

原著

小児の散発性下痢症から分離され、O 群血清型分類が可能であった大腸菌の病原遺伝子保有率の評価

菊田 英明* 涌嶋 三津子** 西川 禎一**

要旨 小児の散発性下痢症から検出された大腸菌で O 群血清型分類が可能であった 98 検体の大腸菌株について病原遺伝子の保有状況を PCR 法により検討した。16 株 (16.3%) が病原遺伝子を保有し、*aggR* 遺伝子を保有する腸管凝集接着性大腸菌 (EAEC) は 8.2%, *eae* 遺伝子を保有する腸管病原性大腸菌 (EPEC) は 7.1%, *astA* 遺伝子のみを保有する EAEC 耐熱性毒素遺伝子保有大腸菌 (EAST1EC) は 1.0% であった。O 群分類のみによる下痢原性大腸菌の判断には十分注意が必要である。

はじめに

大腸菌 (*Escherichia coli*) はヒトの腸管の正常菌叢を構成する細菌の一つであり、多くは病原性をもたないが、一部に下痢を引き起こすものがあり、総称して「下痢原性大腸菌」または「病原大腸菌」といわれている¹⁻³⁾。下痢原性大腸菌 (diarrheagenic *Escherichia coli*: DEC) はその機序により、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*: EPEC), 腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*: ETEC), 腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli*: EIEC), 腸管凝集接着性大腸菌 (enteroaggregative *E. coli*: EAEC), 腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) の 5 種類に分類されている。他に DEC に入る可能性を否定できないものに、分散付着性大腸菌 (diffusely adherent *E. coli*: DAEC), EAEC 耐熱性毒素 1 (EAST1) の遺伝子を保有する EAST1 遺伝子保有大腸菌

(EAST1EC) などがある。

DEC は、発展途上国においては深刻な感染症の原因菌であり、わが国においても、ときに集団食中毒を起こしている。乳幼児の散発性下痢症から分離された DEC に関して衛生研究所や環境センターなどの公的機関からの報告はあるが、臨床からの報告は少ない。病原大腸菌免疫血清による O 群血清型分類は、病原因子を直接検出できるキットが皆無の時代に、DEC を簡便に識別する方法として使用されてきた。しかし、下痢原性をもたない大腸菌にも DEC と同じ O 群に分類されるものが多く、まれではあるが O 群分類できない EHEC も存在することなど、散発例を対象とする市中病院における O 群血清型の有用性について懸念がある。本研究は、「下痢原性大腸菌」または「病原大腸菌」として O 群血清型が報告されてきたとき、どのように対応すべきかを検討することを目的とし、O 群血清型分類された患者由来の大

Key words : 散発性下痢症, 病原性大腸菌, O 群血清型, 病原遺伝子

* 特別医療法人とこはる東栄病院小児科

[〒007-0841 札幌市東区北 41 条東 16 丁目 3-14]

** 大阪市立大学大学院生活科学研究科

表 1 PCR プライマー

目標遺伝子	プライマー塩基配列 (5'-3')
Intimin (<i>eae</i>)	CCGATTCTCTGGTGACGA CCACGGTTTATCAAACCTGATAACG
EAST heat-stable enterotoxin-1 (EAST1) (<i>astA</i>)	ATGCCATCAACACAGTATATCCG CGCGAGTGACGGCTTTGTA
aggregative adherence fimbriae activator (<i>aggR</i>)	CAGCGATACATTAAGACGCCTAAAG CGTCAGCATCAGCTACAATTATTCC
Shiga toxin 1 (<i>stx1</i>)	ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG ACAAATTTATCCCCCTGAGCCACTATC
Shiga toxin 2 (<i>stx2</i>)	CCACATCGGTGTCTGTTATTAACC GGTCAAAAACGCGCCTGATAG
Heat-labile toxin (<i>elt</i>)	TTCCCACCGATCACCAA CAACCTTGTGGTGCATGATGA
Heat-stable toxin h (<i>est-h</i>)	CCTTTCGCTCAGGATGCTAAAC CAGTAATTGCTACTATTTCATGCTTTTCAG
Heat-stable toxin p (<i>est-p</i>)	CTTTCCTCTTTTAGTCAGTCAACT GCAGTAAAATGTGTTGTTTCATATTTCTG
invasion plasmid antigen regulator (<i>virB</i>)	GGATTTGTGCAACGACTTGTAAAG GAGGAATCTTGGCTTTGATAAAGG
Afa/Dr adhesins (<i>afaB</i>)	GTCTCCCTGAATGTACAGCTTTCA CCCTCTGCCACTCCACCTT

