

## 香川県内で検出されたヒト由来大腸菌の病原因子保有状況

Pathogenic factor prevalence of human-derived *E. coli* was detected  
in Kagawa Prefecture

岩下 陽子                      安藤 友美                      有塚 真弓  
Yoko IWASHITA              Tomomi ANDO              Mayumi ARIZUKA  
福田 千恵美                      内田 順子  
Chiemi FUKUDA              Junko UCHIDA

## 要 旨

2014年1月から2015年6月までに香川県内の病院で検出された大腸菌のうち、O群血清型別試験により型別でき、かつVero毒素またはVT遺伝子が確認されなかった菌株を対象とし、病原因子の保有状況を調査した。対象菌株117株のうち、病原因子が検出されたのはわずか12株(10%)であった。

大腸菌の病原性は血清型と相関関係があり、通常ある特定の血清型に属するとされている。また、病原体検出情報システムでは、2012年1月に分類方法が改訂されるまで腸管病原性大腸菌(EPEC)の定義がO群血清型別に基づいていた。しかし、EPECの対象となっているO群にも既知の病原因子を持たないものが多いことから、病原因子に基づくように改訂された。今回の調査でも下痢原性大腸菌の検査には血清型分類の前に直接病原因子を検出することが確実かつ効率的な方法であると再確認された。

## Abstract

Among the *E. coli* was detected in Kagawa prefecture hospital in January 2014 to June 2015, can type another by O group serotype-specific test, and is intended for Vero toxin or VT gene is not confirmed strain, We investigated the prevalence of pathogenic factor. Among the target strain 117 shares, the pathogenic agent was detected was only 12 strains (10%). In January 2012, the classification method of diarrheagenic *E. coli*, has been revised to be based on the pathogenic agent. But revised before it was done on the basis of the group O serotype. Inspection agency that is doing the group O serotyping as a screening of diarrheagenic *E. coli* even now there are many.

However, it is the inspection of diarrheagenic *E. coli* is important to detect the pathogenic agent before the serotyping was reaffirmed.

キーワード：下痢原性大腸菌 病原因子 PCR法 O群血清型

## I はじめに

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、ヒトや動物の腸管に存在し、多くは病原性を持たないが、一部にヒトの下痢症に起因するものが存在する。これらの大腸菌は下痢原性大腸菌と総称され、病原機序の違いによって腸管出血性/Vero毒素産生性大腸菌(EHEC/VTec)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管凝集付着性大腸菌(EAggEC/EAEC、以下EAggEC)、他の下痢原性大腸菌に分類される。また、これらの鑑別には、病原因子の検出が必要である。国立感染症研究所病原体検出情報システムにおいてもEPECの分類方法が、O群血清型に基づく方法で行われていたが、対

象となっているO群にも既知の病原因子を持たないものが多いことから、2012年1月に表1に示すとおり病原因子に基づく方法に改訂された<sup>1)</sup>。

今回医療機関で分離され、O群血清型別試験により型別された大腸菌のうち、EHECを除く菌株を収集し、下痢原性大腸菌の病原因子保有状況を調査した。

## II 方法

## 1 対象

2014年1月から2015年6月までに香川県内の医療機関で分離された大腸菌のうち、O群血清型別試験により型別でき、かつVero毒素またはVT遺伝子が確認されな

かった菌株 117 株を対象とした。

## 2 方法

0 群、H 血清型別と、病原因子保有の有無を調査した。

(1) 血清型別試験：病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて行った。

### a 0 群別試験

普通寒天平板培地(日水)で好氣的条件下、37°Cで一晩(18~24時間)培養した菌体を掻き取り、生理食塩液に浮遊し、121°C 15分間加熱処理をした後、15000rpm 90秒遠心分離し、沈査を生理食塩液で再浮遊して試料とし、スライド凝集法<sup>2)</sup>により0群を特定した。

### b H型別試験

クレイギー管の入ったSIM半流動培地(日水)を用いてクレイギー管内部に検体を接種し37°Cで培養し半流動

培地内を通過した菌をクレイギー管の外側から釣菌する操作を3~5回繰り返して運動性を増強した。この検体をTryptic Soy Broth (BD) 10mlに接種し、37°Cで4時間静置培養した。増殖を確認した培養液に、10vol%ホルマリン加生理食塩液を0.5ml加え、十分に混合して試料とし、試験管凝集法<sup>2)</sup>によりH型を特定した。

(2)病原因子検出:1コロニーを5%キレックス溶液200μlに懸濁し、100°C 10分加熱後、15000rpm 90秒遠心分離した上清をテンプレートとした。invE、VT1、VT2、LT1、ST1a、ST1b、VT2f、aggR、astA、eae、afa、11種のプライマーを用いて伊藤ら<sup>3)</sup>の方法でPCR法を行い、得られた増幅産物をアガロース電気泳動法により病原因子検出を行った。

