毒素原性大腸菌検出における Salting out による Hydrophobicity-test の応用

大阪空港検疫所

本田 俊一 後藤 郁夫 広瀬 英昭
市来 重光 池田 長繁 浅野 信夫

大阪大学微生物病研究所

本田 武司 Kesera Kesemsukul Nedim Cakir 三輪谷俊夫

(昭和61年 6月19日受付)

(昭和61年 9月 9日受理)

Key words : *Enterotoxigenic Escherichia coli*, Hydrophobicity,
Salting out

要 旨

海外旅行者下痢症患者180名より直接分離して得た *Escherichia coli* 821株について Hydrophobicity を Salting out 法で調べた結果を得た。

- (1) Hydrophobicity 陽性で毒素産生株は137株, 毒素非産生株は20株であった。
 - (2) Hydrophobicity 陰性で毒素産生株は29株, 毒素非産生株は635株であった。
 - (3) Hydrophobicity 陽性で ST 単独産生株は54株, LT 単独産生株は17株, ST-LT 両産生株は66株, 毒素非産生株は20株であった。
 - (4) Hydrophobicity 陰性で ST 単独産生株は21株, LT 単独産生株は 3 株, ST-LT 両産生株は 5 株, 毒素非産生株は635株であった。
 - (5) 180名中55名より毒素原性大腸菌が分離され, 得られたすべての大腸菌に対し, Hydrophobicity を Salting out 法でスクリーニングした場合, Sensitivity 83%, Specificity 97%で検出が可能であった。
- 以上の結果より毒素原性大腸菌検出の迅速化, 省力化に Hydrophobicity を Salting out 法によって調べスクリーニングする方法が有効であると考えられる。

緒 言

近年, 毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC と略す) は, 下痢原因菌として注目を集め, 特に旅行者下痢症の主要な原因菌であることが明らかになってきた¹⁾。我が国においても海外旅行者の増加に伴い ETEC の海外からの輸入例が多数報告されている²⁾³⁾。また, 国内散発性感染例の報告もある⁴⁾⁵⁾。

しかし, ETEC を同定するためには, 下痢患者から得られた 5 個以上の大腸菌集落について,

個々に生化学性状はもとより毒素産生能を調べなければならない⁶⁾。従って, 検体数, 検査対象菌種が多い場合, 培地の準備や, 毒素産生能試験のための乳飲みマウスの恒常的調達等, 経済的, 労力的, 時間的問題があり一般検査室では苦慮するところである。

近年, 既知の定着因子 (Colonization factor antigens, CFA と略す) を有する ETEC は, 常に高い Hydrophobicity を有することが明らかにされた⁷⁾⁸⁾。そこで, 海外旅行者下痢症患者より分離された大腸菌について, ETEC の同定を常法で実施すると同時に, その Hydrophobicity を簡便な

Salting out 法⁸⁾によって調べ、平易で安価な ETEC 同定のスクリーニング法として Salting out 法による Hydrophobicity-test 導入の有用性について検討したので報告する。

材料及び方法

1. 検査対象

1985年1月から3月までの期間で、主としてコレラ汚染地域から来た乗客のうち、過去2週間以内に、下痢、嘔吐、発熱、等の症状を呈し検便の結果、自然排便を得られた場合に、その糞便を材料とした。

2. 検査方法

(1) 大腸菌及び ETEC の同定

糞便を直接 DHL 寒天培地上に塗抹し37℃18時間培養後、大腸菌を疑う赤色集落を1検体あたり5個釣菌し、生化学性状試験を常法⁹⁾に準拠して実施し、大腸菌の確認をした。

生化学性状試験と並行して、分離株の毒素産生性を調べた。易熱性エンテロトキシン (Heat-labile enterotoxin, LT と略す) は、Honda らの Elek 変法¹⁰⁾に準拠して実施し、耐熱性エンテロトキシン (Heat-stable enterotoxin, ST と略す) の検査は Takeda らの乳飲みマウスを用いる方法¹¹⁾に準拠して実施した。

