

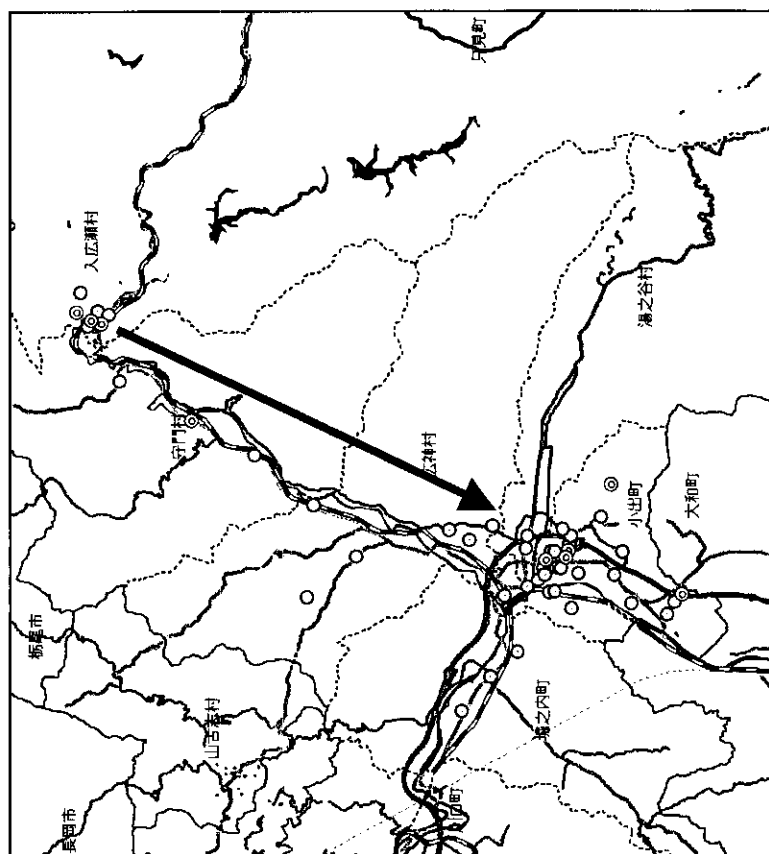
表1 検査材料の内訳

(集団発生)

事例	施設	発生日	陽性数/患者	陽性数 /従事者+食品	遺伝子解析数
1	養護施設	13年 4月	5/5	0/6+6	3
2	保育所	13年 5月	5/13	0/5+6	2
3	保育所	13年 5月	7/13	1*/3	2
4	保育所	13年 12月	1/2	0/1	1
5	旅館	14年 1月	7*/7	5*/5+17	7
6	小学校	14年 1月	5*/9	1*/1	3
小計			30/49	7/50	18
(感染性胃腸炎)					
7 GE		13年 5・6月	4		4
8 GE		13年 11・12月	8		8
合計			42	7/50	30

