

秋田県における非定型的下痢原性大腸菌の分離状況と *astA* 保有大腸菌 (EAST1EC) における病原因子保有状況

今野貴之 八柳 潤 齊藤志保子

astA 保有大腸菌 (EAST1EC), 分散接着性大腸菌 (DAEC), 細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) といった非定型的下痢原性大腸菌について, 秋田県内における健康被害の実態を把握するため, 県内医療機関等において散発下痢症患者から分離された下痢原性大腸菌疑い株を用いて, その分離状況を調査した。また, EAST1EC は分離された菌株によって病原性に違いがあることや, 健康者からも多数分離されることが指摘されているため, *astA* 以外の病原因子が EAST1EC の病原性に重要な役割をしている可能性を考え, これまでに下痢原性大腸菌で報告されている様々な病原因子の保有状況も併せて調査した。調査の結果, EAST1EC に関しては平成 19 年から 21 年の 3 年間で 35 株の分離が確認された。一方, DAEC および CDEC に関しては, 平成 22 年の下痢原性大腸菌疑い株について調査したが, 分離は確認されなかった。また, EAST1EC の病原因子の保有状況の調査では, 35 株中 24 株で何らかの付着因子, 3 株で毒性に関わる α 溶血素, 24 株でヒト体内での菌の増殖に関する siderophore が検出された。これらの結果から, 非定型的下痢原性大腸菌のうち, EAST1EC に関しては, 県内でも散発の下痢症患者から分離されることが確認され, 分離された EAST1EC の一部は, 様々な病原因子を保有し, ヒトに下痢症を惹起する可能性があることが示唆された。

1. はじめに

ヒトに下痢を惹起させる大腸菌は下痢原性大腸菌と総称され, 病原性の違いにより腸管出血性大腸菌 (EHEC), 腸管病原性大腸菌 (EPEC), 腸管侵入性大腸菌 (EIEC), 毒素原性大腸菌 (ETEC), 腸管集合性大腸菌 (EAggEC) の 5 つに大別される¹⁾。しかしながら, 最近の研究により大腸菌の新たな病原因子となりうる種々の遺伝子が報告され, 必ずしも上記の 5 つにあてはまらない病原型の大腸菌の存在が示唆されている²⁾。これら的大腸菌によって食中毒等が発生した場合には, 原因不明となり適切な衛生改善指導や医療機関における治療法の選択等に支障をきたす可能性があり, 問題となっている。そこで, *astA* 保有大腸菌 (EAST1EC), 分散接着性大腸菌 (DAEC) および細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) といった非定型的下痢原性大腸菌による健康被害の実態を把握するため, 県内における分離状況を調査した。

また, 特に EAST1EC では, これまでに数例の集団下痢症事例の報告があるにも関わらず,

分離される菌株によって病原性が異なることや, 健康者からも多数分離されることが指摘されている。今回, 我々は EAST1EC の病原性には *astA* 以外の病原因子も関わっていることを予想し, 県内で分離された EAST1EC に関して, DAEC や CDEC の病原因子も含め, これまでに下痢原性大腸菌で報告されている様々な病原因子の保有状況を調査した。

2. 方法

2.1 実験材料

EAST1EC に関しては, 平成 19 年 1 月から平成 21 年 12 月までに秋田県内医療機関等から送付された下痢原性大腸菌疑い株計 2,168 株を調査対象とした。

DAEC および CDEC に関しては, 平成 22 年に同様に得られた下痢原性大腸菌疑い株 769 株のうち, 各下痢原性大腸菌の主要な病原因子を保有せず, 溶血性の確認された 55 株を調査対象とした。

2.2 実験方法

2.2.1 非定型の下痢原性大腸菌の同定

EAST1ECは通常の下痢原性大腸菌が保有する主要な病原因子を持たず、EAST1 遺伝子 (*astA*) を持つ大腸菌として定義される³⁾。そのため、EAST1ECの同定には、PCR法により*astA*の検出を行うと同時に、各下痢原性大腸菌の主要な病原因子、すなわち腸管出血性大腸菌の*stx*、腸管病原性大腸菌の*eaeA*、腸管侵入性大腸菌の*invE*、毒素原性大腸菌の*est* および *elt*、腸管集合性大腸菌の*aggR*を標的にしたPCRを行い、各病原因子の保有の有無を確認した。DAECおよびCDECについては、病原性の指標となる溶血性を確認し、*hlyA*についてPCRによる検出を行った。*hlyA*陽性株について、さらにこれらの病原型に特徴的な病原因子と推定されている*daa*、*aid*、*cdtB*についてPCRによる検出を行った。

2.2.2 EAST1ECの病原因子プロファイル

細菌の病原性に重要な付着性に関わる因子として*iha*、*lpfA*、*ldaG*、*pilS*、*pic*、*daa*、*aah*、*aid*の8遺伝子、毒素因子として*pet*、*cdtB*、*hlyA*の3遺伝子、腸管内での増殖性に関わる因子として*irp2*、計12種類の病原因子についてPCRにより検出を行った。

3. 結果と考察

3.1 非定型の下痢原性大腸菌の分離状況

EAST1ECに関しては、平成19年の833株中7株、平成20年の725株中15株、平成21年の610株中13株を同定した。

DAECおよびCDECについては、平成22年の下痢原性大腸菌疑い株のうち、溶血性の確認された55株を対象に共通の病原因子である*hlyA*の検出を行い、28株についてその保有を確認した。しかしながら、その28株については特徴的な病原因子である*daa*、*aid*および*cdtB*は検出されず、DAECおよびCDECに該当する菌株は確認されなかった。