腸菌株について 10 種類の病原遺伝子の保有状況を検索し、O 群血清型分類による DEC の判定の妥当性を検証した。

II. 対象と方法

1. 対象

2008 年 12 月～2010 年 11 月の 2 年間に散発性下痢症で受診し、細菌性胃腸炎を疑った 347 名の小児の便から細菌の分離・同定を行った。細菌性胃腸炎を疑った小児とは、4 日以上続く発熱、持続する腹痛、粘血便、1 週間以上改善なく持続する下痢などいずれかの症状を呈し、臨床的に判断した症例である。Campylobacter 18 検体、Salmonella 6 検体、Klebsiella oxytoca 7 検体、Aeromonas sobria 1 検体、Yersinia enterocolitica 1 検体の 33 検体が原因細菌として検出された。この 33 検体を除いた 314 検体から検出された大腸菌のなかで、O 群血清型分類が可能であった大腸菌 98 検体を対象とした。

2. 病原遺伝子の検索

大腸菌から DNA を抽出し、10 種類の病原遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *eae*, *elt*, *est-p*, *est-h*, *astA*, *aggR*, *afaB*, *virB*) を、TaqMan プローブを用いたマルチプレックス・リアルタイム PCR 法により検出した⁴⁾。PCR 法は表 1 に示したプライマーを使用して行った。易熱性エンテロトキシン遺伝子 *elt*、耐熱性エンテロトキシン遺伝子 *est* は ETEC、侵入因子遺伝子 *virB* は EIEC、志賀毒素産生遺伝子 *stx* は EHEC、局在性付着因子遺伝子 *eaeA* は EPEC、付着因子遺伝子 *aggR* は EAEC、分散付着因子遺伝子 *afaB* は DAEC の指標とした。また、*astA* は EAEC 耐熱性毒素 1 (EAST1) の遺伝子である。

3. O 群血清型別試験

市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて O 抗原の血清型別試験を行った。

4. 薬剤感受性試験

AMPC, CTRX は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M2-A10 (2009) の薬剤感

表 2 下痢原性大腸菌が検出された小児の年齢, O 群血清型, 病原遺伝子と臨床症状

患者番号	年齢	O 群血清型	病原遺伝子			下痢原性大腸菌の種類	臨床症状						使用抗菌薬	
			<i>eae</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>		下痢	1 週間以上下痢	腹痛	嘔吐	粘血便	発熱		
1	10 カ月	O126		+	+	EAEC	+				+			FOM
3	4 歳	O153		+		EAST1EC	+	+		+				FOM
4	2 歳	O111		+	+	EAEC				+				FOM
5	6 歳	O111			+	EAEC	+			+				FOM
25	2 歳	O26	+			EPEC	+	+		+				FOM, AMPC
26	10 カ月	O6	+			EPEC	+	+			+			FOM, AMPC
28	13 歳	O15	+			EPEC	+	+		+				FOM
31	8 カ月	O25	+			EPEC	+	+			+			FOM
39	1 歳	O153	+			EPEC	+	+				+		FOM
75	8 カ月	O25			+	EAEC	+	+						FOM
80	2 歳	O55	+			EPEC	+			+			+	FOM
83	1 歳	O127a		+	+	EAEC	+	+						FOM
87	6 歳	O111		+	+	EAEC	+	+						FOM
89	1 歳	O127a		+	+	EAEC	+	+						FOM
90	6 歳	O166		+	+	EAEC	+				+			FOM
95	3 歳	O55	+			EPEC	+	+						FOM

受性試験に基づき KB ディスク (栄研) を使用しディスク法で行った。PIPC, MINO, CCL, CTM, CTX, CFDN, CDTR-PI, FOM, FRPM, MEPM は CLSI M100-S18 (2008) に基づきマイクロキャン (Siemens) という自動分析機器を使用した。

III. 結 果

1. 病原遺伝子保有状況 (表 2, 図 1)

O 群分類が可能であった 98 株中, 病原遺伝子を保有する大腸菌は 16 株 (16.3%) であった。*aggR* 遺伝子は 8 株 (8.2%), *eae* 遺伝子は 7 株 (7.1%), *astA* 遺伝子は 7 株 (7.1%) から検出された。*aggR* 遺伝子を保有する 8 株のうち 6 株が *astA* 遺伝子をもち, *astA* を単独保有する大腸菌 (EAST1EC) は 1 株のみ検出された^{5,6)}。O 群分類が可能であった 98 株中, 65 例 (病原遺伝子を保有していた小児から検出された 12 株と保有していなかった小児から検出された 53 株) は 1 週間以上改善なく持続する下痢を伴っていた小児から検出された。病原遺伝子を保有する大腸菌が検出された小児と, 病原遺伝子を保有しない大腸菌が検出された小児との間に臨床的な差は認められな