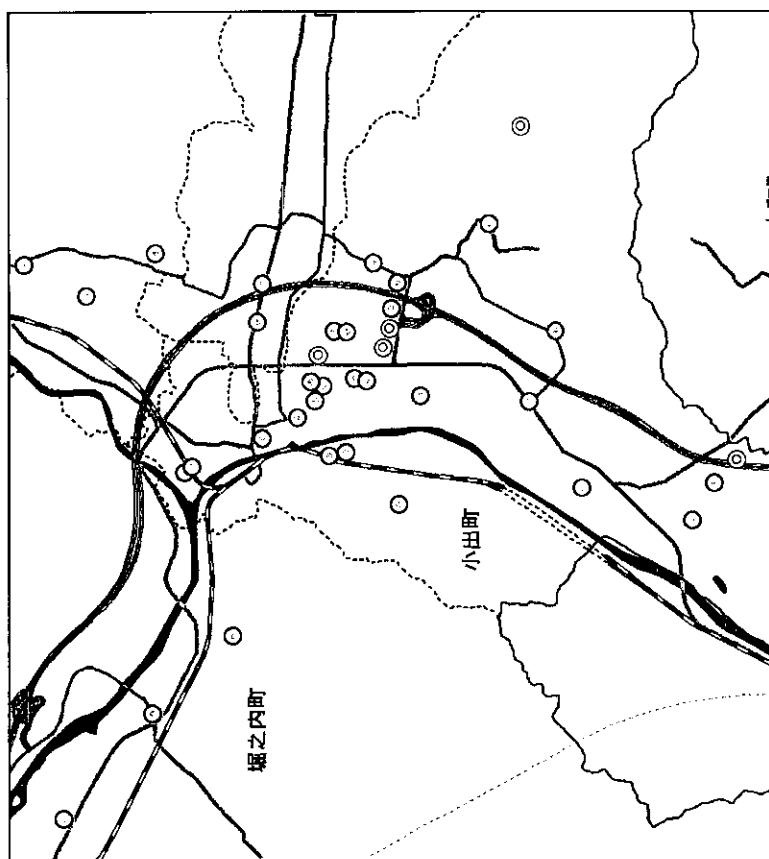
*遺伝子解析分含む

図1 無菌性髄膜炎患者分布



○:無菌性髄膜炎患者
◎:無菌性髄膜炎患者—家族内発症例あり

図2 無菌性髄膜炎患者分布—拡大図



○:無菌性髄膜炎患者
◎:無菌性髄膜炎患者—家族内発症例あり

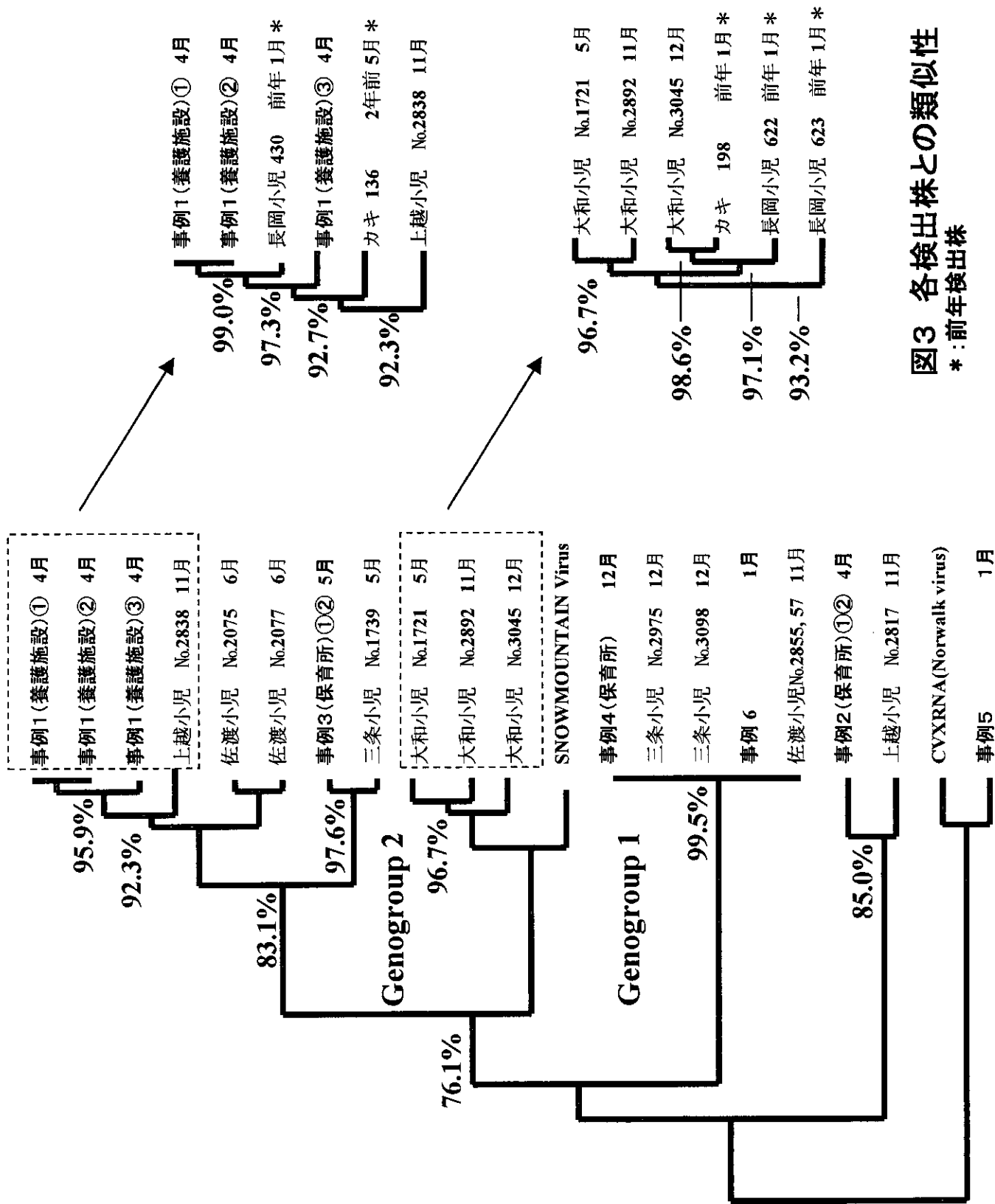


図3 各検出株との類似性

* : 前年検出株

平成 13 年度 生活安全総合研究事業

(研究課題：食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究)

分担研究「食品中の大腸菌汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究」

分担研究者	国立公衆衛生院衛生微生物学部細菌室	伊藤 健一郎
研究協力者	埼玉県衛生研究所感染症担当臨床微生物	倉園 貴至
	愛知県衛生研究所微生物部環境微生物科	山崎 貢
	岡山県環境保健センター微生物科	中嶋 洋
	佐賀県衛生薬業センター微生物課	森屋 一雄

概要 下痢原性大腸菌の新しいカテゴリーとして提唱されている局在性及び凝集性付着大腸菌の病原性はまだ明快ではない。また、食品の本菌による汚染状況の調査もほとんどされていない。本分担研究では、本菌群の病原性検査法の確立と汚染状況を把握することを目指している。初年度は検査の標的になる遺伝子の探索と生物学的検査法のための準備を行った。また、食品における大腸菌の予備的な調査を行い検査法について検討した。

局在性付着大腸菌、凝集性付着大腸菌のスクリーニング検査用の Multiplex PCR EpAll(*eae*, *aggR+astA*)に、さらに標的遺伝子を増やし、拡散型付着性大腸菌の病原関連遺伝子を加え 4 回の検査で 13 種類の遺伝子が検査できるようにした。生物活性の測定法として、従来法より簡便で迅速なコンタクトヘモリシス法を検討した。局在性付着大腸菌と出血性大腸菌は、異なる条件を使う必要があることが明らかになった。本法は簡便であるため、病原性の検索に有効で、引き続き条件の検討と分離株の検査を行う。

疫学的に局在性または凝集性付着大腸菌の下痢原性を調べるため、患者対照比較を行っている。今年度は、散発下痢症患者由来大腸菌 1,588 株及び健康者由来大腸菌 61 株を調べ、前年度までの結果と併せ統計的な解析を行った。日本における付着性関連遺伝子陽性大腸菌の血清型は、国際的に対象となっている血清型とは大きく異なっていた。患者と対象者における分布や付着性関連遺伝子の保持状況から、*eae* 陽性株では O128:H2 が、*aggR* 陽性株では O111:H21 が下痢起因菌と推測された。Fisher の正確な検定では、*aggR* 陽性の O111 は有意差が見られ、下痢起因菌と思われた。*eae* 陽性株については全体では有意差は見られなかった。血清型間の比較にはさらに多くの調査数が必要である。また、分離数では 1 位と 2 位の O1:H7 と O18:H7 は、調べた因子は陰性であり、血清型の見直しが必要と思われた。

