

## 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

木村千鶴子 仙波敬子 服部昌志 大倉敏裕 四宮博人

Investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from child patients with infectious gastroenteritis in Ehime prefecture

Chizuko KIMURA, Keiko SEMBA, Masashi HATTORI, Toshihiro OHKURA,  
Hiroto SHINOMIYA

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is known to cause acute and persistent diarrhoeal illness worldwide, but the importance of EAEC among children with diarrhea in Ehime prefecture was largely unknown. In this study, we examined stool samples obtained from 1040 children with diarrhea from January 2012 through March 2013 in Ehime. Diarrheagenic *E. coli* was identified in 73 (7.0%) children; EAEC was the most prevalent pathotype (38 strains, 3.6%), followed by enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (31 strains, 3.0%) and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) (4 strains, 0.4%). O and H serotypes of EAEC isolates were determined, and it was found that the most frequent serotypes after not typable (12 strains, 31.6%) were O126:H27 and O127a:H21 which were shared by 11 isolates (28.9%) and 9 isolates (23.7%), respectively. Multiple genes including *aggR*, *aatA*(CVD432), *aggA*, *aafA* and *astA* were screened with PCR detection, finding that *aggR* and *aatA*(CVD432) were carried by all the isolates. HEp-2 cell adherence assay, the gold standard for diagnosis revealed that 38 strains all adhered to HEp-2 cells in a pattern characteristic of EAEC. These findings indicate that EAEC is an important causative agent of diarrhoeal illness among young children in Ehime.

Keywords : Interoaggregative adherent *E. coli* (EAEC), aggregative adherence, diarrhoeal illness

### はじめに

大腸菌の中でヒトに下痢を引き起こすものは下痢原性大腸菌と総称されている。下痢原性大腸菌は、発症機序や保有する病原因子の違いにより、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、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) の5種類に分類されている。そのうち腸管凝集付着性大腸菌 (以下EAECと略す) は、「既知の腸管毒素, ST, LTを産生しない凝集性付着を示す大腸菌」と定義され<sup>1)</sup>、発症機序は、腸粘膜へ多数の菌が付着し、腸管毒素や細胞毒素を分泌して粘膜の炎症を

引き起こすと考えられている<sup>1)</sup>。乳幼児の慢性および急性下痢症や成人の急性下痢症の原因となり、散発下痢症患者からの分離だけでなく食中毒等の集団発生事例も報告されている<sup>2-5)</sup>が、病原性については、十分に解明されていないのが現状である。

当所では、愛媛県感染症発生動向調査事業において小児科定点医療機関から搬入された感染性胃腸炎患者検体の病原体検査を実施している。

今回、EAECについて小児感染性胃腸炎患者からの分離状況の把握と分離株の性状および分子疫学解析を行ったので報告する。

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

## 材料と方法

### 1 試料

2012年1月から2013年12月までの2年間に、愛媛県感染症発生動向調査事業に基づき、小児科定点医療機関で採取された感染性胃腸炎患者1040名の糞便を検体とした。

### 2 下痢原性大腸菌の検出

糞便一白金耳をDHL寒天培地に直接塗抹し、37°Cで一夜培養後、大腸菌が疑われる3コロニーをTSA培地に釣菌し37°Cで一夜培養した。培養後、キレックス液(5% Chelex-100, TE Buffer) 200 $\mu$ lに懸濁し、95°C10分間加熱後、15000 rpm, 5分間遠心分離した上清をDNAテンプレートとした。下痢原性大腸菌の検出に用いたプライマー<sup>6,7)</sup>は、*elt*, *ipaH*, *stx*の3種と*astA*, *EAF*, *esth*, *bfpA*, *aggR*, *invE*, *eaeA*の7種の混合プライマーを調整し、マルチプレックスPCR法を行った。標的遺伝子が検出された検体については単一コロニーによるPCRを行い標的遺伝子保有コロニーを特定した。*aggR*遺伝子が陽性のコロニーについては、EAECのマーカであるCVD432遺伝子の検出を行った。

