

下痢原性大腸菌における付着因子保有状況と それに基づく大腸菌検査法の一考察

大阪府立公衆衛生研究所¹⁾, 秋田県衛生科学研究所²⁾, 新潟県保健環境科学研究所³⁾, 山梨県衛生公害研究所⁴⁾,
石川県保健環境センター⁵⁾, 神奈川県衛生研究所⁶⁾, 愛知県衛生研究所⁷⁾, 滋賀県立衛生環境センター⁸⁾,
高知県衛生研究所⁹⁾, 福岡県保健環境研究所¹⁰⁾, 宮崎県衛生環境研究所¹¹⁾, 国立感染症研究所¹²⁾

小林 一寛¹⁾ 勢戸 和子¹⁾ 八柳 潤²⁾ 斉藤志保子²⁾
寺尾 通徳³⁾ 金子 通治⁴⁾ 芹川 俊彦⁵⁾ 倉本 早苗⁵⁾
藤沢 倫彦⁶⁾ 鈴木理恵子⁶⁾ 山崎 貢⁷⁾ 林 賢一⁸⁾
松根 渉⁸⁾ 安岡 富久⁹⁾ 堀川 和美¹⁰⁾ 村上 光一¹⁰⁾
河野喜美子¹¹⁾ 山田 亨¹¹⁾ 伊藤健一郎¹²⁾

(平成 14 年 4 月 30 日受付)

(平成 14 年 7 月 24 日受理)

Key words : adherence factor, PCR, differentiation method, *Escherichia coli*, diarrhea

要 旨

下痢原性の大腸菌 (*Escherichia coli*) の同定は腸管毒素産生性, 腸管細胞侵入性, 血清型別によって非病原性菌と区別される。しかしながら, 血清型別された菌株は下痢原性大腸菌と決定することにほとんど役立たない。近年, 腸管上皮細胞への付着株が腸管病原性であるという多くの信頼できる論文がある。

本研究では, EHEC, ETEC, EIEC, EPEC, 非 EPEC に区別した下痢原性株と非下痢原性の各カテゴリー *E. coli* の 1,748 株について付着因子の遺伝子に関係する *eaeA*, *aggR*, *bfpA* と EAST1 の *astA* を PCR 法によって調べた。試験株にはいろいろな保有パターンが認められ, EHEC, EPEC, 非 EPEC 株の大多数は *eaeA* あるいは *aggR* を保有していた。EHEC では *eaeA* 単独保有が最も高率な型で, この型は血清型 O157, O26, O111, O103, O119 でみられた。EPEC と非 EPEC は *eaeA* あるいは *aggR* に *astA* を保有するものとしなないものがみられた。ヒト由来の EPEC, 508 株のうち 137 株 (27.0%) は *aggR* を保有し, 74 株 (14.6%) は *eaeA* を保有していたが, ヒト以外の 91 株では *aggR* と *eaeA* はそれぞれ 2 株 (2.2%) と 11 株 (12.1%) に認められた。またヒト由来の非 EPEC, 266 株のうち 16 株 (6.0%) は *aggR* を保有し, 58 株 (21.8%) は *eaeA* を持っていた。一方, ヒト以外由来の 316 株中 22 株 (7.0%) は *eaeA* を保有したが *aggR* 保有株はなかった。EIEC, 13 株と ETEC, 218 株の検査では ETEC の 6 株だけが *eaeA* か *aggR* のどちらかを持っていた。*astA* 遺伝子は全カテゴリー株にみられ, ETEC で最も多くみられた。*bfpA* 遺伝子はヒトの下痢患者から分離した血清型 O157 : H45 により多く認められたが, この菌株は EPEC 血清型ではない。

下痢症を起こす *E. coli* 株の識別法がないため, 多くの検査室では同定ができない。著者らは *E. coli* 株の付着性因子の遺伝子を検出するには PCR 法が簡単に迅速な方法であることを確認した。これらの結果からわれわれは付着性因子, 腸管毒素産生性, 侵入性に関連した PCR 法を用いた鑑別法を示し, それを用いることは下痢原性 *E. coli* の同定に合理的であり, 有用な方法であることを確信する。

[感染症誌 76 : 911 ~ 920, 2002]

別刷請求先 : (〒537 0025 大阪市東成区中道1 3 69
大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部微生物課
小林 一寛