平成 13 年にキムチによる O157 の全国的な流行が見られたこともあり、漬物を例として、集団食中毒の原因食品を調べる際の検査法で、汚染状況の予備調査を行った。各種方法により大腸菌の検出を試みたところ、全体として 22.2%から検出された。下痢原性大腸菌は検出されなかったが、下痢原性大腸菌と非下痢原性大腸菌の生物学的性状がほとんど同じであることを考慮すると下痢原性大腸菌による汚染が起きる可能性はある。しかし、汚染指標菌として糞便系大腸菌群を調べる検査法では食品中の下痢原性大腸菌を見落とすことも想定されことから、食品を汚染する下痢原性大腸菌を対象とした監視体制の構築が必要と思われる。

A 研究目的

下痢原性大腸菌は、腸管出血性大腸菌 O157:H7 による全国的集団発生以来、一躍注目されるようになった。毒素原性大腸菌についても患者数 100 名以上の集団事例が連続して発生するなど、常に細菌感染症の原因の上位を占めている。

ヒトに下痢を起こす大腸菌は、下痢原性大腸菌と総称され、いろいろな病原機序を持っている。また、新しい病原機序を持つ大腸菌も引き続き提案されている。1979 年に Cravioto らが「培養細胞に付着する大腸菌群が疫学的に下痢原性菌と関連している」ことを報告してから、細胞付着性が注目されている。付着型の異なる 2 種類の大腸菌が下痢原性とされ、EPEC を「腸管粘膜上皮細胞に細胞骨格障害を生じる志賀毒素非産生性の下痢原性大腸菌」、腸管凝集性大腸菌、EAggEC を「凝集型で接着し、既知の腸管毒素を産生しない大腸菌」と定義して、既知の 3 つのカテゴリーの大腸菌、

(1) 腸管毒素原性大腸菌、ETEC、病原因子は腸管毒素と定着因子、

(2) 腸管侵入性大腸菌、EIEC、病原因子は細胞侵入性、

(3) 腸管出血性大腸菌、EHEC、病原因子はベロ毒素、

に加え 5 つのカテゴリーとする成書が多い。

しかし、付着性大腸菌には病原性を持たない菌も含まれている。海外の患者対照研究では、両菌群ともその病原的有意性を否定する結果が報告されている。我々の佐賀県及び愛知県の患者及び年齢を一致させた健康保育園児の比較調査においても、大腸菌の付着に関連する遺伝子、*eae* (インチミン)、*aggR* (凝集性付着発現因子)、*astA* (凝集性大腸菌の耐熱性腸管毒素) の分布には有意性が見られなかった。項目を検討し、さらに詳しく調査する必要がある。

ひとつは検査の対象とする遺伝子の特定である。前述の調査では、付着性大腸菌の因子として、病原性解明の初期段階で発見された代表的な遺伝子のみを調べたので、他の必要な遺伝子が脱落したり変異している可能性や遺伝子の発現がなく生物活性を持たない可能性が考えられる。付着性大腸菌の役割を明らかにするために、全国的な調査が必要であるが、病原性関連遺伝子は数多く報告されており、その中から調査の対象とする遺伝子を絞る必要がある。そのためには、生物活性や遺伝子の発現を調べ、どの遺伝子が必要十分な因子かを特定することが重要である。今年度は、生物活性検査法の開発と、患者に多く見られる血清型と逆に健康者からも多く分離される血清型を対象に、上記以外の遺伝子の分布状況を検討する。

さらに、前回の調査では対象数が少ないことにより調査の感度が低いことが挙げられる。特に、*aggR* 遺伝子の分布は、調査の規模を拡大すれば有意性を予測させる結果となっている。健康者の調査には準備や設計に慎重を期する必要があることから、その前段階として患者の調査を精力的に行う。その際に、前回の調査で明らかになったことのひとつに、病原性関連遺伝子が今までの病原血清型以外から頻繁に分離されることや O 血清型別不能菌にもかなり分布していることから、できる限り O 血清型にこだわらないで、遺伝子を調査する方向で行う。

また、平成 13 年にはキムチによる O157 の全国的な流行が見られた。野菜は感染源としては 2 次的なものと考えられていたが、さまざまな食品が大腸菌感染症の原因となることが確認、または推定されている。しかし、食品衛生法では食品中の大腸菌関係について、一部の肉製品や生食用カキ以外

は行われていない。下痢起因菌の汚染状況は、O157:H7 などごく限られた血清型以外は不明であり、大腸菌の血清型や病原因子の調査が必要とされている。今年度は、集団食中毒の原因食品を調べるときの検査法により汚染状況の予備調査を行う。

B 研究方法

1. 付着性大腸菌の下痢症起因菌としての病原学的調査

a) 大腸菌の付着に関連する遺伝子、*eae*・*aggR*・*astA* 以外の遺伝子の分布状況を検討する。

イ) 標的遺伝子

現在までに報告されている病原因子として、局在性付着大腸菌では、染色体上の遺伝子として、インチミンの受容体 *tir*、分泌タンパク質で A/E 障害の最初の付着に関与することが推定されている *espA*、LEE 領域の 5'側の端にあり、この領域の多くの遺伝子の発現に関与していることが、最近明らかにされた *ler* を調べる。また、プラスミド上の遺伝子としては、A/E 障害の最初の付着に関与すると考えられていたが、現在は局在性付着型付着の特徴である微小コロニー形成に関与すると考えられている線毛 *bfpA*、及び前述の *ler* を含め病原性関連遺伝子の発現を促す *perA* を対象とする。凝集性付着大腸菌では、大人の篤志者に実験的に下痢を起こさせた 042 株のプラスミド上の毒素 *pet*、2 型凝集付着生線毛 *aafA*、及び凝集性付着大腸菌の代表株として使用されている 17-2 株のプラスミド上の 1 型凝集付着生線毛 *aggA* と、細胞内侵入性に関与する *aggB* を対象にする。

