子保有状況を調査した。

材料および方法
1. 材料

2000年1月から2001年12月までの2年間に、神奈川県内の医院に来院した急性期下痢患者から採取され、感染性胃腸炎の病原体検査を依頼された209名の散発下痢患者便を検体とした。

2. 散発下痢患者からの病原大腸菌の分離

検体は綿棒で採取後、直ちにキャリーブリア培地入り採便管に保存され輸送されたものを使用した。キャリーブリア培地から採取便の付着した綿棒を取り出し、滅菌生理食塩液 1mL に入れた混积液 (およそ 5 ~ 10 倍希釈に相当) を試料とした。本試料について病原大腸菌の検査を他の腸管病原菌の検査と共に直接分離培養法で行なった。すなわち病原大腸菌に関しては、試料の小白金耳量を DHL 寒天培地 (栄研) および CT サプリメント添加ソルビトールマッコンキー (CT-SMAC) 寒天培地 (OXIOD) に塗抹し、36℃, 18 ~ 24 時間培養後、DHL 寒天培地上に優勢に認められ且つ大腸菌が疑われるレンガ紅色コロニー、また CT-SMAC 寒天培地上のソルビトール非分解性大腸菌 O157 が疑われる乳白色コロニーを釣菌し各々 TSI, SIM, VP およびリジン脱炭酸試験用培地 (以上、栄研) の各確認培地に接種した。次いで 18 ~ 24 時間培養後、これらの確認培地の所見による生化学的性状から大腸菌が否定できない分離株は病原大腸菌 O 免疫血清 (デンカ生研) による凝集試験を実施した。さらに本試験で何らかの O 血清に凝集した分離株は、必要に応じて簡易同定キット ID-EB20 (日水) 等により生化学的性状の追加試験を行い大腸菌であることを同定した。

3. 血清型別試験

病原大腸菌 O および H 免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別試験を行った。O 型別試験は、菌株をハートインフュージョン (HI) 寒天培地 (栄研) で 18 ~ 24 時間培養後、菌苔を生理食塩液に濃厚に浮遊させ、100℃ 1 時間加熱した菌液を抗原としてスライド凝集反応法で行った。H 型別試験は、SIM 寒天培地で運動性を認めた菌株について、クレイギー管を入れた 0.3% 寒天加 HI 寒天培地を用い、常法⁶⁾によって運動性を増強

1 神奈川県衛生研究所 細菌病理部
〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1
2 前神奈川県衛生研究所 細菌病理部

後、HI ブイヨン培地（栄研）で 18～24 時間培養した培養液を抗原として試験管内凝集反応法で行った。なお、SIM 寒天培地で運動性を認めなかった菌株の H 型は非運動（non motility, NM）とした。

4. PCR 法による遺伝子の検出

血清型が確定した菌株について、ペロ毒素（VT）遺伝子、易熱性腸管毒素（LT）遺伝子、耐熱性腸管毒素（ST）遺伝子、腸管組織侵入性遺伝子（*invE* 遺伝子）および EPEC または EAggEC の病原性への関与が示唆されている *eaeA* 遺伝子^{1,2,4,5)} および *aggR* 遺伝子^{4,5)} を対象とした。PCR は伊藤ら⁷⁾による VT, LT, ST および *invE* 遺伝子検出のための 4 種混合プライマー法、小林ら⁸⁾による *eaeA* および *aggR* 遺伝子検出のための 2 種混合プライマー法で、HI 寒天培地上の純培養菌の微量を精製水 100 μL に懸濁後、100℃ 10 分間加熱した溶液の上清を鋳型 DNA とし、Taq DNA Polymerase (Takara) を使用して行った。反応条件は、4 種混合プライマー法では 94℃ 30 秒、46℃ 30 秒、72℃ 30 秒のサイクルを 25 回、2 種混合プライマー法では 94℃ 90 秒、55℃ 30 秒、72℃ 90 秒のサイクルを 35 回行った。増幅 DNA は 2% アガロースゲル電気泳動を行

い EtBr 染色後 UV ランプ下で目的のバンドを確認した。

結果および考察

散発下痢患者 209 名中 47 名（22.5%）から 48 株の病原大腸菌が分離された。該患者 47 名中 *Campylobacter jejuni* が 3 名から、*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* および *Klebsiella oxytoca* が各 1 名から分離されたが、41 名からは病原大腸菌以外の既知腸管病原菌は分離されなかった。大腸菌の血清型は O 群および H 型の組み合わせで示されるが、検査手技の容易さから日常検査では O 診断用血清のみの使用が一般的で、症例の重要性に応じて H 診断用血清が使用されることが多い。現在、市販の病原大腸菌 O 免疫血清は 43 種類、H 免疫血清は 22 種類あるが、今回分離された大腸菌株はそれらのうち O 群 16 種類、H 型 11 種類に分類され、H 型では他に非運動性（non motility, NM）および型別不能（untypable, UT）株が各々 9 株、10 株であった。大腸菌分離株の血清型を由来患者の年齢別に（表 1）、また各血清型株の一覧および血清型に占める O 群の割合を示した（表 2）。

