

乳糖分解性を指標とした下痢原性大腸菌の解析

水流奈己 吉野修司 荒井路子 元明秀成

Analysis of Diarrheagenic *Escherichia coli* utilizing fermentation of lactose

Nami TSURU, Shuji YOSHINO, Michiko ARAI, Hidenari GANMYO

要旨

腸管出血性大腸菌以外の下痢原性大腸菌について、乳糖分解性を利用して鑑別できるか検討した。乳糖の分解性は、血清型や病原因子による分類で偏りが見られたが、下痢原性大腸菌を分類する明確な指標とはならなかった。しかし、検討に用いた菌株中に、病原因子を持つ *Escherichia albertii* と *Escherichia fergusonii* が含まれていることが明らかとなり、乳糖分解性は大腸菌と大腸菌類縁菌の鑑別には有効である可能性が示唆された。

キーワード 下痢原性大腸菌, 乳糖分解性, *E.albertii*, *E.fergusonii*

はじめに

大腸菌の中でヒトに下痢を起こすものは下痢原性大腸菌と総称され、病原因子などの違いにより、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC), 腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *Escherichia coli* : EIEC), 腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli* : ETEC), 腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli* : EPEC), 腸管凝集付着性大腸菌 (enteroaggregative *Escherichia coli* : EAaggEC, EAEC) の5種類に分類されている。また、それらに準ずる病原因子やマーカーとして、*afa* や *astA*, *CDT*, *cnf* など知られており、食中毒など多数の患者から同一の病原因子を持つ菌株が検出された場合には、下痢症の起原菌である可能性が高いと考えられている。これらのうち EHEC は、選択分離培地やベロ毒素検出用の簡易キットが市販されており、比較的容易に検出が可能である。しかし、その他の下痢原性大腸菌は遺伝子検査による病原因子の検出が必要なため、市中病院などでは見落とされているか、もしくは非病原性の大腸菌であるにもかかわらず病原性大腸菌として報告されている可能性がある。

今回、乳糖分解性を指標とし、培地上で下痢原性大腸菌が鑑別できないか検討したので報告する。

また、下痢原性大腸菌の検討を行う中で、下痢原性大腸菌と同じ病原因子をもつ大腸菌類縁菌を検出したので併せて報告する。

方法

1 材料

1992年～2015年3月に分離された EHEC 以外の下痢原性大腸菌保存株 (以下、下痢原性株) 672株, EHEC O111 保存株 126株を用いた。

2 乳糖非分解性の確認

下痢原性株をマッコンキー寒天培地に 37°C, 1晩培養し、乳糖分解性のスクリーニングを行った。コロニーが赤変しなかった株は、さらにアンドレイド培地を用いて 30日間培養し、30日まで分解しないものを非分解性、2日～30日までに分解したものを遅分解性とした。乳糖非分解性、遅分解性株はそれぞれ血清型、病原因子による分類を行い、血清型に偏りがみられた場合は、同じ血清型の EHEC 株について、乳糖分解性を確認し比較を行った。

3 乳糖分解酵素 (βガラクトシダーゼ) および遺伝子の検出

乳糖非分解性・遅分解性株は ONPG 試験を行い βガラクトシダーゼ産生の有無を確認し、βガラクトシダーゼをコードする *lacZ*¹⁾, 乳糖の膜透過に関わるガラクトシドパーミアーゼをコードする *lacY*²⁾ を PCR 法により検出した。

4 大腸菌類縁菌の検出

ONPG 試験 (+)・*lacZ* (-)・*lacY* (-) の株は、生化学性状試験、大腸菌類縁菌の *E. albertii*, *E. fergusonii* を検出する PCR 法^{3) 4) 5) 6)} を行った。

結果

1 乳糖非分解性株の検出と分類 (表 1・2)

下痢原性株 672 株中、乳糖非分解性株は 22 株 (3.3%)、乳糖遅分解性株は 24 株 (3.6%) であった。血清型による分類では、乳糖非分解性株 22 株のうち、O111 が 12 株 (54.5%) と最も多く、いずれも病原因子として *aggR* が検出された。乳糖遅分解性株 24 株では、O86a が 14 株 (58.3%) と最も多く、病原因子が複数検出された。また、比較に用いた EHEC O111 については、すべて乳糖分解性であった。なお、血清型 O86a は、EHEC が分離されておらず、比較できなかった。