表1 下痢原性大腸菌の分類

分類	発症機序	主な病原因子 またはマーカー	定義
腸管出血性大腸菌/ Vero毒素産生性大腸菌 (EHEC/VTEC)	毒素	VT1、VT2	Vero毒素(VT)産生性あるいはVT遺伝子が確認されたもの
腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)	毒素	LT1、ST1a、 ST1b	易熱性エンテロトキシン(LT)、耐熱性エンテロトキシン(ST)、あるいはその両者の産生性あるいは毒素遺伝子が確認されたもの
腸管侵入性大腸菌 (EIEC)	侵入性	invE、ipaH	組織侵入性プラスミドを保有していること、あるいは組織新入生遺伝子が確認されたもの
腸管病原性大腸菌 (EPEC)	細胞局在 付着性	eae、bfpA、EAF	培養細胞への局在付着性または、それに関連する遺伝子が確認されたもの(VT、LT、ST、侵入性が確認されたものを除く)
腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC)	細胞凝集 付着性	aggR、CVD432	培養細胞への凝集付着性または、それに関連する遺伝子が確認されたもの(VT、LT、ST、侵入性が確認されたものを除く)
他の下痢原性大腸菌	不明	afa、astA、 CDT、cnf	上記5つに該当しないが胃腸炎の原因と考えられるもの、生化学的性状が同じものが多数の患者より検出された場合

## III 結果

対象とした大腸菌117株の0群血清型と病原因子検出数を図1及び、表2に示す。EPEC、EAggEC、他の下痢原性大腸菌の3種類が検出された。

EPEC病原因子(eae)が2株(1.7%)、EAggEC(aggR)が7株(6%)、他の下痢原性大腸菌に分類される病原因子(afa、astA)が3株(2.6%)検出されたが、105株(90%)

は病原因子が検出されなかった。

検出された下痢原性大腸菌分類と0群、H血清型を表3に示す。EPECでは026:H-1株、0142:H341株、EAggECのうち、aggRのみ保有が086a:H-3株、0111:HUT1株、0127a:H212株、aggR+astA保有が0126:HUT1株、他の下痢原性大腸菌のうち、astAのみ保有が01:H421株、025:H41株、afa+astA保有が025:H41株であった。