### 3 細菌分離同定

標的遺伝子が検出されたコロニーについて、TSI, LIM, VP, SC, CLIG培地を用いて大腸菌の性状を確認した。

### 4 血清型別

O血清型別は、病原大腸菌免疫血清1号セット(デンカ生研)を用いたガラス板凝集法により、H血清型別は、病原大腸菌免疫血清2号セット(デンカ生研)を用いた試験管凝集法によってそれぞれ決定した。

### 5 Clump形成試験

Clump形成試験は、Albert<sup>8)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、Mueller-Hinton broth (MHB)を5ml入れた試験管に菌を接種し、115 rpmで37°C, 20時間 振盪培養後、培養液表面のClump形成の有無を観察した。

### 6 HEp-2細胞凝集付着性試験

細胞凝集付着性試験は、Hector<sup>9)</sup>の方法に準じて行った。HEp-2細胞の培養液を、24穴プレートに加え、37°C, 48時間, 5%CO<sub>2</sub>下で培養し、PBSで3回洗浄後、抗生物質を含まない2%FCS・1%D-mannose加イーグルMEM培地をプレートに加えた。試験菌は、トリプトソイブイオンで37°C一夜培養後、培地の1/20量細胞に接種し、37°C, 3時間, 5%CO<sub>2</sub>下で培養した。培養後、PBSで3回洗浄し、メタノール固定、ギムザ染色を行い鏡検し培養細胞、その周囲への凝集付着性(aggregative adherence:AA)を観察した。

### 7 線毛遺伝子の検出

EAECの凝集付着性線毛(aggregative adherence fimbriae, AAF)遺伝子について、Boisen<sup>10)</sup>のプライマー(表1)を用いてマルチプレックスPCR法を行った。

### 8 薬剤感受性試験

臨床検査標準協会(CLSI)の抗菌ディスク感受性試験実施基準に基づき感受性ディスクを用いて実施した。薬剤はアンピシリン(ABPC), クロラムフェニコール(CP), ストレプトマイシン(SM), テトラサイクリン(TC), カナマイシン(KM), ST合剤(ST), ホスホマイシン(FOM)シプロフロキサシン(CPFX), ナリジクス酸(NA), セフォタキシム(CTX), セフトジジム(CAZ), イミペネム(IPM)の12剤を用いた。CTX, CAZに耐性を示した菌株については、ディスク拡散法によるESBL産生菌のスクリーニングを行った。ESBL産生菌については、PCR法による $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検出<sup>11,12)</sup>を行った。

### 9 PFGE解析

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析は国立感染症研究所のプロトコール<sup>13)</sup>に準じて行った。

得られたDNA切断パターンは、画像解析ソフト(BioNumerics Ver6.5, Applied Maths)を用いて解析を行い、類似係数Dice(トレランス1%), デンドログラムタイプUPGMAで系統樹を作成した。

表1 AAF 遺伝子 Primer

Gene	Description of Target	Primer sequence(5' →3')	size
<i>aggA</i>	AAF/I fimbrial subunit	TCTATCTRGGGGGGCTAACGCT ACCTGTTCCCCATAACCAGACC	220
<i>aafA</i>	AAF/II fimbrial subunit	CTACTTTATTATCAAGTGGAGCCGCTA GGAGAGGCCAGAGTGAATCCTG	289
<i>agg3A</i>	AAF/III fimbrial subunit	CCAGTTATTACAGGGTAACAAGGGAA TTGGTCTGGAATAACAACCTTGAACG	370
<i>agg4A</i>	AAF/IV fimbrial subunit	TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGA CACCATAAGCCGCCAAATAAGC	169