平成14年11月20日

序 文

下痢原性大腸菌には病原的機序の違いによって腸管出血性大腸菌 (EHEC) または志賀毒素産生性大腸菌 (STEC), 腸管組織侵入性大腸菌 (EIEC), 腸管毒素原性大腸菌 (ETEC), 腸管病原性大腸菌 (EPEC) の4 カテゴリーに大別されている。この分類法は日常の下痢原性大腸菌検索における菌種同定に用いられているが, 毒素産生性や細胞侵入性などの病原因子が容易に検査できるものは多くの検査施設で分離・同定されているが, 病原因子が明らかではない EPEC は多くの診断用血清を使った型別結果だけで同定され, 特定の血清型ではない株 (Non-EPEC) を非下痢原性大腸菌としている。

近年, 腸管粘膜上皮細胞への付着性そのものが下痢発現の重要な病原因子と考えられ, 数種類の付着様式が明らかになり, これまでのカテゴリーとは別の下痢原性大腸菌が分類されている。

そこでこれまでに分離後保存されている各カテゴリーの大腸菌株における付着因子の保有状況を調べ, その結果から日常検査における下痢原性大腸菌の鑑別法を示した。あわせて付着性を保有する新しいカテゴリーの一つである凝集付着性大腸菌 (EAggEC) が産生する毒素 (EAST1) 遺伝子領域についても付着遺伝子との関連を調べた。

材料と方法

被検菌株: 各施設で保存されているヒト由来 1,155 株とヒト以外材料由来 593 株の合計 1,748 株を実験に供した。被検株は分離時に同定した EHEC, ETEC, EIEC, EPEC と Non-EPEC に分類して集計した。なお EPEC は施設ごとで同定時に使用している血清型表が異なっているため本研究では, それぞれの血清型表を基にして統一した血清型表を作成し (Table 1), それに従って分類した。なお H 型別未実施あるいは型別不能で O 血清型が表中に記載されているものは EPEC に含め, 集団発生関連株は 1 株として集計した。

PCR 法: 施設間で可能な限り同じ条件で PCR 法を行うため以下のごとく方法を統一した。付着様式が異なる 3 種類の付着性関連遺伝子領域 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*) と EAST1 毒素遺伝子領域

(*astA*) を検出するプライマーを一施設でカスタム合成し, *eaeA* と *aggR* (Pr-*eae* と Pr-*agg*), *bfpA* と *astA* (Pr-*bfp* と Pr-*ast*) の2種類ずつを混合, マルチプライマー原液として最終濃度を 0.2 μ M で使用した (Table 2)。

テンプレート作成は, 普通寒天平板上の集落を滅菌蒸留水に一夜培養菌液程度の濁度に浮遊し, 100 μ l, 10 分加熱後, 15,000rpm, 5 分の遠心上清を 5 μ l 供した。PCR 法の試薬は全施設とも同一ロットの 25 μ l 用 Ready-To-Go (アマシャムバイオサイエンス) に調整し, 施設ごとの増幅器 (サーマルサイクラー) にて増幅を行った。増幅ファイルは, 94 $^{\circ}$ C, 2 分前加熱後, 94 $^{\circ}$ C, 45 秒 55 $^{\circ}$ C, 2 分 72 $^{\circ}$ C, 1 分の 25 サイクル後, 72 $^{\circ}$ C, 5 分で最終伸展させた。電気泳動には 100bp ladder DNA サイズマーカー (タカラ) を用いた以外は写真撮影とともに各施設の装置で行った。

既知の病原因子確認: ETEC の易熱性毒素 (LT), 耐熱性毒素 (ST), EHEC の志賀毒素 (Stx) の産生性はそれぞれ VET-RPLA, コリスト EIA, VTEC-RPLA (いずれもデンカ生研) と関連領域の PCR 法によって分離時に確認した。また EIEC の細胞侵入性についても各施設の PCR 法による結果を使用した。

成 績

大腸菌のカテゴリー別, 由来別保有状況は (Table 3), ヒト由来では 1,155 株中 648 株 (56.1%), ヒト以外由来では 593 株中 209 株 (35.2%) がいずれかの遺伝子を保有しており, 陰性のものはヒト以外由来株に多くみられた。保有株のうち付着因子だけの保有はヒト由来では 473 株 (73.0%), ヒト以外由来では 119 株 (56.9%) でヒト由来株に多数の保有株がみられた。被検数のうち *eaeA* 保有は 317 株 (27.4%) と 117 株 (19.7%), *aggR* は 156 株 (13.5%) と 2 株 (0.3%) でいずれもヒト由来株に多くみられた。*bfpA* 保有は極めて少なくヒト由来 15 株 (1.3%) とヒト以外由来 2 株 (0.3%) のみであったが全株 *eaeA* も保有していた。