以前は下痢原性がないと考えられていた拡散型付着性大腸菌であるが、最近このカテゴリーの一部に下痢原性があることが示唆されているので、C1845 株の細胞内侵入

性に関与する *afaD* を含めた。

ロ) primer の設計

今回、標的とした遺伝子には DNA 多型が知られており、一部の遺伝子は相同性が 50%程度と低いものがある。データベースからこれらの遺伝子の配列を選び出し、CLUSTALW

(<http://clustalw.genome.ad.jp/>) で多重アラインメントを行い、相同性の高い部分を primer の位置とした。一組の primer で全塩基配列を増幅できないと思われる場合は primer を追加して、現在のデータベースに登録されているすべての配列から産物が得られるようにした。Multiplex PCR で行うために、primer の融解温度 (T_m) を 55°C にし、電気泳動で分離できるように産物の長さを考慮しながら設計した。primer 設計支援プログラムは Primer3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) を使用した。プライマーの合成はグライナー・ジャパンに依頼した。

ハ) PCR

寒天平板上に一夜培養した菌体を 100 μl の蒸留水に懸濁し、100°C で 10 分加熱したものをテンプレートとした。反応液は最終 25 μl で、0.1~0.2 μM primer 溶液、0.1mM dNTP 混液、×1 PCR 緩衝液、1.5mM MgCl₂ 溶液、0.5U Taq DNA ポリメラーゼ (プロメガ)、テンプレート 2.4 μl である。サーマルサイクラーは GeneAmp9600 システム (パーキンエルマー) を使用し、5 分間の熱変成を行い、熱変成 94°C、30 秒、アニーリング 50~55°C、1 分、伸長反応 72°C、1 分 30 秒のサイクルを 25 回繰り返し、最後に 72°C、10 分間の最終伸長反応を行った。産物は 13% ポリアクリルアミドゲル、不連続緩衝液系の電気泳動で分離し、エチジウムブロミド染色後、トランスイルミネータ

のもとで写真を撮った。Multiplex PCR では、産物の量が同じになるように primer 濃度を加減して調整した。

b) 生物活性検査法の検討：

従来から用いられている培養細胞への付着性を見る方法より、簡便で特別な器具を必要としない方法を検討する。

病原性に関する遺伝子群が外部から移って来ていることが、いろいろな菌で明らかになってきた。その中には、細菌外に病原性関連のタンパクを分泌する装置が含まれていることが多く、3 型分泌機構と呼ばれている。この装置を保持する菌は、赤血球と密着させると溶血させる活性(コンタクトヘモリシス)が見られる。赤痢菌のコンタクトヘモリシス法にならば、一部変更して行った。

1ml の液体培地に寒天平板上の菌体を接種し、30℃で一晩、静置培養した。培地を入れたチューブに、100 分の 1 量加え、指数増殖期の間まで 37℃で振盪培養または静置培養した。遠心により菌体を集め PBS に懸濁し、等量の洗浄保存赤血球を加え、遠心して密着させ 37℃で溶血を観察した。一部の腸菌が分泌するヘモリシンと区別するため、密着させないで見られる溶血を対照とした。定量する場合は、PBS で再懸濁し、遠心後上清を 540nm で吸光度を測定した。

液体培地は Antibiotic Medium No.3 (Difco)、Brain Heart Infusion broth (BBL)、DMEM (Sigma) を使用した。
2. 付着性大腸菌の下痢症起因菌としての疫学調査

患者および健常小児から大腸菌の収集：EPEC 及び凝集性付着大腸菌は小児の下痢症として知られているため検査対象に限られる。前回の調査においては、対照群として佐賀市内の保育園健常小児及び埼玉県の

全年齢構成の健康者から、また、患者群として佐賀市内の病院または愛知県内の一病院で検診を受けた散発下痢症患者から大腸菌を集めた。なお、園児、家族への調査の同意は、検体採取依頼書により確認した。

解析の精度を上げるため、さらに株の収集に努めた。

a) 調査対象

引き続き、佐賀市内の病院または愛知県内の一病院で検診を受けた散発下痢症患者から大腸菌を集めた。埼玉県では、埼玉県衛生研究所に同定依頼のあった大腸菌株を調べた。この中には、健康者由来大腸菌も含まれる。

b) 検査法

散発下痢症患者の便から、検査室で定法により分離した大腸菌株を収集した。血清型別はデンカ生研の診断用免疫血清(1号セット、2号セット)を用いた。O 抗原血清型はスライド凝集試験で行った。H 抗原血清型は試験管凝集法で行った。市販血清に凝集を示さなかった大腸菌も、なるべく次の遺伝子の検査対象とした。

遺伝子の検出は PCR 法で行った。*eae*・*aggR*・*astA* の 3 種類または *afaD* を含む 4 種類のプライマーセットを用いた Multiplex PCR で行った。反応条件や鋳型 DNA の調製法は、1. a) ハ) に従った。

c) 統計学的検討

統計処理は、1 人から複数の性状を持つ大腸菌株が検出されたことから、株数でなく人数で行った。解析方法は、N 数及び陽性出現数が少ないことを考慮して Fisher の正確な検定 (Fisher's exact test) にて行った。判定は、有意水準 5% ($P < 0.05$) で行った。