表2 下痢原性大腸菌の検出状況

	2012年												2013年												計 (%)
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
EAEC	2	0	2	0	2	2	1	0	0	1	1	1	4	4	4	1	3	3	0	1	2	0	2	2	38 (3.6)
EPEC	1	0	0	1	2	1	3	1	0	1	1	2	1	2	1	0	0	2	4	2	0	2	4	0	31 (3.0)
ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4 (0.4)
検出数 (%)	3 (6.0)	0 (0.0)	2 (4.9)	1 (1.4)	4 (9.5)	3 (7.3)	4 (8.7)	1 (3.3)	0 (0.0)	2 (6.3)	2 (3.3)	5 (10.9)	5 (11.6)	6 (15.0)	5 (17.2)	1 (2.6)	3 (6.8)	5 (13.9)	4 (8.3)	4 (8.9)	2 (5.3)	2 (4.1)	7 (13.2)	2 (4.3)	73 (7.0)
検査数	50	47	41	72	42	41	46	30	22	32	61	46	43	40	29	39	44	36	48	45	38	49	53	46	1040

結果

1 下痢原性大腸菌検出状況

下痢原性大腸菌の検出状況を表2に示した。1040検体中73株(7.0%)の下痢原性大腸菌が分離された。その内訳は、EAECが38株(3.6%)、EPECが31株(3.0%)、ETECが4株(0.4%)であり、EAECとEPECは、ほぼ同程度に分離された。EAECの生化学的性状は、典型的な大腸菌の性状を示したが、O127a群の10株はβ-グルクロニダーゼ陰性であった。

2 EAECの血清型と病原性関連遺伝子検出状況

分離されたEAEC38株について、血清型と病原性関連遺伝子の保有状況を表3に示した。血清型は8種類に分類され、O126:H27が11株(28.9%)、O127a:H21が9株(23.7%)と高率に分離された。O群は、O86a、O111、O126、O127aの4群に分類されたが、O群別不能が12株(31.6%)と多く分離された。

病原性関連遺伝子の保有状況では、EAECのマーカーCVD432は38株全てが保有していた。astAは、O86a:HNMが2株、O126:H27が11株保有していた。

3 病原性試験

Clump形成の有無、HEp-2細胞への凝集付着性、線毛遺伝子の保有について表4に示した。

38株すべてがClumpを形成し、HEp-2細胞への凝集付着性(AA)が見られた。(図1)

AAF遺伝子は、血清型によって保有している遺伝子が異なり、O86a:HNMはagg4A、O126:H27はaafA、UT:H19、UT:HUTはaggAを保有していた。O111:OUT、O127a:H21、O127a:HNM、UT:H10については、AAF遺伝子は検出されなかった。また、agg3Aを保有している株はなかった。

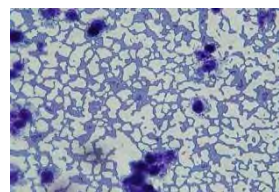
4 薬剤感受性試験

分離株38株の薬剤感受性試験の結果を表5に示した。CP、KM、CPF、IPMについては、耐性を示す菌株は、

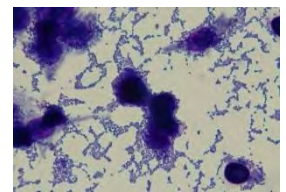
表3 EAECの血清型と病原性関連遺伝子

血清型		分離株	病原性関連遺伝子		
O	H		aggR	CVD432	astA
86a	NM*1	4	4	4	2
111	UT*2	1	1	1	
126	27	11	11	11	11
127a	21	9	9	9	
127a	NM	1	1	1	
UT	10	1	1	1	
UT	19	8	8	8	
UT	UT	3	3	3	
合計		38	38(100%)	38(100%)	13(34%)

\*1 nonmotile \*2 untypable



O127a 株(×400)



O127a 株(×1000)

図1 HEp-2細胞凝集付着性

無かった。ABPCについては、38株中31株(81.6%)が耐性を示し、そのうちO86a:HNMとO126:H27については、分離株全てがABPCにのみ耐性を示した。OUT:H10の1株は、ABPC、SM、TC、ST、NAの5剤に耐性を示した。また、CTXに耐性を示したO127a:H21の6株、OUT:H19の4株、OUT:HUTの1株、CTXとCAZに耐性を示したOUT:HUTの1株合わせて12株についてディスク拡散法を行った結果、CTX-M型ESBL産生菌と推定し、CTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子の検出を行った。CTXとCAZに耐性を示したOUT:HUTの1株は、CTX-M-1 group、O127a:H21の6株、OUT:H19の4株OUT:HUTの1株がCTX-M-9 groupであった。(表6)