(2) ETEC 以外の下痢原性病原菌の検索

Vibrio cholerae(O1及び non-O1), *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio mimicus* 検索は、TCBS 寒天培地に直接分離し、1% NaCl 加アルカリペプトン水 (pH 8.6) で増菌培養後、TCBS 寒天培地とビブリオ寒天培地に分離した。赤痢菌と *Salmonella* は、SS 寒天培地と DHL 寒天培地に直接分離した。さらに *Salmonella* はセレナイト培地で増菌後分離した。

分離菌株の同定は、常法¹²⁾に準拠した。

(3) Hydrophobicity-test

生化学性状試験に並行して、CFA 培地¹³⁾に37℃18—24時間培養後、Lindahl らの Salting out 法⁸⁾に準拠して実施した。すなわち0.002mol の Na_2HPO_4 溶液で作製した0.5mol の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液 [pH 6.8 (NH_4OH で調整)] 1 エーゼ液に対し、等量の生理食塩水に CFA 培地からの菌を

浮遊させスライドガラス上でまぜあわせ、肉眼で観察し30秒以内に明瞭な凝集を認められるものを Hydrophobicity 陽性と判定した。

結 果

(1) ETEC の検出状況

1検体あたり、DHL 寒天培地より5個の赤色集落を同定し、そのうち1株でも ETEC と同定できた場合、その検体の患者を毒素原性大腸菌症と診断した。結果は Table 1 に示すとおりで、180例のうち55例が毒素原性大腸菌症と診断でき、検出率は30.6%であった。また同時に実施した他の下痢原性病原菌の分離状況 (Table 2) と比較すると、赤痢菌が6.7%, *Salmonella* が10%で ETEC の検出率が最も高かった。

(2) Salting out 試験の成績

55例の毒素原性大腸菌症例のうち45例より Salting out 法により Hydrophobicity 陽性の ETEC 株が得られた (Table 1)。従って Hydrophobicity-test によるスクリーニングの効果は81.8% (45/55) であった。

全検体から得られた菌株のうち、大腸菌と同定できたのは821株で、このうち ETEC は166株であった。これらのうち Hydrophobicity 陽性で毒素産生株は137株 (16.7%)、毒素非産生株は20株 (2.4%)、Hydrophobicity 陰性で毒素産生株は29株 (3.5%)、毒素非産生株は635株 (77.3%) であっ

Table 1 Relation of Hydrophobicity test and number of cases of Enterotoxigenic *E. coli* from traveller's diarrheas

No. of stool of examined	No. of ETEC positive cases	No. of Hydrophobicity positive cases
180	55	45

Table 2 Isolation of various pathogens from traveller's diarrhea

No. of stool examined	180(100%)
No. of positive cases	88(48.9)
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	55(30.6)
<i>Salmonella</i>	18(10.0)
<i>Shigella</i>	12(6.7)
<i>G. lamblia</i>	3(1.7)

Table 3 Relation of hydrophobicity test and toxin production of *E. coli* isolated from traveler's diarrheas

Hydrophobicity	Toxin production	No. of strains
+	+	137
+	-	20
-	+	29
-	-	635

た (Table 3). 従って Hydrophobicity-test の精度は, Sensitivity 82.5% (137/137+29), Specificity 97% (635/635+20) であった.

(3) Hydrophobicity と産生毒素の型との関係について

得られた166株の ETEC のうち ST 単独産生株は75株あり, そのうち Hydrophobicity 陽性株は54株, 陰性株は21株であった. LT 単独産生株は20株あり, そのうち Hydrophobicity 陽性株は17株, 陰性株は3株であった. ST-LT 両産生株71株あり, そのうち Hydrophobicity 陽性株は66株, 陰性株は5株であった (Table 4).

Hydrophobicity-test の ST 単独産生株に対する Sensitivity は72%, LT 単独産生株に対しては85%, ST-LT 両産生株に対しては93%であった.