3. 大腸菌の食品汚染に関する調査

食品中における大腸菌の分布に関する調

査対象食品として、今年度は、和風キムチ等による O157:H7 の広領域発生の調査も兼ねて、漬物、特に白菜を原料とするものとした。12月の年末一斉取り締まり期間にあわせて実施した。

佐賀県内の各保健所・支所にて、一包装を単位として収去し、佐賀県衛生薬業センターで検査を行った。検査項目としては、一般生菌数、大腸菌群、腸管出血性大腸菌 O157、下痢原性大腸菌検査を行った。大腸菌群は、デスオキシコレート法による集落の計測を行った。大腸菌は糞便系大腸菌推定試験(44.5°C培養)に加え、EC培地(37°C)及び O157 免疫ビーズ法とクロモアガー O157 培地により検査し、分離株について性状検査及び血清型の検査を行って同定した。同時に、黄色ブドウ球菌(コアグラゼ陽性)・サルモネラ属菌・セレウス菌(エンテロトキシン産生型)の定性試験を行った。検査の流れと方法は図1に示した。

C 結果・考察

1. 付着性大腸菌の下痢症起因菌としての病因学的調査

a) 大腸菌の付着に関連する遺伝子の PCR

表1に今回対象とした遺伝子の説明及び存在場所を示した。遺伝子多型を示すものが多く、一例として、菌体外に露出されるタンパクで細胞付着の最初のステップに関与すると考えられている EspA の遺伝子 *espA* のマルチプルアラインメントと相同性が高い部分から選んだ primer を図2に示す。局在性付着関連遺伝子では *ler* 以外は一対の primer ではすべてを検出することは困難でさらに primer を追加した。その中には、*perA* と *bfpA* のように挿入配列等が入ってタンパクとしては短くなり機能を持っていないと推測されるものも含まれている。凝集性付着や拡散性付着関連遺伝子で

はまだ歴史が浅いせいか登録されている配列の数も多くなく、現時点では一対の primer で検出することが可能と思われる。primer のリストを表2に示した。スクリーニング用の EpAll と *eae* または *aggR* が検出された株を精査するための3種類、合計4種類の PCR で13種類の遺伝子が検査できる。PCR産物の電気泳動で分離した像を図3に示した。今年度は、佐賀市内の保育園健常小児及び佐賀市内の患者から分離された株を調べた。結果を表3に示す。O126血清型はほとんど *aggR+astA+pet+aafA* 陽性で042株と同じ遺伝子群を持っていたが、O111:H21は *aggR+astA* で既知の線毛や他の遺伝子を保持していなかった。*eae* 陽性株は、標準株と同じ遺伝子保有パターンを示すものではなく、PCRでは検出されにくく変異しているか保持していないことが示された。これらの株の下痢原性を精査する必要がある。

一方、*afaD* は426株調べたうち1株からだけ検出された、患者由来で O1:HNM であった。

b) 生物活性検査法の検討

コンタクトヘモリシス法の条件を検討した。菌体外にヘモリジンを分泌して、溶血活性を示す株が、凝集性付着大腸菌で比較的多く、対照を常におく必要がある。液体培地は、細菌培養用の Antibiotic Medium No.3 (Difco)、Brain Heart Infusion broth (BBL) はいずれもコンタクトヘモリシス活性を示した。細胞培養に使用される DMEM (Sigma) では、凝集性付着の溶血活性が強く出てコンタクトヘモリシス活性を測るには適当ではなかった。日本の分離株では、調べた件数は少ないが、O55:HNM、O128:H2、O15:H2 及び O142:H6 などが陽性となった。一方、出血性大腸菌 O157:H7 ではコンタクトヘモリシス活性が観測され

なかった。局在性付着大腸菌と出血性大腸菌は、どちらもヒトに下痢症を起こすが、腸管の病変部位は異なっているため、病原性発現の条件が異なるものと思われる。本法は簡便であるため、病原性の検索に応用できれば非常に有効であると思われる。引き続き条件の検討と分離株の検査を行う価値がある。

2. 付着性大腸菌の下痢症起因菌としての疫学調査

佐賀市内の病院では 110 名、愛知県内の一病院では 846 名の散発下痢症患者から大腸菌を集めた。埼玉県では、埼玉県衛生研究所に同定依頼のあった患者由来大腸菌 532 株及び健康者由来大腸菌 61 株を調べた。前回までの結果とあわせ解析した。なお、他のカテゴリーの大腸菌、毒素原性及び侵入性大腸菌の病原因子が検出された大腸菌は解析から除いた。また、他の下痢起因菌が分離された患者からの大腸菌も除いた。

表 4 に分離株の血清型の分布を示した。今回の調査では、Nataro と Kaper が総説に示した EPEC 血清型は、HNM 株以外はほとんど分離されなかった。分離された血清型は O128:H2, O128:H12, O86:H34 及び O126:H27 である。1950 年代より EPEC 血清型にあげられていた O55:H6 と O111:H2 や、EPEC の病原性の標準株 E2348/69 の血清型 O127:H6 は分離されなかった。わが国における血清型分布は特徴的と考えられる。

eae 陽性株の血清型分布を表 5 に示す。O26:H11 及び O157:H7 は、ほとんどがベロ毒素を保有しており出血性大腸菌であった。O55:H7 は健康者からも多く分離されていることから、O128:H2 と O55:HNM が下痢起因菌と推測される。*aggR* 陽性株では O111:H21、O86:H27、O86:HNM が患者から多く分離され、O111:HNM、