各下痢原性大腸菌のカテゴリー別付着因子保有状況は, EHEC では (Table 4) ヒト由来 202 株とヒト以外由来 134 株を調べた。*eaeA* 保有がもっと

Table 1 Serotypes of EPEC strain in this study

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

NM ; non-motile

Table 2 Primers used for amplification in this study

Target genome	Target size (bp)	Primers		Sequences
		name	mixed	
<i>eaeA</i>	591	eaek1	Pr-eae	5'-gct tag tgc tgg ttt agg at
		EA2		5'-ctc tgc aga tta acc tct gc
<i>bfpA</i>	326	EP-1	Pr-bfp	5'-aat ggt gct tgc gct tgc tgc
		EP-2		5'-gcc gct tta tcc aac ctg gta
<i>aggR</i>	254	aggRKs1	Pr-agg	5'-gta tac aca aaa gaa gga aga
		aggRKs2		5'-aca gaa tgc tca gca tca gc
<i>astA</i>	106	EAST-1S	Pr-ast	5'-gcc atc aac aca gta tat cc
		EAST-1AS		5'-gag tga cgg ctt tgt agt c

も多く、ヒト由来では 181 株 (89.6%)、ヒト以外由来で 84 株 (62.7%) とかなり高率であるが、*aggR* は単独保有のヒト由来 1 株 (0.5%) が認められただけで *bfpA* 保有はみられなかった。*astA* 保有も少数で単独保有、5 株と *eaeA* との複数保有の 12 株であった。これを血清型でみると、わが国で主要な O157、O26、O111 の 3 血清型は、由来に関係なく全株が *eaeA* を保有しているのに対し、これ以外の血清型では *eaeA* 保有率が高いもの (O103、O119 など) や低いもの (O91、O139 など) があつた。

EPEC のヒト由来 166 株とヒト以外由来 52 株では (Table 3)、*astA* 単独保有が 107 株 (64.5%) と 24 株 (46.2%) で最も多く、付着因子保有はヒト由来株のみでみられ、*eaeA*、*aggR* 保有が 4 株 (2.4%) と 2 株 (1.2%) だけであつた。毒素型別にみると (Table 5)、ヒト由来株の *astA* 保有は *eaeA*

あるいは *aggR* との同時保有も含めた 110 株のうち、ST 産生株は 105 株 (95.5%) であるのに対して LT 産生株は 31 株 (28.2%) で、ST 産生との関連を示す結果であつた。一方ヒト以外由来株では *astA* 単独保有が 24 株みられ、このうち 18 株 (75.0%) が LT 産生株で、ヒト由来株と異なる結果を示した。

EIEC は被検 13 株すべて下痢症由来であつたが (Table 3)、今回調べた 3 種類の付着性遺伝子はすべて陰性で、1 株の *astA* 単独保有を認めただけであつた。

EPEC はヒト由来 508 株、ヒト以外由来 91 株について調べた (Table 3)。ヒト由来では *eaeA* あるいは *aggR* 保有がそれぞれ 74 株 (14.6%) と 137 株 (27.0%)、ヒト以外由来ではそれぞれ 11 株 (12.1%) と 2 株 (2.2%) で、*eaeA* 保有には差はないが、

Table 3 Detection of the gene(s) associated with adherence factors and ST-like toxin (EAST1) on *E. coli* categories

<i>E. coli</i> categories	Sources	No. of strains examined (%)	Patterns (%)						Negative	
			<i>eaeA</i> <i>bfpA</i> <i>astA</i>	<i>eaeA</i> <i>bfpA</i>	<i>eaeA</i> <i>astA</i>	<i>eaeA</i>	<i>aggR</i> <i>astA</i>	<i>aggR</i> <i>astA</i>		
EHEC	human	202 (100)			9 181 (89.6)	172		1 (0.5)	1 (0.5)	19 (9.4)
	non-human	134 (100)			3 84 (62.7)	81			4 (3.0)	46 (34.3)
ETEC	human	166 (100)			1 4 (2.4)	3	2 (1.2)		107 (64.5)	53 (31.9)
	non-human	52 (100)							24 (46.2)	28 (53.8)
EIEC	human	13 (100)							1 (7.7)	12 (92.3)
	non-human	0								
EPEC	human	508 (100)		2	3 74 (14.6)	69	88 137 (27.0)	49	23 (4.5)	274 (53.9)
	non-human	91 (100)		1	11 (12.1)	10	2 (2.2)		21 (23.1)	57 (62.6)
Non-EPEC	human	266 (100)	12	1	4 58 (21.8)	41	3 16 (6.0)	13	43 (16.2)	149 (56.0)
	non-human	316 (100)		1	22 (7.0)	18			41 (13.0)	253 (80.1)
Total	human	1,155 (100)	12	3	17 317 (27.4)	285	93 156 (13.5)	63	175 (15.2)	507 (43.9)
	non-human	593 (100)		2	117 (19.7)	109	2 (0.3)		90 (15.2)	384 (64.8)