表 1 乳糖非分解性・遅分解性株の分類

| 乳糖分解性 | 血清型 | 病原因子 | 検出数 |
|-------------|-------|---------------------------|-----|
| 非分解 | O111 | <i>aggR</i> | 12 |
| | O26 | <i>eae</i> | 1 |
| | | <i>eae</i> ・ <i>astA</i> | 1 |
| | O55 | <i>eae</i> | 1 |
| | | <i>eae</i> ・ <i>astA</i> | 1 |
| | O119 | <i>astA</i> | 1 |
| | OUT | STp | 2 |
| <i>astA</i> | | 2 | |
| 遅分解 | O86a | <i>eae</i> | 1 |
| | | <i>aggR</i> | 7 |
| | | <i>afaD</i> | 5 |
| | | <i>eae</i> | 2 |
| | O111 | <i>aggR</i> ・ <i>astA</i> | 4 |
| | O55 | <i>aggR</i> | 1 |
| | O119 | <i>aggR</i> ・ <i>astA</i> | 1 |
| | O6 | <i>astA</i> | 1 |
| | O26 | <i>astA</i> | 1 |
| | O127a | STp | 1 |
| OUT | LT | 1 | |

表 2 血清型 O111 の分類と糖分解性

| 分類 | 乳糖分解性 | 検出数 |
|--------|-------|-----|
| EHEC | 分解 | 126 |
| | 非分解 | 12 |
| EAggEC | 遅分解 | 4 |
| | 分解 | 37 |

2 乳糖分解酵素および遺伝子の検出 (表 3)

乳糖非分解性株のうち、ONPG 試験 (-)・*lacZ* (-)・*lacY* (-) が 19 株、ONPG 試験 (-)・*lacZ* (+)・*lacY* (+) が 2 株、ONPG 試験 (+)・*lacZ* (-)・*lacY* (-) が 1 株であった。乳糖遅分解性株のうち、ONPG 試験 (+)・*lacZ* (+)・*lacY* (+) が 20 株、ONPG 試験 (+)・*lacZ* (+)・*lacY* (-) が 3 株、ONPG 試験 (+)・*lacZ* (-)・*lacY* (-) が 1 株であった。

3 大腸菌類縁菌の検出

ONPG 試験 (+)・*lacZ* (-)・*lacY* (-) の 2 株は、生化学性状試験による確認を行った (表 4)。さらに、PCR による大腸菌類縁菌の検出を行った結果、乳糖非分解性株は *eae* を保有する *E.albertii*、乳糖遅分解性株は LT を保有する *E.fergusonii* と同定された。

表 3 β ガラクトシダーゼ及び遺伝子の検出

| 乳糖分解性 | ONPG | <i>lacZ</i> | <i>lacY</i> | 検出数 |
|-------|------|-------------|-------------|-----|
| 非分解 | - | - | - | 19 |
| | - | + | + | 2 |
| | + | - | - | 1 |
| 遅分解 | + | + | + | 20 |
| | + | + | - | 3 |
| | + | - | - | 1 |

考察

下痢原性株のうち、乳糖非分解性株は、EAggEC O111 が最も多い傾向がみられた。しかし、乳糖分解性株も 37 株あり、乳糖分解性を指標とした EAggEC O111 の鑑別は、難しいと考えられた。なお、血清型 O111 は、EHEC にも多く検出されるが、EHEC O111 はすべて乳糖分解性であった。このことから、乳糖非分解性の大腸菌 O111 を分離した場合は、EAggEC を優先的に考慮した方が良いことが示唆された。

乳糖分解酵素及び遺伝子の検出では、いくつかの株で酵素の発現と遺伝子の検出結果に矛盾がみられた。それらのうち、ONPG 試験

(-)・*lacZ* (+)・*lacY* (+) や ONPG 試験

(+)・*lacZ* (+)・*lacY* (-) の株について

は、β ガラクトシダーゼやガラクトシドパーミアーゼをコードする遺伝子は持つもののタンパクとして発現していない株や、乳糖の膜透過性が異なる株である可能性が考えられ、大腸菌と大腸菌類縁菌の鑑別をより難しくしていると考えられた。また、ONPG 試験 (+)・*lacZ*

(-)・*lacY* (-) の 2 株については、β ガラクトシダーゼをコードする遺伝子の配列が異なることが考えられた。

E.albertii は、EPEC と同様に *eae* を持ち、下痢、腹痛、発熱などの症状を呈する食中毒事例が近年多く報告されている。*E.albertii* は EPEC と性状が類似しているため、疑わしいコロニーを分離した場合は、*E.albertii* 特異的な PCR を行い、大腸菌との鑑別を行う必要がある。なお、今回の菌株は、白糖分解性であることから、DHL 寒天培地上では赤色コロニーを示し、より大腸菌と類似していたため、誤同定された可能性が考えられた。