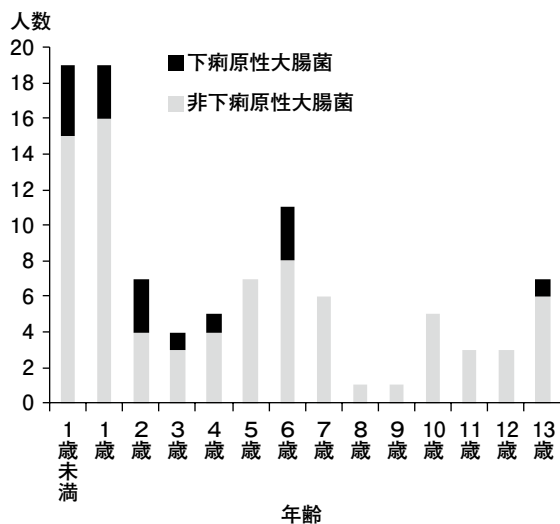


図 1 年齢と下痢原性大腸菌との関連

かった。病原遺伝子が検出され急性期の症状が強かった症例は 16 例中 4 例の小児 (患者 1, 5, 80, 90) であった。病原遺伝子を保有する大腸菌が検出された 16 例のうち 8 例に抗菌薬の治療を行った。1 例 (患者 25) は FOM により改善がみられず, 感受性のある AMPC に変更して改善した。他の 7 例は FOM により改善した。病原遺伝子を保

有する大腸菌を保有していた16例の小児の年齢は、1例は13歳であったが、他は6歳以下であった(図1)。

2. O群血清型

O群分類可能であった98名検体の大腸菌のO群血清型を図2に示した。上位3種類のO群血

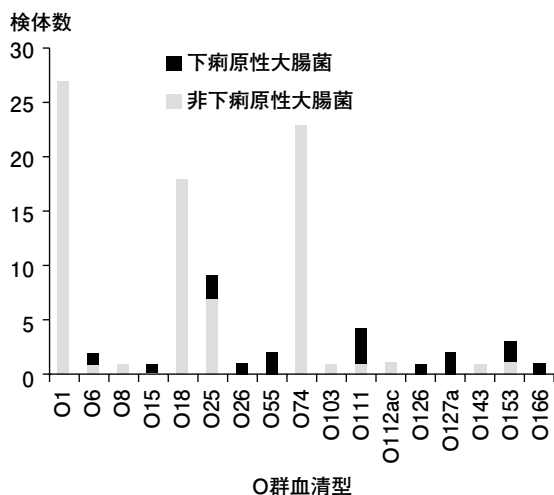


図2 下痢原性大腸菌とO群血清型の関連

血清型が全体の約70%を占め、それらO1(27株:27.6%),O74(23株:23.5%),O18(18株:18.4%)からは病原遺伝子は検出されなかった。EAECのO群血清型は、O111が3株、O127aが2株、O25、O126、O166が各1株であった。EPECのO群血清型はO55が2株、O6、O15、O25、O26、O153が各1株であった。astA遺伝子のみを保有するEASTIECはO153であった。

3. 薬剤感受性試験(表3)

多剤耐性菌はなく、今回調べた抗菌薬のなかで数個の抗菌薬に耐性をもつ菌のみであった。AMPCに対して37.5%、経口セフェム系抗菌薬に対して18.8~25.0%、FOM、FRPMに対して6.3%の耐性化率を示したが、CTX、CTRX、MEPMに対する耐性株はなかった。

IV. 考 察

今回の結果から、散発性下痢症から分離されたO群分類可能であった98株の大腸菌のなかの16株(16.3%)が病原遺伝子を保有するDECであり、ほとんどが幼児の便から検出された。15株(15.3%)はEPECまたはEAECであり、aggR

表3 下痢原性大腸菌の薬剤感受性

患者番号	抗菌薬											
	AMPC	PIPC	MINO	CCL	CTM	CTX	CTRX	CFDN	CDTR-PI	FOM	FRPM	MEPM
1	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	I	S	R	I	S	S	R	R	S	S	S
5	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S
25	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S
26	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
80	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
83	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
87	R	S	S	R	I	S	S	R	R	S	S	S
89	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
90	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
95	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
耐性率	6/16	3/16	1/16	4/16	2/16	0/16	0/16	3/16	4/16	1/16	1/16	0/16