aggR 保有では明らかにヒト由来株に高率であった。EPEC の O 血清型による保有状況 (Table 6) は、ヒト由来では下痢患者から検出される頻度が高い O1 と O18 の付着因子保有は非常に少数であるが、O111、O126、O86 では *aggR* 保有がそれぞれ 62 株中 54 株 (87.1%)、50 株中 37 株 (74.0%)、44 株中 27 株 (61.4%) と高率で、とくに O111、O126 では *aggR* + *astA* 保有型で、O86 の多くは *aggR* 単独型であった。ヒト以外由来では各血清型の被検株数が少なく付着因子保有状況の特徴は明らかではないが、O1 の *astA* 単独保有はヒト由来株より著明に高く、55.6% にみられた。一方、EPEC、O55 や O26 では *aggR* 保有は全く認められず、すべて *eaeA* 保有で、とくにヒト由来株ではそれぞれ 31 株中 29 株 (93.5%)、21 株中 15 株 (71.4%) と

いう高頻度で、保有率からみると EHEC、O157 や O26 に類似した *eaeA* 保有型を示した。

日常検査上で非病原性株として扱われている Non-EPEC は、ヒト由来 266 株とヒト以外由来 316 株について調べた (Table 3)。ヒト由来株における *eaeA*、*aggR* 保有はヒト以外由来 (それぞれ 7.0%、0%) より高率で (21.8%、6.0%)、有意の差がみられた。ヒト由来の Non-EPEC を EPEC と比較すると *eaeA* 保有は EPEC の 14.6% より高率 (21.8%) であったが、*aggR* は反対に EPEC の 27.0% よりかなり少数 (6.0%) であった。

bfpA 保有は 17 株認められたが (Table 3)、下痢患者由来株は全て Non-EPEC 血清型で、とくに血清型 O157:H45 が 7 株、O153:H21 と OUT:H12 が各 1 株であった。EPEC では *eaeA* + *bfpA* 保

Table 4 Patterns of harboring gene(s) on the O-serogroup of EHEC

Sources	O-serogroup	No. of strains examined (%)	Patterns (%)					Negative (%)	
			<i>eaeA</i> <i>bfpA</i> <i>astA</i>	<i>eaeA</i> <i>bfpA</i>	<i>eaeA</i> <i>astA</i>	<i>eaeA</i>	<i>aggR</i> <i>astA</i>		<i>aggR</i>
Human	O157	104 (100)			4 104 (100)	100			
	O26	31 (100)			4 31 (100)	27			
	O111	23 (100)				23 (100)			
	others*	44 (100)			1 23 (52.3)	22	1 (2.3)	1 (2.3)	19 (43.2)
	Total	202 (100)			9 181 (89.6)	172	1 (0.5)	1 (0.5)	19 (9.4)
Non-human	O157	48 (100)			1 48 (100)	47			
	O26	3 (100)				3 (100)			
	O111	3 (100)				3 (100)			
	others*	80 (100)			2 30 (37.5)	28		4 (5.0)	46 (57.5)
	Total	134 (100)			3 84 (62.7)	81		4 (3.0)	46 (34.3)

* Mainly O119, O103, O139 and O-untypable serogroup were included.