## 5 PFGE解析

分離株38株について、制限酵素XbaIを用いてPFGEを行いDNAパターンの比較を行った。PFGEの解析を図2に

示す。血清型別に4つのクラスターを形成し、同一のパターンを示す株が5グループ認められた。O86a:HNMの4株は同一パターンを示した。

表4 凝集付着性試験結果とAAF 遺伝子保有状況

血清型		分離株	Clump形成	細胞凝集付着性	AAF 遺伝子			
O	H				AAF/ I <i>aggA</i>	AAF/ II <i>aafA</i>	AAF/ III <i>agg3A</i>	AAF/ IV <i>agg4A</i>
86a	NM*1	4	+	AA*3	-	-	-	+
111	UT*2	1	+	AA	-	-	-	-
126	27	11	+	AA	-	+	-	-
127a	21	9	+	AA	-	-	-	-
127a	NM	1	+	AA	-	-	-	-
UT	10	1	+	AA	-	-	-	-
UT	19	8	+	AA	+	-	-	-
UT	UT	3	+	AA	+	-	-	-

\*1 nonmotile \*2 untypable \*3 aggregative adherence

表5 薬剤感受性試験結果

血清型		分離株	耐性薬剤								計(%)
O	H		ABPC	CTX	CAZ	SM	TC	ST	FOM	NA	
86a	NM	4	4								4(100.0)
111	UT	1	1								1(100.0)
126	27	11	11								11(100.0)
127a	21	9	6	6							6( 66.7)
127a	NM	1									0( 0.0)
UT	10	1	1		1	1	1			1	1(100.0)
UT	19	8	5	4							5( 62.5)
UT	UT	3	3	2	1				1		3(100.0)
耐性株数 計		38	31	12	1	1	1	1		1	
耐性株数/分離 38(%)			81.6	31.6	2.6	2.6	2.6	2.6		2.6	

表6 ESBL 遺伝子型別

血清型		分離株	ESBL タイプ		
O	H		CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-9
127a	21	6			6
UT	19	4			4
UT	UT	2	1		1
計		12	1		11

