

琉球大学学術リポジトリ

[原著] 腸管及び尿路からの病原性大腸菌の諸性状に関する検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): E. coli, urinary tract infection, type I pili, hemagglutinin 作成者: 大湾, 知子, 本馬, 恭子, Owan, Tomoko, Honma, Yasuko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015940

腸管及び尿路からの病原性大腸菌の諸性状に関する検討

大湾知子、本馬恭子

琉球大学医学部細菌学講座
(1994年6月9日受付、1994年9月5日受理)Characterization of Entero- and Uro-Pathogenic *Escherichia coli*

Tomoko Owan and Yasuko Honma

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus,
207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-01 Japan

ABSTRACT

Fifty strains of diarrheagenic *E. coli* (isolated from human diarrheal stool specimens) and 49 strains of uropathogenic *E. coli* (from human infected urinary specimens) were characterized for their biological behaviors: 38.9% of the latter strains produced hemolysin, while only 10% of the former did so. Resistance to human serum was identified in approximately 20% of the two groups. However, high susceptibility to the bactericidal effect of human serum was more commonly observed in the diarrheagenic strains. Protease productivity, extracellular protein secretion, and presence of Type I pili were observed in an equivalent population of the two groups. In contrast, the presence of hemagglutinin other than Type I pili were observed in 45.9% of diarrheagenic group compared to 23.1% of the uropathogenic group. SDS-PAGE profiles of whole cell lysates showed some differences in protein distribution between the two groups for some selected strains. *Ryukyu Med. J.*, 14 (4) 231~234, 1994

Key words : *E. coli*, urinary tract infection, type I pili, hemagglutinin

緒 言

大腸菌 (*Escherichia coli*) は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌でヒトおよび各種動物の腸内に常在する共生体であるとともに、ある種の大腸菌はヒトおよび動物に種々の疾患を起こす病原細菌でもある¹⁾。大腸菌によるヒトの疾患は腸管および尿路を主とするほか、髄膜炎・胆道炎から敗血症に至るまで広範囲に認められる。大腸菌が常在する腸管に病変を起こすものは他の大腸菌と異なった特有の病原因子を持つことが知られている²⁾。しかし、通常無菌状態の尿路・髄膜腔等で病変を起こすものについては、上部尿路感染に関連したP-線毛などのほか³⁾、その病原因子が余り詳しくは分かっていない。今回我々は尿路感染症を起こす大腸菌の病原因子を研究する糸口として、尿路病原性大腸菌の持つ性質を腸管病原性大腸菌と比較した。

材料と方法

1. 使用菌株

ケニア及びインドネシアで下痢患者の便から分離した各種腸管病原性大腸菌50株と沖縄県内の病院で患者の感染尿から分離した大腸菌49株を使用した。

尿路からの大腸菌は10倍段階希釈法によって10⁶CFU/ml以上の細菌尿から分離したものであり、本文中では仮に尿路病原性大腸菌と称する。

2. 赤血球凝集性

赤血球はモルモットの2%洗浄赤血球を用い、菌体は、ハートインフュージョンブイヨン(HIB)で37°C、48時間培養したものを11,000rpm、15分間遠心した後、生理的食塩水で濃厚懸濁液として用いた。両者を1滴ずつスライドグラス上で混合し、凝集を肉眼で判定した。

3. 溶血素産生性

7%ヒト血液寒天培地(基礎培地:ハートインフュージョン)に各株を一点穿刺法で接種し、37°C、24時間培養後、溶血環の有無によって定性的に判定した。

4. プロテアーゼ産生性

3%スキムミルク(Difco)加ハートインフュージョン寒天培地(HIA)に各株を一点穿刺法で接種し37°C、24時間培養後、コロニーの周囲に透明環が生じたものを陽性として定性的に判定した⁹⁾。

5. 血清感受性

ヒト新鮮血清100 μ lにHIBで一夜培養した菌を生理的食塩水で100倍に希釈したもの(菌数約 10^6 CFU/ml)を10 μ lを加え(最終菌濃度約 10^5 CFU/ml)、37°C、2時間静置した後菌数計算を行った。

菌数 $>10^5$ CFU/mlをヒト血清に耐性であるとして(-)、($10^3 <$ 菌数 $\leq 10^5$)CFU/mlを(+)、($10^2 <$ 菌数 $\leq 10^3$)CFU/mlを(++)、菌数 $\leq 10^2$ CFU/mlを(+++)として判定した。

6. 分泌蛋白量

分泌蛋白量は、100ml用三角コルベンを用い、Davisの大腸菌用最小培地¹⁰⁾10mlに菌を接種し35°C、24時間振盪培養(85回/分)後、14,000rpm、15分間遠心した上清中の蛋白濃度をLowry法により測定した⁹⁾。標準曲線にはBovine serum albumin(sigma)を用いた。

7. Type I 線毛

Type I 線毛の検出は抗Type I 線毛血清による菌体の凝集およびマンノース感受性のモルモット血球凝集反応によって行ない、同時に菌体による赤血球凝集のマンノース感受性を検査した。