有の3株がみられたがいずれも無症状者由来であった(1株は不明)。

EPECとNon-EPECの両カテゴリー間には血清型以外に同定のための毒素産生性などの既知病原因子がみられず、付着因子に関する*eaeA*や*aggR*保有株が多数認められたことは、両者の鑑別にはこれらの付着因子を考慮した検査法が合理的と考えられる。

考 察

*eaeA*や*bfpA*の付着因子だけでは病原性発現には至らないとする報告¹⁾やEHECとEPECの*eaeA*に相違があるとする報告²⁾、さらにDAECの付着性は均一ではなくその全ての菌株が下痢症に関連するものではないとする考えもあり³⁾、付着因子についてはなお多くの解決しなければならない問題があるが、細胞への付着性そのものが病原因子としての役割を持ち⁴⁾、付着性を保有する

大腸菌も下痢原性菌とするようになってきている⁵⁾。その付着様式には局限(LA)型、分散(DA)型、凝集(Agg)型に区別されるがそれぞれの関連遺伝子が明らかにされPCR法によって検出が可能となっている。今回各カテゴリーに同定され保存中の菌株について調べたものであるが、EHECやETECでもEPECやEAggECと同じ*eaeA*や*aggR*を保有するもの、各カテゴリーの定義となっている毒素以外にEAggECの毒素遺伝子(*astA*)を同時に保有するものがみられた。これらの性質がStx,LT,STと腸管上皮細胞への付着や下痢発現にどのように関連しているのか、また今回調べた付着因子とは別のcolonization factor antigen(CFA)によるとされているETECの中にも*eaeA*や*aggR*保有株が認められたが、これらの付着因子がCFAとどのような関連性をもっているのかあるいは腸管内定着に関連しているのか今後

Table 5 Detection of adherence factor gene and EAST1 gene on ETEC

Sources	Toxin type(s)	No. of strains examined (%)	Gene (%)				Negative (%)
			<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	
Human	ST・LT	36 (100)	1			26 (72.2)	9 (25.0)
	ST	112 (100)	3 (2.7)		2 (1.8)	79 (70.5)	31 (27.7)
	LT	18 (100)				5 (27.8)	13 (72.2)
	Total	166 (100)	4 (2.4)		2 (1.2)	110 (66.3)	53 (31.9)
	Non-human	ST・LT	6 (100)			6 (100)	
	ST	31 (100)			6 (19.4)	25 (80.6)	
	LT	14 (100)			12 (85.7)	2 (14.3)	
	unknown	1				1	
	Total	52 (100)				24 (46.2)	28 (53.8)

明らかにしなければならない。

EPEC は集束線毛(BFP)による細胞への緩やかな付着とそれに続く細胞内インチミン増量が重要な病原的機序とされており、それに関係する2種類の付着因子を調べた。第一段階のBFPの存在を示す*bfpA* 保有株は極めて少なく無症状者由来の2株だけであったのに対し、第二段階の*eaeA* 単独保有は多数認められたことは、本カテゴリーの下痢発現にはBFP線毛は必須ではないことを示唆している。これについてはインチミン増量による細胞骨格傷害(A/E)を起こすが非接着性株や分散型付着性株、*bfpA* 陰性であるがA/Eを起こす菌株による下痢症の報告⁶⁾がみられる。またNon-EPECでもEPECと同様に*eaeA* 保有型と*aggR* 保有型が混在しており、両カテゴリー間には有意の差が認められなかったことからEPECの*eaeA* 保有株および*aggR* + *astA* 保有株や*aggR* 単独保有株(カテゴリーからはEAggECに分類される)で、特定の血清型はこのEPECのカテゴリーが存在する限りは付着性因子を保有するEPECと同定することが現状に合うと考えた。また各種の病

原因子をもたない大腸菌は従来のEPECと非下痢原性大腸菌が存在するが、EPECについては多くの菌株を使用した病原的研究による検討が必要と考えられる。なお*aggR* 単独保有の下痢起病性については著者らはEPEC, O126:H12による保育所集団発生事例(2001年11月大阪府内発生, 未発表)を経験している。なお今回調査しなかったDAECも病原的意義が確立されたならば分散型付着の関連遺伝子(*daa*)をPCR法によって確認することができる⁷⁾。

astA 単独保有は全カテゴリーでみられたが下痢原因菌とする報告がある⁸⁾が、ヒト以外由来株に多いこともあり今後臨床症状との関連および生物学的方法による下痢起病性の検討により分類されるカテゴリーの検討が必要である。またこの遺伝子はヒト由来のETECではST産生株と、ヒト以外由来ではLT産生株で高率に認められたが、この相違についても病原的意義を含めて今後多数の菌株による調査と細菌学的、遺伝学的研究が必要である。