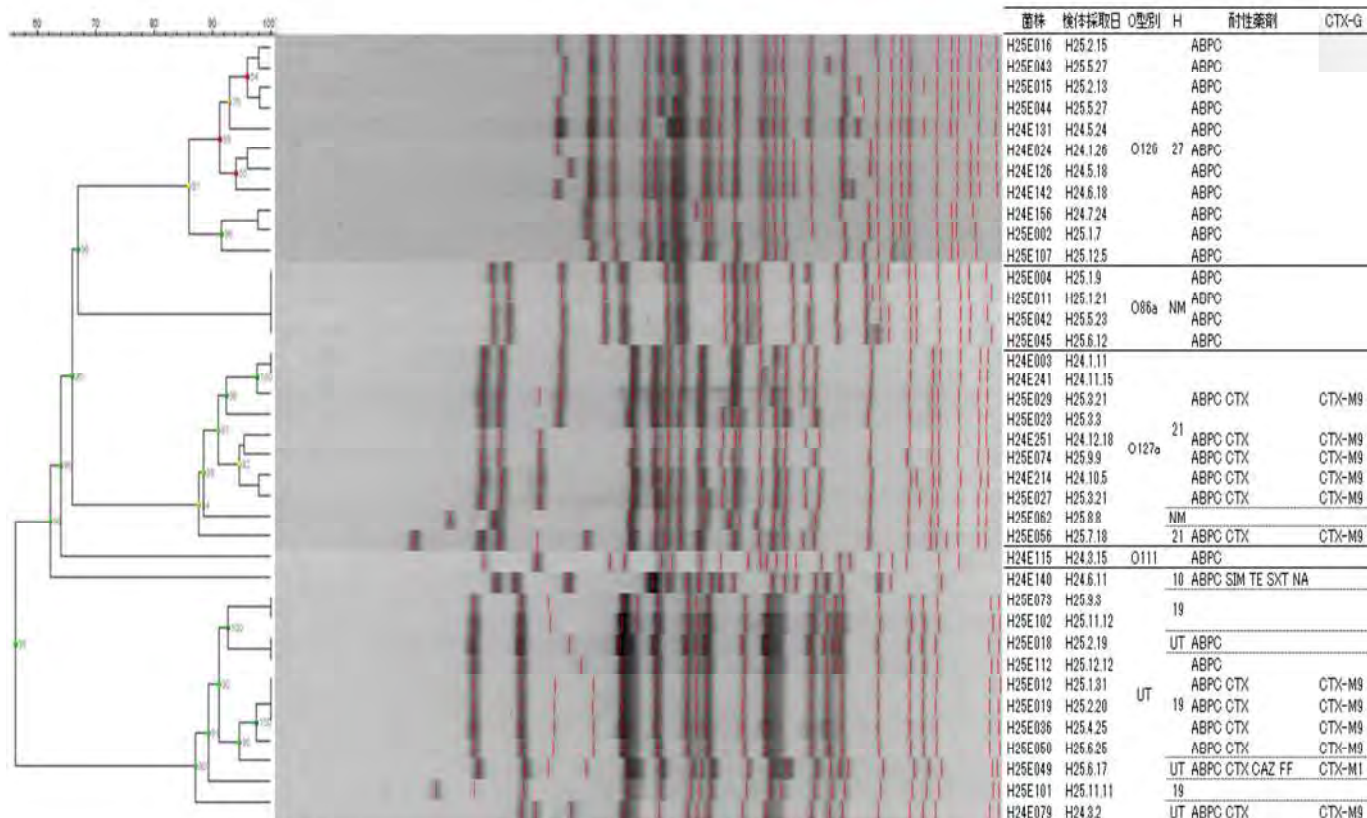


図2 PFGE 解析

## 考察

今回、下痢原性大腸菌を検出するためにPCR法による病原遺伝子の検出を行った結果、2012年1月から2013年3月の間に小児科定点医療機関において感染性胃腸炎と診断された1040検体中73株(7.0%)の下痢原性大腸菌が分離された。EAECが38株(3.6%)、EPECが31株(3.0%)、ETECが4株(0.4%)とEAEC、EPECが同程度に分離された。

EAECの血清型は、8種類に分類され、O126:H27が11株(28.9%)、O127a:H21が9株(23.7%)と高率に分離された。O血清型別では、O86a、O111、O126、O127aの4種類に分類されたが、O血清型別不能が12株(31.6%)と多く分離され加藤ら<sup>14)</sup>の報告にもあるように、市販されている抗血清によって分類されないものも多く存在することが明らかになった。

病原性関連遺伝子の*aggR*、*CVD432*、*astA*はAAプラスミド上に存在し*aggR*は、AAFの発現に関する総合的な統制因子であり、*CVD432*はAAプラスミドマーカースとして用いられ、*astA*は、耐熱性毒素(EAST1)をコードしている<sup>1)</sup>。今回検出されたすべての菌株は、*aggR*、*CVD432*を保有していたが、*astA*遺伝子については、O86a:HNMが2株、

O126:H27が11株保有していた。O126:H27は、*astA*遺伝子を高率に保有している<sup>15)</sup>という報告があり、血清型によって*astA*遺伝子の保有に特徴がみられた。

EAECの病原性試験には、培養容器の培養液表面付近のClump形成を観察するClump形成試験とHEp-2細胞、カバーガラス表面に連鎖状や蜂の巣状のAAを観察する細胞凝集付着性試験がある。今回分離された38株すべてがClumpを形成し、HEp-2細胞へのAAが見られたため病原因子が確認された。

AAは、AAFが関与し<sup>1)</sup>、AAFには、AAF/I、AAF/II、AAF/III、AAF/IVがある。日本において血清型別にO126:H27はAAF/II、O86a:HNMはAAF/IVを保有していることが明らかになっている<sup>1)</sup>。今回の調査結果でも血清型別にAAFの保有は同様となった。O127a群については、細胞凝集付着性は典型的なAAを示したことからAAFの存在が考えられたがAAFを特定することはできなかった。