S : susceptible, I : intermediate, R : resistant

遺伝子を保有する EAEC は 8.2% から、*eae* 遺伝子を保有する EPEC は 7.1% から検出された。特に EAEC では 8 株中 6 株が EAEC に多いとされる O 群血清型の O111 と O127 および O126 であった。一方、EPEC では 7 株中 3 株が主要な O 群血清型である O26 と O55 を示すにとどまり、EAEC に比べて O 群血清型の有用性は低かった。これは、現在先進国諸国で検出される EPEC の多くが非定型 EPEC であることを札幌地区でも反映したものと推測される⁷⁾。今回、札幌での O 群分類可能であった大腸菌の上位 3 つの O 群血清型は O1, O18, O74 であり、これらからは病原遺伝子は検出されなかった。これらに O25 を加えた上位 4 つの O 群血清型が検出された場合は、治療の必要性は比較的低いと推測される。一方、その他のまれな O 群血清型の大腸菌では 61% が病原遺伝子を保有していたことは注目に値する。

これらの結果は、散発性下痢症から分離された O 群分類可能な大腸菌のなかに DEC は存在するが、O 群血清型別試験を利用して臨床でどのように判断すべきかに関していくつかの問題点があることを示唆している。一般の医療機関における日常検査は、下痢原性大腸菌と非下痢原性大腸菌を鑑別するため、市販キットを用いた O 群血清型別試験を実施し、「病原大腸菌免疫血清」に凝集し O 型分類できた大腸菌のペロ毒素を検査している施設が多いと推測される。しかし、ペロ毒素以外の病原因子の検査は困難であり、実際には行われていない。また、O 型分類できなかった大腸菌は無視されがちである。今回は散発性下痢症の臨床検査の実態に合わせ、患者から分離された O 群分類可能であった菌株に限定して病原遺伝子を検索した。しかし、下痢症患者から遺伝子検査法を用いて網羅的に DEC を検出した場合、EHEC 以外の DEC においては、O 群分類できない大腸菌株にも O 群分類可能であった大腸菌と同等数の DEC が含まれているという報告がある^{4,5,8)}。すなわち、EPEC, ETEC, EAEC, DAEC などの DEC では、O 群分類可能な大腸菌のみを対象にしがちな市中の病院においては DEC 全体の約半分が見落とされることを念頭に入れておく必要がある。これが第 1 の問題点である。そのため、病原大腸菌免

疫血清に凝集する菌が検出されなくとも、DEC が存在する可能性があることを念頭に治療にあたらなければならない。

第 2 の問題点は、今までの報告と本研究から、O 群分類可能であった大腸菌のなかで、真の DEC は 10~20% しか存在しないため、多くは偽陽性であり実際の 5~10 倍の非下痢原性の大腸菌が下痢原性大腸菌（病原大腸菌）として報告され、臨床の場でさまざまな混乱を招いていると考えられる^{5,9~11)}。今回、小児の臨床症状で検出された O 群分類可能であった大腸菌が DEC か否かを判断することはできなかった。日本においては、EHEC のほとんどが O 群血清型分類可能な大腸菌であるため、病原大腸菌免疫血清は EHEC の 1 次スクリーニングに使用されているが、EAEC, EPEC の検出には偽陽性が多く不適当であることが示された。EAEC や EPEC についても、EHEC のペロ毒素検査キットに相当する病原因子検出キットが適用される必要がある。

O 群分類可能な大腸菌のなかには、健康者が高率に保菌している特定の O 群血清型に属する大腸菌も存在する。さらに、健康者からも EAEC, EPEC が検出されている^{3,9~11)}。これが第 3 の問題点である。しかし、これは EAEC, EPEC の病原性を否定するものではないと考えられる。健康者から EAEC, EPEC が検出されるのは、EAEC, EPEC が EHEC と異なり病原性が低いため、重症の下痢を起こさずに経過する健康保菌者がいるためと推測され、下痢の小児から検出された場合は EAEC, EPEC を原因と考えるべき症例が多いと考えられる。今回 16 例中 8 例は抗菌薬による治療を行った。治療には耐性の少ない FOM, FRPM が適していると考えられる。