表 4 大腸菌類縁菌疑い株と大腸菌・*E.albertii*・*E.fergusonii* の生化学性状の比較

| 性状 | 乳糖非分解性株 | 乳糖遅分解性株 | 大腸菌 ⁷⁾ | 非定型的大腸菌 ⁷⁾ | <i>E.albertii</i> ⁸⁾ | <i>E.fergusonii</i> ⁷⁾ | |
|-------------------|---|---|-------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----|
| | ONPG 試験 (+) <i>lacZ</i> (-) <i>lacY</i> (-) | ONPG 試験 (+) <i>lacZ</i> (-) <i>lacY</i> (-) | | | | | |
| インドール | + | + | 98 | 80 | 96.2 | 98 | |
| 運動性 | - | + | 95 | 5 | 0 | 93 | |
| ウレアーゼ | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 | |
| クエン酸(シモンズ) | - | - | 1 | 1 | 0 | 17 | |
| 酢酸 | + | + | 90 | 40 | 92.3 | 96 | |
| マロン酸 | - | + | 0 | 0 | 0 | 35 | |
| Voges-Proskauer | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| リジンデカルボキシラーゼ | + | + | 90 | 40 | 100 | 95 | |
| オルニチンデカルボキシラーゼ | + | + | 65 | 20 | 100 | 100 | |
| アルギニンジヒドラゼ | - | - | 17 | 3 | 0 | 5 | |
| ※1 糖 分 解 | ラクトース | - | 95 | 25 | 3.9 | 0 | |
| | サッカロース | + | 50 | 15 | 19.2 | 0 | |
| | アドニトール | - | 5 | 3 | 0 | 98 | |
| | アラビノース | + | 99 | 85 | 100 | 98 | |
| | セロビオース | - | + | 2 | 2 | 0 | 96 |
| | イノシトール | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | マルトース | + | + | 95 | 80 | 88.5 | 96 |
| | マンニトール | + | + | 98 | 93 | 100 | 98 |
| | ラムノース | - | + | 80 | 65 | 0 | 92 |
| | サリシン | - | - | 40 | 10 | 26.9 | 65 |
| | ソルビトール | - | - | 94 | 75 | 57.7 | 0 |
| | トレハロース | + | + | 98 | 90 | 96.2 | 96 |
| | キシロース | - | + | 95 | 70 | 0 | 96 |

※1 糖分解は1晩培養後に判定

E.fergusonii は、敗血症などの報告はあるが、病原性については明らかになっていない。LTをもつ *E.fergusonii* については、2012年に鶏から検出された報告⁹⁾はあるが、ヒトからの検出報告はないことから、今後も注視していく必要がある菌種と考えられた。

今回の解析で、乳糖分解性を利用した下痢原性大腸菌の培地上での鑑別は難しいと考えられた。但し、今回のように大腸菌と誤同定されやすい類縁菌の検出には有効である可能性が示された。*E.albertii*、*E.fergusonii* は、それぞれキシロースやアドニトールなどを用いた選択分離培地が提案されているが、日常的に大腸菌・大腸菌類縁菌を鑑別する培地を考えると、乳糖分解性は良い指標になると思われる。今後、さらに性状などを整理し、大腸菌と類縁菌の鑑別を容易に行うことができる培地を検討していきたいと考えている。

参考文献

- 1) A K Bej, S C McCarty, R M Atlas : Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring, Appl Environ Microbiol,57(8),2429-2432, (1991)
- 2) Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P : Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta-D-galactosidase, Journal of Applied Microbiology,105,970-976, (2008)
- 3) Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, et al. : Evolutionary Genetics of a New Pathogenic *Escherichia* Species:

- Escherichia albertii* and Related *Shigella boydii* Strains. Journal of Bacteriology, 187(2), 619-628, (2005)
- 4) Oaks JL, Besser TE, Walk ST, *et al.* : *Escherichia albertii* in Wild and Domestic Birds. Emerging Infectious Diseases, 16(4), 638-646, (2010)
 - 5) Konno T, Yatsuyanagi J, Takahashi, *et al.* : Isolation and Identification of *Escherichia albertii* from a patient in an outbreak of gastroenteritis, Jpn J Infect Dis, 65, 203-207, (2012)
 - 6) Simmons K, Rempel H, Block G, *et al.* : Duplex PCR Methods for the Molecular Detection of *Escherichia fergusonii* Isolates from Broiler Chickens, Macfarlane GT, ed. Applied and Environmental Microbiology, 80(6), 1941-1948, (2014)
 - 7) Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A. Pfaller : Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition (2007)
 - 8) Ooka T, Seto K, Kawano K, *et al.* : Clinical significance of *Escherichia albertii*. Emerging Infectious Disease 18, 488-492, (2012)
 - 9) J.-Y. Oh, M.-S. Kang, B.-K. An, *et al.* : Isolation and epidemiological characterisation of heat-labile enterotoxin producing *Escherichia fergusonii* from healthy chickens, Veterinary Microbiology, 160, 170-175, (2012)