O126:HNM、O55:H10 は患者のみからの分離だが、数が少なかった。O126:H27 は患者・健康者とも多く分離された。なお、O86:H27、O86:HNM、O55:H10 は愛知県内の一病院に特徴的な株で他からはほとんどとられていないので、この地域に本菌が蔓延していたことは示されたが、残念ながら健康対象者を調査してないため病原性について推論することはできない。分離数では 1 位と 2 位の O1:H7 と O18:H7 は *astA* も含め調べた因子は陰性であった。O 抗原型別不能菌は、まだ検査数が少なかった。

O111 と O126 血清型は分離数が多いため統計的に解析した。

	O111aggR+	それ以外	総数
<1>患者	52 (2.8%)	1814 (97.2%)	1866
<2>対照	4 (0.5%)	849 (99.5%)	853
P(p1*2) = 0.00002 ***			
odds ratio: 6.084 [2.193, 16.877]			

	O126aggR+	それ以外	総数
<1>患者	58 (3.1%)	1808 (96.9%)	1866
<2>対照	18 (2.4%)	735 (97.6%)	753
P(p1*2) = 0.39030			
odds ratio: 1.310 [0.767, 2.238]			

O111 は有意差が見られ、下痢起因菌と思われる。*eae* 陽性株については全体では有意差は見られなかった。各血清型の比較は、例数が少ないため出来なかったが、今後さらに検体数を増やし調査する必要があるとされた。

3. 漬物の大腸菌汚染に関する調査

a) 材料

材料は、平成 13 年 12 月 10 日から 19 日にかけて各保健所から収去された佐賀県内産漬物 54 件であり、内訳は白菜 34、高

菜 12、大根・かぶ 4、その他 4 件であった。

b) 一般的な微生物汚染状況 (生菌数及び大腸菌群数)

漬物に関する衛生規範では、一夜漬 (浅漬) 等について大腸菌陰性となっているが、他の種類では、細菌数並びに大腸菌群に関する規範は設けられていない。

図 4. に漬物の種類に関わらない全体的な汚染状況を示す。細菌数では $10^3 \sim 10^9$ で、 $10^5 \sim 10^6$ が半数を占めた。大腸菌群数は未検出 $\sim 10^6$ で、大半は 10^2 以下の比較的少ない検出量であったが 10^5 以上の菌量を認めた検体もみられた。

白菜では、衛生上問題と思われる $10^6/g$ 以上の菌量を認めたものが 47.5% と、半数近くにのぼり、 10^8 以上の菌量が 4 検体 (11.7%) に認められた。

大腸菌群数については、漬物の種類を問わず細菌数の 3 オーダー低い菌量である、検出せず $\sim 10^6/g$ の範囲で、ほぼ細菌数と同じ分布を示した (図 5)。しかし、白菜では 3 例に検出菌の大半が大腸菌群であるものが認められた。

c) 大腸菌及びその他の食中毒菌の検出状況

下痢原性大腸菌検索のため、各種方法により大腸菌の検出を試みた結果を示す。 44.5°C 培養検査では大腸菌はすべて陰性であった。各種方法による大腸菌の検出結果を図 4 に示した。図のとおり、図 6 に示すように大根で半数に大腸菌が検出されたが、全体としては、22.2% の検出であった。糞便系大腸菌 (衛生規範該当項目: 公定法による 44.5°C 培養検査)、腸管出血性大腸菌 O157、下痢原性大腸菌は検出されなかった。公定法ではすべて陰性であったが、下痢原性大腸菌検索のための方法で大腸菌が多数検出された。今回の調査では下痢原性

大腸菌は検出されなかったが、非病原性大腸菌と生物学的性状がほとんど同じであることを考慮すると、汚染が起きる可能性は高い。しかし、食品衛生法の検査ではこれらを見落とすこととなる。堺市における O157:H7 の流行を例として、野菜が感染源と推測される事例が増えつつあり検査法の見直し、または野菜等の病原菌を対象とした監視体制の整備が必要とされるかもしれない。

サルモネラ菌は検出されなかった。

その他の漬物 4 件中 3 件 (小松菜 2、野沢菜 1)、高菜 1 2 件中 3 件、白菜 3 4 件中 2 件より、エンテロトキシン産生型のセレウス菌が検出された。セレウス菌はかつて生物農薬として使用が検討された時期があるが、その菌によるものは精査できなかった。エンテロトキシン型セレウス菌は病原性がまだ確立したとは言えず、また、わが国でのセレウス菌食中毒が圧倒的に嘔吐毒型にもかかわらず、エンテロトキシン型がこれほど検出されていることから考えるとそれを裏付ける格好となった。

高菜 1 例よりコアグラゼ陽性黄色ブドウ球菌が検出された。当該漬物は、細菌数 $8.7 \times 10^4/g$ 及び大腸菌群 $9.1 \times 10^2/g$ で、一般的汚染状況に特記すべき点はみられなかったものの、直接塗抹法では 10 数個の黄色ブドウ球菌が検出され、塗抹量から推定すると、 $10^3/g$ 程度と推察された。

D 結論

1. 付着性大腸菌の下痢症起因菌としての病原学的調査

局在性付着大腸菌の病原関連遺伝子 *tir*、*espA*、*ler*、*bfpA*、*perA*、凝集性付着大腸菌の病原関連遺伝子 *pet*、*aafA*、*aggA*、*aggB*、及び拡散型付着性大腸菌の病原関連遺伝子 *afaD* を追加し、スクリーニング用の EpAll

と *eae* または *aggR* が検出された株を精査するための3種類、合計4種類の Multiplex PCR で13種類の遺伝子が検査できるようになった。

生物活性の測定法としては従来の培養細胞と機器を用いる方法より簡便で、結果がすぐ得られるコンタクトヘモリシス法を検討し、標準株のみではなく、日本の分離株でも活性を測定できた。しかし、出血性大腸菌では測定できなかった。検査条件をさらに検討する必要がある。本法は簡便であるため、病原性の検索に非常に有効であると思われる。引き続き条件の検討と分離株の検査を行う価値がある