病原大腸菌免疫血清の使用に関してはさまざまな意見がある。O 群血清型が提案されて現在でほぼ 70 年が経過し、O 群血清型だけで DEC といえないことが明らかになっている。O 群血清型分類は大腸菌抗原同定検査として細菌培養同定検査より高い保険点数がとれることも問題であるが、現状では上手に活用していくことが必要である。定期的に各地区における O 群血清型と病原遺伝子の保有率を調査しておけば、O 群血清型情報を有

効に活用した臨床診断が可能になると考えられる。しかし、それよりもベロ毒素検出キットのように簡単に検査できるキットの開発が、事態の打開に有効と考える。

V. 結 論

急性期の症状の強い症例だけでなく、1週間以上改善なく持続する下痢を呈する散発性下痢症の幼小児からも EAEC, EPEC が検出されることが明らかになった。市販の「病原大腸菌免疫血清」に凝集する菌が「病原大腸菌」として報告されているが、必ずしも病原性と一致するものではなく病原性を証明するためには病原因子を証明することが必要である。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) James B, et al : Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2 : 123-140, 2004
- 2) Ahmed N, et al : Genomic fluidity and pathogenic bacteria : Applications in diagnostics, epidemiology and intervention. Nat Rev Microbiol 6 : 387-394, 2008
- 3) The Topics : 下痢原性大腸菌 2011 年現在. IASR 33 (1) : 1-3, 2012
- 4) Hidaka A, et al : Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. J Appl Microbiol 106 : 410-420, 2009
- 5) Nishikawa Y, et al : Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000 : Prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. Jpn J Infect Dis 55 : 183-190, 2002
- 6) Fujihara S, et al : Prevalence and properties of diarrheagenic *Escherichia coli* among healthy individuals in Osaka City, Japan. Jpn J Infect Dis 62 : 318-323, 2009
- 7) Wang L, et al : Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. Appl Environ Microbiol 79 : 1232-1240, 2013
- 8) Iijima Y, et al : Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens : low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis. Diagn Microbiol Infect Dis 58 : 303-308, 2007
- 9) 森屋一雄, 他 : 散発下痢症患者及び健常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, EAaggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA* の保有状況について. 感染症誌 74 : 134-142, 2000
- 10) 成松浩志, 他 : 健康人由来大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況調査. 大分県衛生環境研究センター年報 30 : 47-52, 2004
- 11) 山崎 貢, 他 : 散発性下痢症における腸管凝集性大腸菌 (EAaggEC) の分布調査—EAaggEC の検出率, 血清型, 年齢分布及び季節変動について—. 愛知衛所報 56 : 1-8, 2006

Prevalence of virulence genes of diarrheagenic *Escherichia coli* in O-serotypable strains isolated from stool samples of children with sporadic diarrhea

Hideaki KIKUTA¹⁾, Mitsuko WAKUSHIMA²⁾, Yoshikazu NISHIKAWA²⁾

¹⁾ *Pediatric Clinic, Touei Hospital*

²⁾ *Osaka City University Graduate School of Human Life Science*

Ten enterovirulence genes (*stx1*, *stx2*, *cae*, *elt*, *est-p*, *est-h*, *astA*, *aggR*, *afaB*, *virB*) of diarrheagenic *Escherichia coli* (*E. coli*) were examined by polymerase chain reaction in 98 O-serotypable strains isolated from the stool samples of 347 children with sporadic diarrhea. Among the 98 strains, 16 (16.3%) were positive for at least one of the virulence genes, identified as the diarrheagenic *E. coli* (DEC) strain. Eight of the 16 strains were *aggR*-positive, 7 were *eae*-positive and 7 were *astA*-positive. Of the 7 *astA*-positive strains, 6 were *aggR*-positive and one carried only the *astA* gene. Eight strains (8.2%), 7 strains (7.1%) and 1 strain (1.0%) of the 98 strains were identified as enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and *E. coli* possessing EAEC heat-stable enterotoxin 1 (EAST1EC), respectively. Although O1 (27 strains; 27.6%), O74 (23 strains; 23.5%), and O18 (18 strains; 18.4%) were the most prevalent serogroups, they possessed no enterovirulence genes. The serogroups of EAEC were O111 (3 strains), O127a (2 strains), O25 (1 strain), O126 (1 strain), and O166 (1 strain). The serogroups of EPEC were O22 (2 strains), O6 (1 strain), O15 (1 strain), O25 (1 strain), O26 (1 strain), and O153 (1 strain). The serogroup of EAST1EC was O153 (1 strain). EAEC and EPEC are causative agents of sporadic diarrhea in children. Serotyping is inadequate for the identification of DEC, although it is useful for epidemiological analysis.

(受付: 2013年7月11日, 受理: 2013年8月28日)

* * *