考 察

ETEC が海外旅行者下痢症の重要な原因菌として注目を集めて久しいが²⁾³⁾⁶⁾, 今回の調査においても同様の結果を得た. 以前1979年に実施した当検疫所での調査では, ETEC の検出率は19.9%であったが²⁾, 今回の調査では30.6%であり, 期間を限定し有症自然排便に限って調査したことを考慮しても, 増加の傾向があることが考えられる. また, 他の下痢原性病原菌と比較しても, ETEC は海外旅行者下痢症の主要原因菌であることがわかった. 今後も海外旅行者が増加の傾向にあることから, 益々疫学的監視を強化する必要があると考えられる.

ETEC の産生する毒素は, ST, LT があるが, とりわけ LT は生物学的, 物理化学的及び生物学的性状がコレラエンテロトキシンに類似し, また免疫学的にも共通抗原性を有している^{14)~16)}ため, 症状もコレラ患者に類似する¹⁷⁾.

Table 4 Relation of hydrophobicity test and type of toxins produced by *E. coli*

Hydrophobicity	ST	LT	ST+LT	No. of strains
+	+	-	-	54
+	-	+	-	17
+	-	-	+	66
+	-	-	-	20
-	+	-	-	21
-	-	+	-	3
-	-	-	+	5
-	-	-	-	635

検疫所では, 主として検疫伝染病であるコレラ菌の検出を目的に, コレラ汚染地域から到着した乗客を対象に検便を実施しているが, 毒素原性大腸菌症とコレラを臨床症状から鑑別することは, 極めて困難である. コレラ症状を呈しているにもかかわらず, コレラ菌はもとより, 他の下痢原性病原菌が分離されなかった場合, ETEC を検出すれば, 逆にコレラ菌を確実に否定する材料のひとつになりえる. しかし, そのためにすべての検便対象者から分離される大腸菌に対して, ETEC の同定を行なうことは, 労力的にも大きな負担が強いられるのが実情である.

今回は, このような現状を解決するため, ETEC 検出のスクリーニング法として特別な試薬の全く要らない Salting out 法を応用してみた. この新しいスクリーニング法により Hydrophobicity 陽性株のみ同定した場合, 労力的, 経済的節約は約80%で, かつ Sensitivity 83%, Specificity 97% で同定可能であった. 特に ST-LT 両産生 ETEC に対して Sensitivity 93%で, スクリーニング法としては有効な方法であると考えられる. 又 Specificity が97%という結果は, ETEC を否定する場合のスクリーニングとして高い信頼性のあることを示している.

本法は, 技術的に極めて容易で, しかも安価なスクリーニング法なので, 釣菌集落数を更に増やしても, 労力的にはほとんど影響なく, 更に高いスクリーニングの効果が得られる. したがって本法は, 一度に多数の検査検体を対象にする場合や, 疫学調査などにスクリーニング法として応用が可

能である。

今回の成績では、ETECのうちHydrophobicity陽性の比率が82.5%と従来我々が報告した成績¹⁸⁾よりも高かった。おそらく今回は *E. coli* の直接分離と同時に Hydrophobicity を調べたために、菌株の保存による Plasmid の脱落等が防げたためと考えられる。しかし今回の調査でも Hydrophobicity 陰性の ETEC が24株あった。このことは新しい CFA の存在を示唆すると共に、Hydrophobicity-test の感度の問題も考えられ、今後関与している CFA の分析、CFA 寒天培地の改良等検討を要すると考えられる。