2. 付着性大腸菌の下痢症起因菌としての疫学調査

疫学的に局在性または凝集性付着大腸菌の下痢原性を調べるには患者だけではなく、対照群と比較して有意性を検討することが必要である。しかし、調査には多くの労力と周到な計画が必須である。その前段階として、検査項目の検討を行った。佐賀市内の病院では110名、愛知県内の一病院では846名の散発下痢症患者から大腸菌を集めた。埼玉県では、埼玉県衛生研究所に同定依頼のあった患者由来大腸菌532株及び健康者由来大腸菌61株を調べた。対照としては前回に収集した、佐賀市内の保育園健常小児及び埼玉県の全年齢構成の健康者由来大腸菌を用いた。

日本における付着性関連遺伝子陽性大腸菌の血清型は、実際的に国際標準となっている Nataro と Kaper が総説で示した血清型とは大きく異なっていた。患者と対象者における分布や付着性関連遺伝子の保持状況から、*eae* 陽性株では O128:H2 が、*aggR* 陽性株では O111:H21 が下痢起因菌と推測された。Fisher の正確な検定 (Fisher's exact test) を

用い、有意水準5% ($P < 0.05$) で判定を行った結果、*aggR* 陽性の O111 は有意差が見られ、下痢起因菌と思われた。*eae* 陽性株については全体では有意差は見られなかった。血清型間の比較にはさらに多くの調査数が必要である。また、分離数では1位と2位の O1:H7 と O18:H7 は *astA* も含め調べた因子は陰性であり、血清型の見直しが必要と思われた。

3. 付着性大腸菌の食品汚染に関する調査
平成13年にキムチによる O157 の全国的な流行が見られたこともあり、漬物を例として、通常食品検査法と集団食中毒の原因食品を調べるときの検査法を比較し、現在の汚染状況の予備調査及び検査法の検討を行った。材料は白菜・高菜・大根・かぶ等であった。一般細菌の汚染状況は、細菌数では $10^3 \sim 10^9$ で、 $10^5 \sim 10^6$ が半数を占めた。大腸菌群数は未検出 $\sim 10^6$ で、大半は 10^2 以下の比較的少ない検出量であったが 10^5 以上の極めて多数の菌量を認めた検体もみられた。公定法では大腸菌は検出されなかったが、下痢原性大腸菌検索のため、公定法以外の各種方法により大腸菌の検出を試みたところ、全体として22.2%から検出された。下痢原性大腸菌は検出されなかったが、汚染が起きる可能性は高い。しかし、通常検査ではこれらを見落とすこととなる。検査法の見直し、または野菜等の病原菌を対象とした監視体制の整備が必要とされるかもしれない。

E. 発表業績

1) 隈元星子、森屋一雄、諸石早苗、伊藤健一郎：散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌関連遺伝子の保有状況について (第2報)。第76回日本感染症学会総会。東京。2002.4.

- 2) 尾関由姫恵、倉園貴至、斉藤章暢、岸本剛、山口正則：埼玉県内の腸管出血性大腸菌検出状況(2001)第76回日本感染症学会総会。東京。2002.4.
- 3) Hirose K., Ito K., et al: Selective amplification of *tyv(rfbE)*, *prt(rfbS)*, *viaB* and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovar Typhi, and Paratyphi A. J. Clin. Microbiol. 2002, 40(2):633-636.
- 4) 伊藤健一郎、松崎充宏：腸管出血性大腸菌0157の迅速検査法とその成績の取り扱い。日本臨床。2002、印刷中。
- 5) 伊藤健一郎：病原性大腸菌。食品衛生学雑誌。2001, 42;J-343.
- 6) 増本貴美子、森屋一雄、隈元星子、下平裕之：保育園における腸管出血性大腸菌O26の集団感染—佐賀県。病原微生物検出情報。2002、23(1):15-16.
- 7) 増本貴美子、森屋一雄、隈元星子、下平裕之：中国旅行者に発生した毒素原性大腸菌による集団下痢症—佐賀県。病原微生物検出情報。2002、23(1):17.
- 8) Ogata K., Kato R., Ito K. and Yamada S.: Prevalence of *Escherichia coli* possessing the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) or the *aggR* gene of enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) in traveler's diarrhea diagnosed in those returning to Tama, Tokyo from other Asian countries. Jpn. J. Infect. Dis. 2002, 55(1):14-18.

表 1. 本研究で対象とした遺伝子と由来

対象の病原性関連遺伝子				Multiplex-PCR
EAggEC	17-2 株(血清型 03:H2)	60Mda	プラスミド	
<i>aggA</i>	AAF/I fimbriae subunit		aggregative adherence fimbriae I	AggAll
<i>aggB</i>	invasin			AggAll
<i>aggR</i>	regulator			EpAll
<i>astA</i>	toxin			EpAll
EAggEC	042 株 (血清型 044:H18)	プラスミド	pAA	
<i>aafA</i>	AAF/II fimbriae subunit		aggregative adherence fimbriae II	AggAll
<i>pet</i>	toxin			AggAll
LA	E2348/69 株(血清型 0127:H6)	染色体		
<i>eae</i>	intimin		an outer membrane protein	EpAll
<i>espA</i>	EspA		secreted proteins	eae_bel
<i>tir</i>	Tir		the translocated intimin receptor	eae_tip
<i>ler</i>	LEE-encoded regulator		originally termed <i>orfI</i>	eae_bel
LA	E2348/69 株(血清型 0127:H6)	EAF	プラスミド	
<i>per</i>	plasmid-encoded regulator			eae_tip
<i>bfpA</i>	bundlin		type IV bundle-forming pili	eae_bel
DA	C1845 株(血清型 0127:H6)	EAF	プラスミド	
<i>afaD</i>	invasin			EpAll