表 1 散発下痢患者から分離された病原大腸菌血清型の年齢別分離状況

年齢(才)	株数 小計	血清型		株数
		O群	H型	
0	4	15	UT	1
		27	NM	1
		86	UT	1
		18	20	1
1	5	1	20	1
		6	12	3
		148	28	1
2	2	1	7	1
		1	18	1
3	4	1	NM	2
		25	42	1
5	1	63	6	1
		159	11	1
6	3	1	NM	2
		1	UT	1
7	2	6	12	1
		25	UT	1
8	2	1	7	1
		1	18	1
9	2	25	20	1
		158	21	1
10	1	18	12	1

年齢(才)	株数 小計	血清型		株数
		O群	H型	
11	2	146	21	1
		164	12	1
12	1	25	UT	1
14	2	1	NM	1
		1	UT	1
18	2	1	12	2
33	2	1	UT	1
		25	4	1
35	2	18	UT	1
		25	NM	1
36	1	1	7	1
37	1	25	NM	1
38	1	1	7	1
40	2	1	12	1
		126	UT	1
48	1	1	12	1
50	2	1	UT	1
		112	NM	1
51	1	8	19	1
72	1	146	7	1
75	1	6	42	1
合計	48			48

NM: 運動性なし UT: 型別不能

表2 散発下痢患者から分離された病原大腸菌の血清型およびそのO群の占める割合

血清型	株数	O群の割合(%)
O1:H7	4	41.7
O1:H12	4	
O1:H18	2	
O1:H20	1	
O1:NM	5	
O1:UT	4	10.4
O6:H12	4	
O6:H42	1	
O8:19	1	2.1
O15:UT	1	2.1
O18:H12	1	6.3
O18:H20	1	
O18:UT	1	
O25:H4	1	14.6
O25:H20	1	
O25:H42	1	
O25:NM	2	
O25:UT	2	
O27:NM	1	2.1
O63:H6*	1	2.1
O86:UT	1	2.1
O112:NM	1	2.1
O126:UT**	1	2.1
O146:H7	1	4.2
O146:H21	1	
O148:H28	1	2.1
O158:H21	1	2.1
O159:H11	1	2.1
O164:H12	1	2.1

* *eaeA* 遺伝子保有 ** *aggR* 遺伝子保有

病原大腸菌の年齢別検出状況では、1歳児からの分離例(5株)が最も多く、次いで0歳児および3歳児が各4株、6歳児が3株といったように、本菌が乳幼児における主要な下痢原因菌であることを示唆するものであった。一方、血清型は多岐にわたりばらつきが顕著であったが、O群に関しては若干の偏りが認められた。最も多く分離されたO群はO1で、全分離株48株中20株(41.7%)を占めた。木村ら⁹⁾は健康者および散発下痢患者から最も多く分離される大腸菌のO群はO1であったと報告しており、今回の我々の結果もこれに一致した。このことは、病原大腸菌の同定を本菌O免疫血清のみに依存できないことを示しており、病原大腸菌の同定には病原因子の確認が必要になる。しかし病原大腸菌のカテゴリーのうちEPECおよびEAggEC、特にEPECの病原因子診断法は確立されていないことから、これらに関しては少なくともO・H

の組み合わせによる血清型の確認が必要で、このことがEPEC血清型スキームの確立が必要な理由である。

EPECとLT, ST両遺伝子, EIECと*invE*遺伝子, EHECとVT遺伝子との間には深い関連があることは周知の事実である^{1,2,3)}。一方, EPECは乳幼児の胃腸炎の原因菌として知られ^{2,3)}, その多くは培養細胞に対して局在性に付着する^{2,3,4,5)}。また腸管病理像として腸管上皮細胞への接着と微絨毛の破壊(attach and effacing, A/E)が起こると考えられている^{1,2,3,4,5)}。さらに, A/Eに関与する外膜タンパク質のIntiminの存在が示唆されており^{1,2,5)}, *eaeA*遺伝子がIntiminをコードしていることが発見されている^{1,5)}。EAggECは南米, 東南アジアの乳幼児下痢症の原因菌として知られ^{2,3)}, その多くが培養細胞に対して凝集性に付着する^{2,3,4,5)}。病原因子として, 凝集性接着線毛(AAF/I)とその発現に関与する*aggR*遺伝子が明らかにされている⁵⁾。これらのことから*eaeA*遺伝子および*aggR*遺伝子は各々EPECまたはEAggECの病原性関連因子と考えられている^{1,2,4,5)}が, EPECおよびEAggECの血清型と病原因子との関係については未だ不明な点が多い⁵⁾。