EHECの成立を考察すると、*eaeA* 保有の

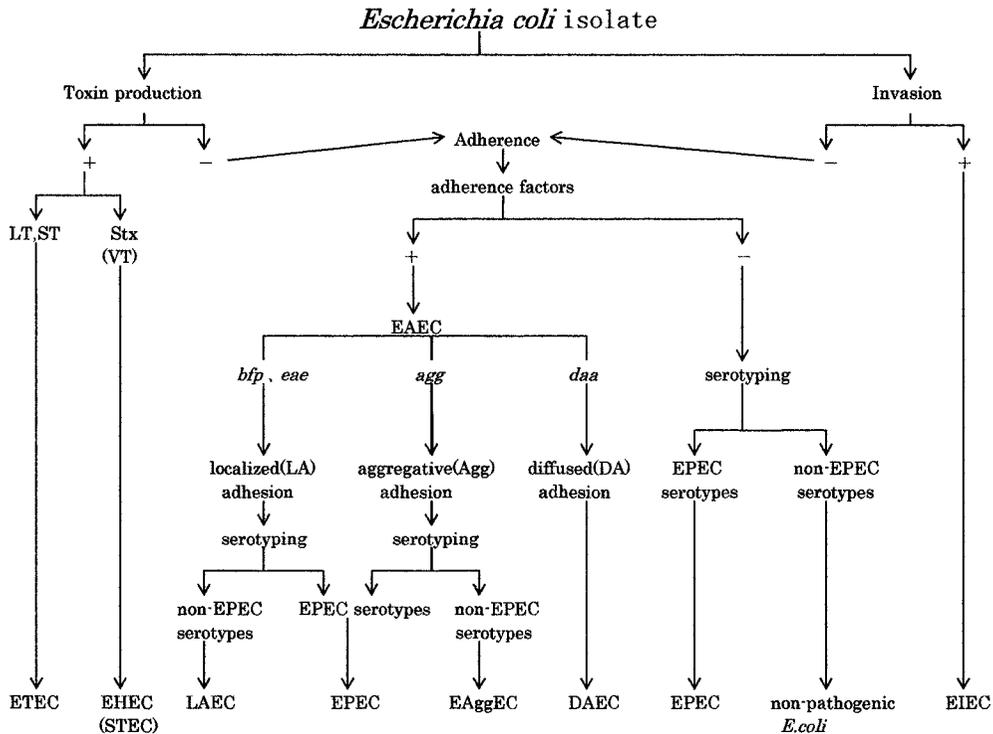
Table 6 Patterns of harboring genes on each serotype of EPEC

Sources	Serotypes		No. of strains examined (%)	Patterns (%)					Negative (%)	
	O	H*		<i>eaeA</i> <i>bfpA</i>	<i>eaeA</i> <i>astA</i>	<i>eaeA</i>	<i>aggR</i> <i>astA</i>	<i>aggR</i>		<i>astA</i>
Human	O1	7, 42, NM, UT	92 (100)						2 (2.2)	90 (97.8)
	O18	7, 12, NM, UT	85 (100)			1 (1.2)				84 (98.8)
	O111	21, 27, NM, UT	62 (100)				47 54 (87.1)	7	2	6 (9.7)
	O126	19, 12, 21, 27, NM, UT	50 (100)			1	31 37 (74.0)	6	4	8 (16.0)
	O86	2, 7, 18, 27, NM, UT	44 (100)			1		27 (61.4)		16 (36.4)
	O128	2, 12, 35, NM, UT	38 (100)			13 (34.2)		3 (7.9)	2	20 (52.6)
	O55	7, NM, UT	31 (100)			29 (93.5)				2
	O26	11, 12, NM, UT	21 (100)		2	13 15 (71.4)			1	5
	others		85 (100)	2	1	11	10	6	12 (14.1)	43 (50.6)
	Total		508 (100)	2	3	69	88	49	23 (4.5)	274 (53.7)
Non-human	O1	7, 42, NM, UT	18 (100)						10 (55.6)	8 (44.4)
	O18	7, NM, UT	10 (100)			1			1	8 (80.0)
	O111	21	1				1			
	O126	21, 27, UT	5				1			4
	others		57 (100)	1		9			10 (17.5)	37 (64.9)
	Total		91 (100)	1		10	2		21 (23.1)	57 (62.6)

* UT ; untypable, NM ; non-motile

EPEC, O55 が数段階の遺伝子の獲得と脱落を経て EHEC, O157 に至ったという報告があり⁹⁾, 同様に被検株全てが *eaeA* 保有である O26 と O119 の EPEC も同じ付着因子保有パターンであることからこの血清型の EHEC は Stx 産生能を獲得した EPEC である可能性を示唆している. 一方 O