菌体は赤血球凝集性を判定した方法と同様に生理的食塩水で濃厚菌液(NSS)としたもの、および1% D-マンノース加生理的食塩水で濃厚菌液(MAN)としたものの2種類を用いた。

抗体による凝集は、抗Type I 線毛血清および生理的食塩水濃厚菌液のそれぞれ1滴をスライドグラス上で混合し凝集の有無を判定した。

モルモット血球凝集反応のD-マンノース感受性検査では、2種類の菌液一滴(NSS、MAN)にそれぞれ一滴ずつの2%洗浄血球をスライドグラス上で混合して凝集の有無を判定した。

8. 菌体構成蛋白

HIBで37°C、24時間静置培養した菌体をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で処理したwhole cell lysateを

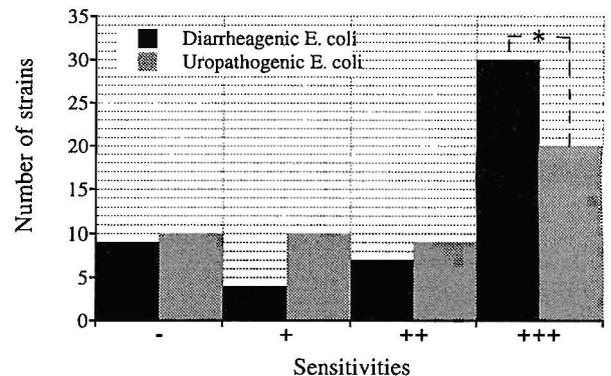


Fig. 1 Susceptibility of *E. coli* to human serum, -: resistant, +: slightly, ++: moderately, +++: strongly sensitive *: $p < 0.1$

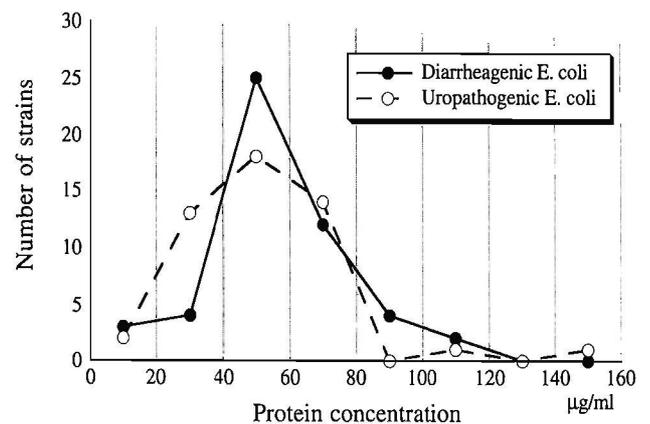


Fig. 2 Frequency distribution of protein concentration in the culture supernatant.

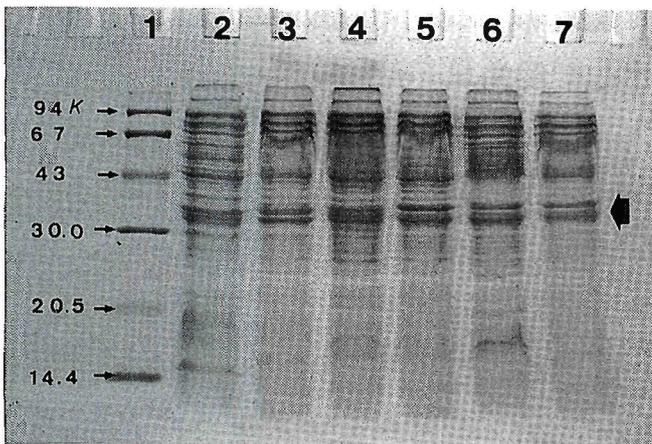
LaemmliのSDS電気泳動¹¹⁾で分析した。

結 果

腸管病原性大腸菌群と尿路病原性大腸菌群の示す各種性状を比較した結果、モルモット赤血球を凝集させる株は腸管群で74% (37/50)、尿路群では80% (39/49)であった。溶血性を有する株は、腸管群の10% (5/50)に対して尿路群では38.8% (19/49)であり、この差を χ^2 検定を用いて有意水準 $p < 0.01$ で検定すると有意に差が認められた。スキムミルク消化性のプロテアーゼが陽性を示した株は腸管群で18% (9/50)、尿路群では14.3% (7/49)であった。ヒト血清に耐性であった株(-)は、腸管群で18% (9/50)、尿路群では20.4% (10/49)と殆ど同様な頻度であったが、高度感受性(++++)株は腸管群で60% (30/50)、尿路群では40.8% (20/49)であり(Fig. 1)、有意水準 $p < 0.1$ で有意に差が認められた。

Table 1 Classification of agglutination pattern

Agglutination of <i>E. coli</i> to I	Hemagglutination ¹		Number of strains	
	α -Type	NSS	MAN	A
+	+	-	20	29
+	+	+	17	8*
-	-	-	13	10
-	+	-	0	1
-	+	+	0	1

NSS: Suspension of *E. coli* in 0.9% NaClMAN: Suspension of *E. coli* in 0.9% NaCl with 1%
D-mannoseA: Diarrheagenic *E. coli*B: Uropathogenic *E. coli*¹Guinea pig erythrocytes* $p < 0.05$ Fig. 3 SDS PAGE profile of diarrheagenic *E. coli* and uropathogenic *E. coli* (whole cell lysates).