薬剤感受性試験では、38株中31株(81.6%)がABPCに耐性を示した。ABPCに対する耐性については、河野ら<sup>16)</sup>の報告にもあるようにEAEC、特に耐性率の高いO126:H27株の特徴と考えられた。

PFGEによる解析では、大きく血清型で4つのクラスター

を形成し、同一のパターンを示す株が5グループ認められた。疫学的な情報は、不明であり感染源の特定までには至らなかった。

今回の調査において小児感染性胃腸炎患者から分離されたEAEC38株は、細胞凝集付着性試験により病原因子が確認されたことから、感染性胃腸炎の原因菌と考えられた。散発事例のため疫学的情報は不明であるが、小児の生活環境のなかで何らかの感染源があると考えられる。小児感染性胃腸炎の原因として、また食中毒事例<sup>4)</sup>の報告があるO126:H27が高率に検出されたことから、集団事例の発生に対しても注視する必要があると考えられる。

## まとめ

1 2012年1月から2013年3月の間に小児科定点医療機関において感染性胃腸炎と診断された1040検体中73株(7.0%)の下痢原性大腸菌が分離された。EAECが38株(3.6%)、EPECが31株(3.0%)、ETECが4株(0.4%)分離された。

2 EAECの血清型は、8種類に分類され、O126:H27が11株(28.9%)、O127a:H21が9株(23.7%)と高率に分離された。O血清型別不能が12株(31.6%)と分離され市販されている抗血清によって分類されないものも多く存在することが明らかになった。

3 検出されたすべての菌株が*aggR*、CVD432を保有していたが、*astA*遺伝子については、O86a:HNMが2株、O126:H27が11株保有し血清型によって*astA*遺伝子の保有に特徴がみられた。

4 分離株すべてが細胞凝集付着性試験によりAAを示し、病原因子が確認された。

5 AAFの保有は、血清型によって異なっており、O86a:HNMはAAF/IV、O126:H27はAAF/II、OUT:H19、UT:HUTはAAF/Iを保有していた。

6 薬剤感受性試験においては、38株中31株(81.6%)がABPCに耐性を示した。また、O127a:H21の6株、OUT:H19の4株OUT:HUTの1株がCTX-M-9 group、CTXと

CAZに耐性を示したOUT:HUTの1株は、CTX-M-1 group ESBL産生菌であった。

7 PFGEによる解析では、大きく血清型で4つのクラスターを形成し、同一のパターンを示す株が5グループ認められた。

## 文献

- 1) 仲西寿男 丸山勉 監修:食品由来感染症と食品微生物, 279-300(2009)
- 2) 中嶋洋ほか:感染症学雑誌, 79(5), 314-321(2005)
- 3) 野田裕之ほか:山梨県衛公研年報, 51, 22-28(2007)
- 4) 伊藤健一郎:病原微生物検出情報, 29(8), 12-14(2008)
- 5) 国立感染症研究所:病原微生物検出情報, 33(1), 1-8(2012)
- 6) Keiko K. et al:Microbiol Immunol, 49(6), 485-492(2005)
- 7) Claudia T. et al:J Clin Microbiol, 41(6), 2669-2671(2003)
- 8) Albert MJ. et al:J Clin Microbiol, 31(5), 1397-1399(1993)
- 9) Hector M. et al:J Clin Microbiol, 33(5), 1414-1417(1995)
- 10) Boisen N. et al:J Infect Dis, 205, 431-444(2012)
- 11) Shibata N. et al:Antimicrob Agents Chemother, 50(2), 791-795(2006)
- 12) Yagi T. et al:FEMS Microb Lett, 184, 53-56(2000)
- 13) 厚生労働科学研究事業 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 平成15年度研究報告書, 10-21(2003)
- 14) 加藤玲ほか:感染症学雑誌, 76(9), 721-729(2006)
- 15) 竹田義弘ほか:広島県保健環境センター研究報告, 12, 21-27(2004)
- 16) 河野喜美子ほか:感染症学雑誌, 72(12), 1275-1282(1998)