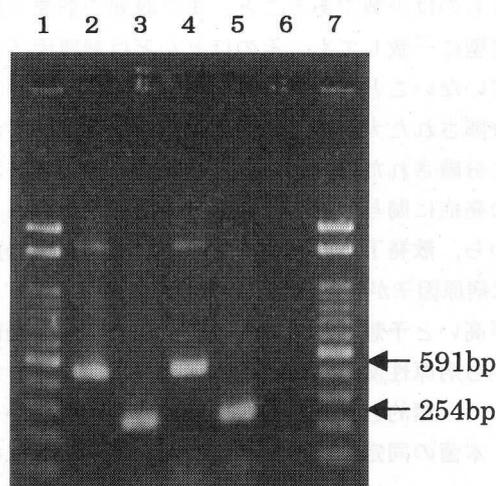


図1 PCR法による*eaeA*および*aggR*遺伝子増幅DNAの電気泳動像

- レーン1,7: 分子量マーカー(100bp Ladder)
- レーン2: 分離株(O63:H6)
- レーン3: 分離株(O126:HUT)
- レーン4: 陽性対照(*eaeA*, 591bp)
- レーン5: 陽性対照(*aggR*, 254bp)
- レーン6: 陰性対照

今回の分離株の血清型について、成書³⁾に記載された下痢患者便から分離され得る ETEC, EIEC, EHEC および EPEC の血清型と比較したところ、O25 : NM (2 株), O25 : H42 (1 株), O27 : NM (1 株) および O148 : H28 (1 株) が ETEC, O112 : NM (1 株) が EIEC, O1 : NM (5 株), O1 : H7 (4 株), O25 : NM (2 株) および O146 : H21 (1 株) が EHEC にそれぞれ該当し、EPEC に該当した血清型はなかった。なお、EAggEC に関しては特定の血清型に限定されることはないといわれている⁵⁾。一方、分離株 48 株について PCR 法により病原性関連遺伝子の有無を試験した結果、O63 : H6 (1 株) から *eaeA* 遺伝子、O126 : HUT (1 株) から *aggR* 遺伝子が検出されたただけであった (表 2, 図 1)。*eaeA* 遺伝子が検出された O63 : H6 は成書³⁾に記載の EPEC 血清型に該当しておらず、逆に ETEC, EIEC および EHEC 血清型に該当した株は各々のカテゴリーに一致する遺伝子を保有していなかった。さらに EAggEC には特定の血清型は存在しないと考えられていることから、現段階では血清型から病原大腸菌のカテゴリーを推測することは困難であると思われた。

以上のことから、下痢患者から分離された大腸菌の血清型は多岐にわたり既知の病原大腸菌の血清型に一致するものは少数であること、また既知の病原大腸菌の血清型に一致しても、そのほとんどは病原因子を保有していないことが明らかとなった。しかしながら、今回分離された大腸菌はいずれも急性期下痢患者から優勢に分離されたものであり、少なからず下痢または腸炎の発症に関与した病原大腸菌であると思われる。すなわち、散発下痢患者から分離される病原大腸菌の多くは病原因子が特定されていない EPEC に属する可能性が高いと予想された。一方、今回の病原大腸菌分離株から病原性関連遺伝子の検出数が少数であった理由として、標的とした当該遺伝子の種類が少なかったこと、本菌の同定に血清学的診断法を優先した点など

が考えられる。今後は病原性関連遺伝子の検出を優先した検査法を実施することによって、大腸菌の血清型と病原性の関係についてさらに追求していきたい。

(平成14年7月24日受理)

文献

- 1) 渡辺治雄 : 細菌感染の分子医学—その新展開, 初版, 24-34, 羊土社, 東京 (1995)
- 2) 厚生省生活衛生局 : 下痢原性大腸菌, 食中毒予防必携, 初版, 58-64, 日本食品衛生協会, 東京 (1998)
- 3) Cheryl A.B., Frances W.B., Joy G.W., and Nancy A.S, Escherichia, Shigella, and Salmonella, Manual of Clinical Microbiology, 7th, 459-474 (1999)
- 4) Nataro JP, Kaper JB : Diarrheagenic Escherichia coli, J. Clin. Microbiol. Rev, 11, 142-201 (1998)
- 5) 森屋一雄, 角典子, 中尾昌弘, 山崎貢, 齊藤眞, 伊藤健一郎 : 散発下痢症患者及び健康乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EAggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA* の保有状況について, 感染症誌, 74, 134-141 (2000)
- 6) 伊藤武 : 下痢原性大腸菌の検査法, 検査と技術, 20, 981-987 (1992)
- 7) 伊藤文明, 荻野武雄, 伊藤健一郎, 渡辺治雄 : 混合プライマーを用いた PCR による下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法, 日本臨床特別号, 52, 343-347 (1992)
- 8) 小林一寛 : 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, 平成11, 12年度 厚生科学研究費補助金健康科学総合研究事業報告, 1-14 (2001)
- 9) 木村晋亮, 小崎明子, 佐々木富子, 小松原彰 : 散発下痢症患者および健康者から分離された糞便由来大腸菌 O 抗原血清型の比較と地域差, 感染症誌, 73, 53-60 (1999)