111 の EHEC は全て *eaeA* 保有株であるのに対し, EPEC では全く認められず *aggR* が大部分 (87.1%) であることは O26 の場合のように, 単に Stx 産生遺伝子を獲得した EPEC ではないように思われるが⁸⁾, *eaeA* 陰性で *aggR* 保有の EHEC, O111 株による HUS 患者発生も報告されている¹⁰⁾

Fig. 1 Differentiation of diarrheagenic *E. coli* on conventional microbiological work

ことから *aggR* 保有 EPEC, O111 由来の成立過程も考えなければならない。同様に EPEC, O86 も保有する付着因子は *aggR* が主で (61.4%)、この株が Stx 産生能を獲得して *aggR* 保有型 EHEC, O86 となる可能性を窺わせるが、それを裏付ける感染例がわが国でも報告されており¹¹⁾、今後種々の付着因子を保有した EHEC 血清型の出現が推察される。

多くの検査室での下痢原性大腸菌診断用血清は高頻度で検出されるもの以外準備されていないことが多く、一部の主要な血清型で、毒素など明らかな病原因子の検出試薬、キットがある場合に限定されている。とくに血清型別以外に検査法がない EPEC や従来の培養法では一般の大腸菌と性状での鑑別が困難な O157 以外の EHEC などは、日常検査の対象となっていないか、見逃されることが多いのが現状である。また検出頻度が高い EPEC, O1 や O18 は既知病原因子や付着因子の保有も極めて少なく、下痢症患者のみならず健康者

からも高率に検出されることが多いことを考えると¹²⁾、下痢症におけるこのような菌株の意義について再検討が必要と思われる。

以上のようにこれまでの下痢原性大腸菌の検査法は煩雑で、効率が悪く、検査精度にも問題があることから、既知の病原因子である毒素産生性や細胞侵入性と本研究で調査した下痢起病性に関係する付着因子を PCR 法で迅速、簡便に検査する大腸菌の鑑別法 (Fig. 1) が一般的であり、医療機関、検査センターなど多くの検査室における日常検査で適用できるものと考え提示するものである。なおこの Fig. 1 では付着因子を保有するものを付着性大腸菌 (Enteroadherent *E. coli*; EAEC) とし、この中に EAggEC や限局型付着性大腸菌 (localized adherent *E. coli*: LAEC)、分散型付着性大腸菌 (diffused adherent *E. coli*: DAEC) などの付着様式が異なるものを同じカテゴリーに存在させているが、それぞれの大腸菌の病原的意義が明らかになれば別カテゴリーに分類されるべきである。

さらに EAEC に EPEC も含まれているが、今回の結果からは LAEC, EAggEC および non-pathogenic *E. coli* に分類されるが DAEC や細胞壊死毒など新しい病原因子の報告もあり¹³⁾再定義の可能性があるので、これまでの定義を優先し残した。

謝辞：本研究は平成 11, 12 年度厚生科学研究補助金（健康科学総合研究事業）を受けた「地方衛生研究所の機能強化に関する総合的研究（分担研究者；大阪府立公衆衛生研究所，江部高廣）の「公衆衛生分野における緊急課題のモデル研究」として実施した。

文 献

- 1) Donnenberg MS, Kaper JB : Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1992 ; 60 : 3953-61.
- 2) Beebakhee G, Louie M, De Azavedo J, Brunton J : Cloning and nucleotide sequence of the eae gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157 : H7. FEMS Microbiol Lett 1992 ; 91 : 63-8.
- 3) 坂崎利一：食水系感染症と細菌性食中毒，分散接着性大腸菌(DAEC). 坂崎利一編，中央法規，東京，2000；p.292-5.
- 4) Nataro JP, Kaper JB : Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998 ; 11 : 142-201.
- 5) Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM : Pattern of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatr Infect Dis J 1987 ; 6 : 829-31.
- 6) Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR : Plasmid mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1985 ; 48 : 378-83.
- 7) Jallat C, Livrelli V, Darfeuille-Michaud A, Rich C, Joly B : *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France : high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 2031-7.
- 8) 八柳 潤，木内 雄，斉藤志保子，佐藤宏康，森田盛大：腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (EAST-1) 遺伝子を保有する食中毒様事例由来病原血清型大腸菌. 感染症誌 1996 ; 70 : 73-9.
- 9) Whittam TS : Evolution of *Escherichia coli* O157 : H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ed. Kaper JB and O'Brien AD, ASM, Washington DC, 1998 ; p.195-209.
- 10) Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E : Enteraggagative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 : H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 840-2.
- 11) 上野伸広，吉國謙一郎，新川奈緒美，有馬忠行，榎元磨加，永田告治：腸管出血性大腸菌 O86 による死亡例. 衛生微生物技術協議会 第 22 回研究会，講演抄録集，2001；52.
- 12) 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 1999 ; 73 : 53-61.
- 13) Gunzberg ST, Chang BJ, Elliott SJ, Burke M, Gracey M : Diffuse and enteraggagative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. J Infect Dis 1993 ; 167 : 755-8.