本論文の要旨は、第60回日本感染症学会総会において発表した。

文 献

- Merson, M.H., Morris, G.K., Sack, D.H., Wells, J.G., Feely, J.C., Sack, R.B., Greech, W.B., Kapikian, A.Z. & Gangarosa, E.J.: Travelers' diarrhea in Mexico. A prospective study of physicians and family members attending a congress. *New Eng. J. Med.*, 294: 1299—1305, 1976.
- 阿部久夫, 神田輝雄, 柳井慶明, 他: 海外旅行者下痢症の細菌学的研究. *感染症誌*, 55: 679—690, 1981.
- 竹田美文: 輸入感染症の疫学. *臨床と細菌*, 10: 5—13, 1983.
- 内村真佐子, 三瓶憲一, 小岩井健司, 七山悠三, 福田トヨ子, 鈴木和夫, 菅野治重, 小林章男: 散发下痢患者由来の毒素原性大腸菌. *感染症誌*, 57: 783—787, 1983.
- 竹田多恵, 竹田美文, 三輪谷俊夫: 毒素原性大腸菌感染症の散发事例. *感染症誌*, 56: 1160—1163, 1982.
- 三輪谷俊夫, 神中 寛, 竹田美文, 工藤泰雄, 他: コレラ菌と毒素性大腸菌の検査法. 菜根出版, 51—52, 1981.
- Faris, A., Wadstrom T. & Freer, H.: Hydrophobic adsorptive and hemagglutinating properties of *Escherichia coli* possessing colonization factor antigens (CFA/I or CFA/II), type 1 pili or other pili. *Curr. Microbiol.*, 5: 67—72, 1981.
- Lindall, M., Faris, A., Wadstrom, T. & Hjerten, S.: A new test based on 'SALTING OUT' to measure relative surface Hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 677: 471—476, 1981.
- 坂崎利一, 田村和満: 細菌真菌検査. 日本公衆衛生協会, 219—227, 1978.
- Honda, T., Taga, T., Takeda, Y. & Miwatani, T.: A modified elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.*, 13: 1—5, 1981.
- Takeda, Y., Takeda, T., Yano, T., Yamamoto, K. & Miwatani, T.: Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 25: 978—985, 1979.
- 坂崎利一, 田村和満: 細菌真菌検査. 日本公衆衛生協会, 120—132, 195—249, 304—317, 1978.
- Evans, D.G., Evans, D.J. Jr., Tjor, W.S. & Dupont, H.L.: Detection and characterization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adult with diarrhea. *Infect. Immun.*, 19: 727—736, 1978.
- 大橋 誠, 善養寺浩: 大腸菌エンテロトキシン. *日本細菌学雑誌*, 32: 455—468, 1977.
- 竹田美文: コレラ菌及び毒素原性大腸菌が産生するエンテロトキシンとその作用機作. *医学のあゆみ*, 111: 861—867, 1979.
- Evans, D.J., Evans, D.G. & Gorbach, S.L.: Production of vacuolar permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8: 725—730, 1973.
- Sack, R.B., Gorbach, S.L., Banwell, J.G., Jacobs, B., Chatterjee, B.D. & Mitra, R.C.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.*, 123: 378—385, 1971.
- Honda, T., Khan, M.M.A., Takeda, Y. & Miwatani, T.: Grouping of enterotoxigenic *Escherichia coli* by hydrophobicity and its relation to hemagglutination and enterotoxin productions. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 17: 273—276, 1983.

Diagnosis of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Hydrophobicity Test
Using Salting Out

Shun-ichi HONDA, Ikuo GOTO, Hideaki HIROSE, Shigemitsu ICHIKI,
Nagashige IKEDA & Nobuo ASANO

Osaka Airport Quarantine Station

Takeshi HONDA, Kesera KESEMUSUKUL, Nedim CAKIR & Toshio MIWATANI

Reserach Institute for Microbiological Diseases, Osaka University

The value of hydrophobicity test based on salting out was examined by using *Escherichia coli* isolated from traveller's diarrhea in order to diagnose enterotoxigenic *E. coli*. In all, 821 *E. coli* isolates from 180 diarrheal patients were tested and the following results were obtained.

- 1) Out of 157 strains of positive hydrophobicity test, 137 and 20 strains were enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *E. coli*, respectively.
- 2) Out of 664 strains of negative hydrophobicity test, 29 and 635 strains were enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *E. coli*, respectively.
- 3) Among strains of positive hydrophobicity test, 54, 17 and 66 produced only heat-stable enterotoxin (ST), only heat-labile enterotoxin (LT) and both ST and LT, respectively.
- 4) Screening efficiency for identifying enterotoxigenic *E. coli* by salting out test was 83% in sensitivity and 97% in specificity.

These data suggest that the hydrophobicity test using salting out is a rapid, inexpensive, and simple screening test for enterotoxigenic *E. coli*.