Lane 1: molecular marker

Lane 2, 3, and 4: Diarrheagenic *E. coli*Lane 5, 6, and 7: Uropathogenic *E. coli*

腸管群大腸菌の培養濾液中に出現した総蛋白量は最低15 $\mu\text{g/ml}$ から最高113 $\mu\text{g/ml}$ の間に分布していた(平均値 \pm SD=57.9 \pm 20.6)。一方尿路群の培養濾液では最低17 $\mu\text{g/ml}$ 、最高142 $\mu\text{g/ml}$ であり(平均値 \pm SDは50.5 \pm 23.4)、各株の分泌蛋白量は両群とも殆ど同一の分布を示した(Fig. 2)。Type I線毛の保有率(抗Type I線毛抗体による凝集)は、腸管群で74.0% (37/50)、尿路群では75.5% (37/49)であった。Type I線毛保有菌株のうち赤血球凝集性がD-マンノース処理によって完全に消失された株は腸管群で54.1% (20/37)、尿路群では78.4% (29/37)であった。血球凝集がD-マンノース処理によって完全に抑制されない菌株(Type I以外の線毛あるいは凝集素を同時に保有する株)は腸管群で45.9% (17/37)、尿路群では21.6% (8/37)にみられた。この差の有意水準は $p < 0.05$ であった。モルモット血球を凝集しないものが腸管群で26%

(13/50)、尿路群で20% (10/49)にみられた。これらの株についてヒト赤血球の凝集性をみると両群とも凝集しなかった。Type I線毛をもたずモルモット赤血球を凝集する株は尿路群の2株のみであった。抗Type I線毛による菌体凝集と菌体による血球凝集との関係をTable 1に示した。

whole cell lysateの電気泳動像では両群から無作為に選んだ3株各々を比較したところ分子量約35KDaの外膜蛋白と思われる部分に両群の差を認めた(Fig. 3)。

考 察

今回、腸管病原性大腸菌と上記の方法で判定した尿路病原性大腸菌を比較してみると線毛を含めた赤血球凝集素の分布などにおいて両群間でかなりの差がみられた。溶血性の頻度では尿路群の方がかなり高値を示し($p < 0.01$)、血清感受性については尿路群が血清殺菌能にやや耐性を示す傾向がみられた。このように尿路感染症患者から分離された大腸菌は、赤血球凝集能、溶血素産生性ならびに血清抵抗性などにおいて特徴をもつ傾向にあり、これはHughsらの報告とも一致している⁷⁾。健康人の糞便から分離した大腸菌については今回データを示さなかったが、健康人由来の大腸菌は溶血性においては、腸管病原性大腸菌と同率であり、プロテアーゼ産生株は全くみられなかった(0/50)ことから溶血素産生は尿路病原性大腸菌の特質であり、プロテアーゼも尿路・腸管双方に対して病原性との関わりが疑われる。線毛を含めた赤血球凝集素の分布ではマンノース耐性の凝集素を持つ株が腸管群において有意に高率であったが、これは腸管病原性大腸菌においては定着因子として多い赤血球凝集性線毛が確認されていることから充分考えられることである。尿路群では大半の株において赤血球凝集素がType I線毛のみであったことからType I線毛と尿路病原性の関係を解明する必要がある。尚、定着因子としての可能性が高い線毛の産生は培養条件によって著しく異なるため*in vivo*(感染の現場)に於ける菌の生態を明らかにしなければ病原因子としての確認は出来ないであろう。

今日では腸管病原性大腸菌に関してはその同定基準が明確であり、他の大腸菌でみられない各種の定着因子、侵入因子、毒素などの存在が明らかにされている。これに反して尿路病原性大腸菌についてはその基準が余り明確でなく、腎盂炎と関連の深いP-線毛など一部の病原因子を除けば不明な点が多い。従って、現在は白血球尿で菌数が 10^6 CFU/ml以上ある場合その菌が現症の起炎菌であると判定することになっている。これまで尿路感染症の起炎菌が腸管病原性大腸菌であっ

たという報告はみられず、また無症候性細菌尿の存在などを考えると尿路病原性大腸菌は他の大腸菌と異った特有の性状(未知であるが)を持つことは確かだと言える。

参考文献

- 1) Levine, M. M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-389, 1987.
- 2) Kallenius, G., Svenson, S. B., Hultberg, H., Mollby, R., Helin, I., Cedergren, B., and Winberg, J.: Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Lancet* 2: 1369-1372, 1981.
- 3) Sokol, P. A., Ohman, D. E., and Iglewsky, B. H.: A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 4: 538-540, 1979.
- 4) 森 良一, 天児和暢: 戸田新細菌学. 南山堂: 43-46, 1991.
- 5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
- 6) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.
- 7) Hughes, C., Hacker, J., Roberts A., and Goebel, W.: Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 39: 546-551, 1983.