Presence of the Genes Regarding Adherence Factors of *Escherichia coli* Isolates and a Consideration of the Procedure for Detection of Diarrheagenic Strain

Kazuhiro KOBAYASHI¹⁾, Kazuko SETO¹⁾, Jyun YATSUYANAGI²⁾, Shioko SAITO²⁾, Michinori TERAOKA³⁾, Michiharu KANEKO⁴⁾, Toshihiko SERIKAWA⁵⁾, Sanae KURAMOTO⁵⁾, Tomohiko FUJISAWA⁶⁾, Rieko SUZUKI⁶⁾, Mitsugu YAMAZAKI⁷⁾, Ken-ichi HAYASHI⁸⁾, Wataru MATSUNE⁸⁾, Tomihisa YASUOKA⁹⁾, Kazumi HORIKAWA¹⁰⁾, Koichi MURAKAMI¹⁰⁾, Kimiko KAWANO¹¹⁾, Toru YAMADA¹¹⁾ & Kenitiro ITO¹²⁾

¹⁾Osaka Prefectural Institute of Public Health, ²⁾Akita Prefectural Institute of Public Health,

³⁾Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences,

⁴⁾Yamanashi Institute for Public Health, ⁵⁾Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ⁶⁾Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory,

⁷⁾Aichi Prefectural Institute of Public Health, ⁸⁾Shiga Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ⁹⁾Public Health Institute of Kochi Prefecture,

¹⁰⁾Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

¹¹⁾Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment,

¹²⁾National Institute of Infectious Diseases

Diarrheagenic *Escherichia coli* are differentiated from non-pathogenic members with enterotoxin production, enteroinvasiveness and serotyping. However, the serotypic members are rarely sufficient to reliably identify a strain as diarrheagenic on *E. coli*. Recently, there are many definite articles which the adhesive *E. coli* strain against intestinal epithelial cells is enterovirulent.

In this study, 1,748 *E. coli* isolates of diarrheagenic and non-diarrheagenic categories which belonged to EHEC, ETEC, EIEC EPEC and non-EPEC were examined by PCR method for the presence of *eaeA*, *aggR* and *bfpA* regarding adherence factor genes, and *astA* of EAST1. The strains examined were recognized to variable carrying geno-patterns, and a large number of EHEC, EPEC and non-EPEC had carried either *eaeA* or *aggR* genes. In EHEC isolates, a carrying pattern with the most high frequency was only *eaeA*, and this type was recognized in the isolates of serotype O157, O26 and O111. EPEC and non-EPEC isolates were recognized *eaeA* or *aggR* which harboring with *astA* or not. Of 508 EPEC isolates from human, a total of 137 isolates (27.0%) carried *aggR*, and a total of 74 isolates (14.6%) had *eaeA*, while of the 91 isolates from non-human were recognized *aggR* and *eaeA* with 2.2% (2 isolates) and 12.1% (11 isolates), respectively. Also, of 266 non-EPEC isolates from human, a total of 16 isolates (6.0%) carried *aggR*, and a total of 58 isolates (21.8%) had *eaeA*. On the other hand, 22 (7.0%) of 316 isolates examined from non-human had *eaeA*, however no isolate had *aggR*. Thirteen isolates of EIEC and 218 ETEC isolates were screened, and only 6 ETEC isolates had either *eaeA* or *aggR*. The *astA* gene was recognized in the isolates of all categories, and ETEC strains had more frequently. The *bfpA* gene was recognized with more frequently in a serotype O157 : H45, which is obtained from human with diarrhea, however, this strain was not recognized a member of the EPEC serotype.

There is no diagnostic system for the strain of *E. coli* that cause diarrheal diseases, therefore more laboratories are unable to identify them. The authors had confirmed which PCR technique is a useful simple and rapid method for the detection of adherence factor genes on *E. coli* strains. From these results, we showed a differentiation method using PCR technique which have relation with adherence factor, enterotoxin-production and invasiveness, and we firmly believe that application of the procedure is a reasonable and useful method for the identification of diarrheagenic *E. coli*.