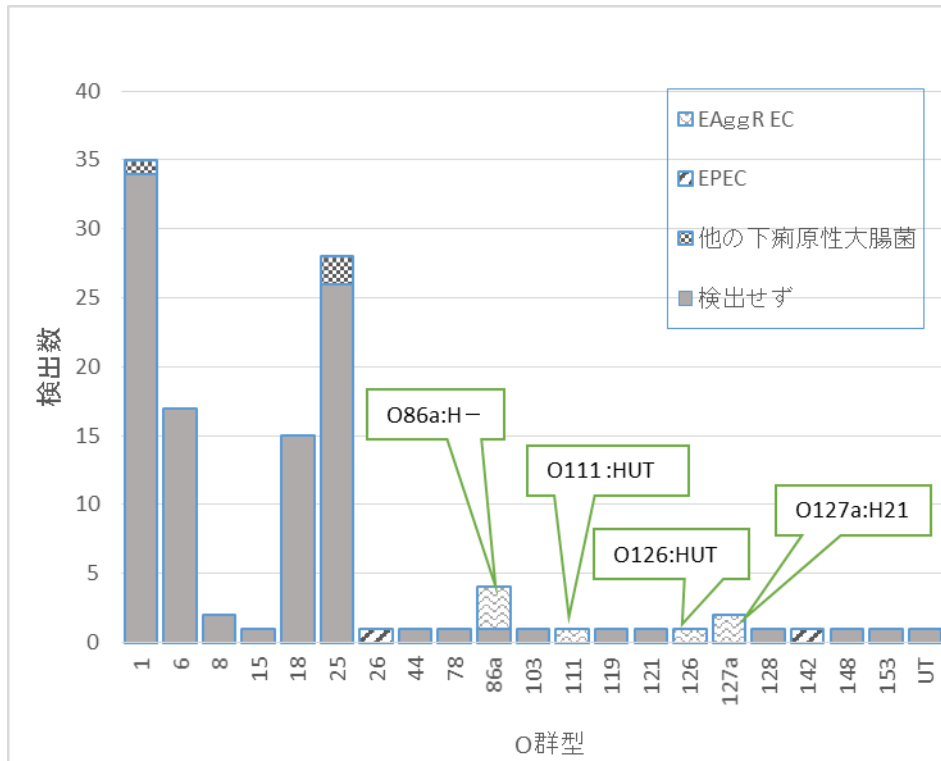


図1 下痢原性大腸菌検出数

表2 O群血清型別病原因子検出数

分類 O群	検出せず	EPEC		EAggEC		その他の下痢原性大腸菌		総計
		eae	aggR,astA	aggR	afa,astA	astA		
1	34					1	35	
6	17						17	
8	2						2	
15	1						1	
18	15						15	
25	26				1	1	28	
26	0	1					1	
44	1						1	
78	1						1	
86a	1			3			4	
103	1						1	
111	0			1			1	
119	1						1	
121	1						1	
126	0		1				1	
127a	0			2			2	
128	1						1	
142	0	1					1	
148	1						1	
153	1						1	
UT	1						1	
総計	105	2	1	6	1	2	117	

※太字 改正以前はEPECとして分類されていた血清型

表3 検出された下痢原性大腸菌分類と血清型

EPEC		EAggEC				その他の下痢原性大腸菌			
eae		aggR,astA		AggR		afa,astA		astA	
026:H-	(1)	0126:HUT	(1)	086a:H-	(3)	025:H4	(1)	01:H42	(1)
0142:H34	(1)			0111:HUT	(1)			025:H4	(1)
				0127a:H21	(2)				
小計	(2)	小計	(1)	小計	(6)	小計	(1)	小計	(2)

#### IV 考察

大腸菌の病原性は血清型と相関関係があり、通常ある特定の血清型に属するとされ<sup>9)</sup>、それぞれの分類に対する主な血清型が知られている<sup>9) 10) 11)</sup>。

今回調査対象とした0群血清型別された大腸菌117株のうち、下痢原性大腸菌の病原因子が検出されたのはわずか10%であった。

また、下痢原性大腸菌の分類方法の改訂前にEPECに分類されていた血清型の中で、今回収集した01、018、026、044、086a、0111、0119、0126、0127a、0128、0142、11種63株のうち、EPECの病原因子eaeが検出されたのは2株(3.2%)のみであった。

EAggECに分類された血清型は、086a:H-、0127:H27、0111:HUT、0126:HUTの4種であったが、この血清型はaggRを保有する株が高率に存在していた。また、木村らの報告<sup>4)</sup>とも一致していた。このことからEAggECにおいては血清型との関連は認められる。しかし、病原因子を保有しているが血清型別できない株の存在やそれらを原因とする食中毒事例も報告されており<sup>4) 5) 6) 7) 8)</sup>、血清型を用いたスクリーニングでは、これらは見落とされる。また、0群血清型別できた菌株のうち、病原因子を持たないものが90%を占めるため、効率的とは言えない。このことから下痢原性大腸菌の検査には血清型の検査をする前に直接病原因子の検出を行うことが確実かつ効率的な方法である。

#### V まとめ

1 今回0群血清型別がされた菌株を対象としたが、そのうちの90%は病原因子不検出であった。

2 EAggECに分類された、086a:H-、0127:H27、0111:HUT、0126:HUT血清型4種ではaggRを保有する株が高率に存在しており、EAggECにおいては血清型との関連が認めら

れた。

3 0群血清型別できない株にも病原因子を保有するものの存在や、それらを原因とする食中毒事例も報告されていることから、下痢原性大腸菌の検査には病原因子血清型別の前に直接病原因子の検出をすることが、確実に効率的な方法であることが再確認された。

#### 文献

- 1) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, Vol. 33 No. 1, 1-7 (2012)
- 2) 病原大腸菌免疫血清「生研」添付文書
- 3) 伊藤健一郎他: 平成23年度 新興再興感染症技術研修遺伝子検査法
- 4) 木村千鶴子他: 小児感染性胃腸炎患者からの腸管凝集付着性大腸菌の検出状況, 愛媛県立衛生環境研究所年報, 16, 1-6 (2013)
- 5) 加藤玲他: 感染症学雑誌, Vol. 76 No. 9, 721-729 (2002)
- 6) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, Vol. 23 No. 9, 229-230 (2002)
- 7) 濱田まどか他: 感染症発生動向調査事業における下痢原性大腸菌の検出状況, 鹿児島県環境保健センター所報, 14: 59-62
- 8) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, Vol. 33 No. 1, 8-9 (2012)
- 9) 坂崎利一: 新訂食水系感染症と細菌性食中毒, 210-297 (2000)
- 10) 中西寿男・丸山務監修: 食品由来感染症と食品微生物, 250-305 (2009)
- 11) 勢戸和子: 下痢原性大腸菌, モダンメディア 57巻, 1, 25-28 (2011)