非定型の下痢原性大腸菌のうち、EAST1ECは大阪市の調査でも下痢症患者から2.5%分離されることが報告されており、今回の調査結果とほぼ一致する⁴⁾。DAECは特に小児の下痢症に関係するが²⁾、今回の調査では年齢は考慮されていない。CDECの病原因子である*cdtB*は、ほとんどの場合、EPECの病原因子である*eaeA*と

同時に検出されることが多いため²⁾、今回の調査では検出されなかったと考えられる。

3.2 *astA*保有大腸菌の病原因子保有状況

EAST1ECとして同定された35株について、表1に示した12種類の病原因子の保有状況を調査し、その結果を表2にまとめた。

35株中24株で何らかの付着性に関わる病原因子を検出した。そのうち、最も高率に確認された*lpfA*は、特に家畜との関連が指摘されている因子であり⁵⁾、EAST1ECが家畜由来の食品等による食中毒を起こす可能性があることが示唆された。また、複数の菌株で確認された*iha*、*pilS*、*pic*はEHECやEAggECにおいて細胞付着性への関与が指摘されており⁶⁻⁸⁾、EAST1ECの付着因子として注目される。1株で検出された*aah*は特定のDAECにおいて付着性を発揮するために必須の因子であることから⁹⁾、EAST1ECとDAECには何らかの関係がある可能性がある。また、*hlyA*は腸管外感染を起こす大腸菌にみられる病原因子の一つであるが、DAECやCDECでは下痢との関係が指摘され、腸粘膜細胞の機能変化を引き起こす作用があることが示されている²⁾。そのため、*hlyA*はEAST1ECの毒性を強める可能性がある。さらに、多くの株がヒトの体内での増殖に必要な*irp2*を持ち、*iha*、*pilS*、*pic*および*hlyA*を保有する株は共通してこの因子を持ち合わせていた。特定の病原因子のセットを持つ菌株のみがヒトへの病原性を持つと推定すると、*astA*に加えて、*irp2*および*iha*、*pilS*、*pic*、*hlyA*といった病原因子はEAST1ECの病原性に重要な役割を担う可能性がある。

表1 対象病原因子と特性

関連する病原型	病原因子	関連する病原性
EHEC	<i>iha</i>	IrgA homologue adhesin
	<i>lpfA</i>	Long polar fimbriae
EPEC	<i>ldaG</i>	LDA afimbrial adhesin
EAggEC	<i>pilS</i>	TypeIV pilus major subunit
	<i>pet</i>	Plasmid encoding toxin
DAEC	<i>pic/shET1</i>	Mucinase/Shigella enterotoxin I
	<i>irp2</i>	Siderophore
	<i>daa</i>	F1845 fimbriae
DAEC	<i>aah</i>	AIDA adhesin
	<i>aid</i>	AIDA adhesin
CDEC	<i>cdtB</i>	Cytolethal distending toxin
DAEC/CDEC	<i>hlyA</i>	α -hemolysin

表2 EAST1ECの病原因子プロファイル

年	菌株No.	血清型	病原因子											
			<i>iha</i>	<i>lpfA</i>	<i>ldaG</i>	<i>pilS</i>	<i>pic</i>	<i>pet</i>	<i>irp2</i>	<i>daa</i>	<i>aah</i>	<i>aid</i>	<i>cdtB</i>	<i>hlyA</i>
平成	EC11592	1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
19年	EC11628	UT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC11651	125	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC11805	125	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC11935	115	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	EC11969	18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12331	6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
平成	EC12397	8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
20年	EC12434	18	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12491	153	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12535	20	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12580	8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12584	153	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12596	151	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12685	74	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	EC12713	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12790	UT	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC12817	125	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12908	8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC12939	6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	EC13008	UT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13109	1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
平成	EC13115	27	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
21年	EC13273	UT	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13290	8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13334	1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	EC13353	UT	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13395	167	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13404	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13475	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EC13509	153	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13539	UT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13574	6	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
	EC13584	UT	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	EC13612	6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

参考文献

- 1) 日本食品衛生協会: 食中毒予防必携, 1998, 58-64.
- 2) 坂崎利一: 食水系感染症と細菌性食中毒, 2000, 210-297.
- 3) 渡辺治雄: 食中毒検査・診療のコツと落とし穴, 2006, 11.
- 4) Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Kitase T, Abe N, Nakamura H, Wada T, Ishii E, Haruki K; Surveillance Team: 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, 6, 2002, 183-190.
- 5) Wu Y, Hinenoya A, Taguchi T, Nagita A, Shima K, Tsukamoto T, Sugimoto N, Asakura M, Yamasaki S: Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan, *J Vet Med Sci*, 72, 5, 2010, 589-597.
- 6) Tarr PI, Bilge SS, Vary JC Jr, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE: *Iha*: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure, *Infect Immun*, 68, 3, 2000, 1400-1407.
- 7) Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, Latour-Lambert P, Hormazabal JC, Nataro JP: An Inc1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces, *Infect Immun*, 74, 4, 2006, 2102-2114.
- 8) Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP: Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 67, 11, 1999, 5587-5596.
- 9) Benz I, Schmidt MA: Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin, *Mol Microbiol*, 40, 6, 2001, 1403-1413.