表 2. 本研究で使したプライマー

primer	位置	5' - 配列 - 3'	長さ	T _m	産物長	
EPEC (LA)						
<i>eae</i>	<i>eaek1</i>	66-85	GCTTAGTGCTGGTTAGGAT	20	53.83	591bp
	EA-2 ¹⁾	656-637	CTCTGCAGATTAACCTCTGC	20	55.28	
<i>perA</i>	<i>perAks</i>	553-572	GGCGATGTCAGTAGTCAAT	20	55.23	354bp
	<i>perAkas</i>	728-709	GAATTAACCAACCAACA	20	55.07	
	<i>perAtrkas</i>	726-707	GAATTAACCAACCAAGCA	20	55.39	
<i>tir</i>	<i>tir3kcoms</i>	1123-1138	GSTGGGGGAATTGGTG	16	58.23	240bp
	<i>tir3kRDECs</i>	1123-1138	GGCGGGGAATTGGTG	16		
	<i>tir3kas</i>	1542-1522	CAGAAGCGCATAAGTRCTTTG	21	55.58	
<i>bfpA</i>	<i>bfpks</i>	154-173	GAAGTAATGAGCGCAACGTC	20	58.53	
	<i>bfpAkcomas2</i>	401-382	GTTGCAAGACTAACACATGC	20	54.29	248bp
	<i>bfpA_IS66kas</i>	287-267	AATACGGTCTTGCTGCACGC	21	64.63	133bp
<i>espA</i>	<i>espAks1m</i>	151-172	TATATGTAYCAGGCACAAAGCG	22		
	<i>espA119kas</i>	526-507	GCATATCTGAACGAGCATTT	20	55.49	376bp
	<i>espAcomkas</i>	500-480	AACGTATTTGACATTTGCTGT	21	54.93	350bp
<i>ler</i>	<i>lerks2</i>	148-174	AAGCAGATTACTTATTACAATATAACC	27	53.37	205bp
	<i>lerkas1</i>	352-330	CCTTCACAAGAAAATCTCTTTC	23	56.41	
EAggEC						
<i>aggR</i>	<i>aggRks1</i>	100-120	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	21	51.05	245bp
	<i>aggRkas2</i>	353-334	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	20	58.99	
<i>astA</i>	EASTOS1	3-23	GCCATCAACACAGTATATCCG	21	57.98	109bp
	EASTOAS2	111-92	CGCGAGTGACGGCTTTGTAG	20	64.24	
<i>aafA</i>	<i>aafAks2</i>	71-92	TAGCAAAAAGTGCACAGTAC	22	59.47	380bp
	<i>aafAkas2</i>	450-429	TTCATATAGGCTGGTCGTAGC	22	60.48	
<i>aggA</i>	<i>aggA-OS2²⁾</i>	44-65	CTTTGGGTTAGTTAGTCTTCT	22	52.2	254bp
	<i>aggA-OAS3²⁾</i>	297-276	CCACTTATTAGCGGCACCTGTT	22	63.5	
<i>pet</i>	<i>pets</i>	280-299	TTTCCAGCACTTCTGTTC	20	60.23	297bp
	<i>petas</i>	576-557	ATTTCCAACGTCTACGCCAT	20	59.46	
<i>aggB</i>	<i>aggBOS5²⁾</i>	3477-3496	TGCGGTGTAAGTGTGATGGT	20	60.03	249bp
	<i>aggBOAS5²⁾</i>	3725-3706	CCCACCCCTATTTTGA	20	60.05	
DAEC						
<i>afaD</i>	<i>afaDks1</i>	7-28	GGGAGTATAAGGAAGATGATGC	22	56.84	267bp
	<i>afaDkas2</i>	273-256	CCTGACACGAAGCTCATG	18	56.16	

表3. *aggR*及び*eae*陽性株における他の病原関連遺伝子の分布





Strain No.	O	H	<i>aggA</i>	<i>aggB</i>	<i>pet</i>	<i>aafA</i>	
<i>aggR</i> 陽性株							
EC108	78	UT	+	+	-	-	
EC30	86a	27	-	-	-	-	
EC25	111	7	-	-	-	-	
EC165	111	9	-	-	-	-	
EC28	111	21	-	-	-	-	
EC55	111	21	-	-	-	-	
EC57	111	21	-	-	-	-	
EC342	111	21	-	-	-	-	
EC440	111	21	-	-	-	-	
EC530	111	NM	-	-	-	-	
EC542	111	NM	-	-	-	-	
EC552	111	NM	-	-	-	-	
EC335	111	UT	-	-	-	-	
EC339	111	UT	-	-	-	-	
EC213	125	7	-	-	-	-	
15-1"	126	27	-	-	+	+	
27-1"	126	27	-	-	+	+	
33-1"	126	27	-	-	+	+	
74-1"	126	27	-	-	+	+	
298-1"	126	27	-	-	+	+	
EC94	126	27	-	-	+	+	
EC190	126	27	-	-	+	+	
EC526	126	27	-	-	+	+	
EC529	126	27	-	-	+	+	
EC369	126	UT	-	-	-	-	
EC371	126	UT	-	-	-	-	
EC540	126	UT	-	-	+	+	
EC541	126	UT	-	-	+	+	
EC491	UT	UT	-	-	-	-	
			<i>ler</i>	<i>bfpA</i>	<i>espA</i>	<i>perA</i>	<i>tir</i>
<i>eae</i> 陽性株							
EC169	1	9	+	-	+	-	+
EC467	18	2	+	-	+	-	+
EC319	20	NT	+	-	+	-	+
EC562	26	NM	+	-	+	-	+
242-1"	55	7	+	-	-	-	+
EC173	55	7	+	-	-	-	+
EC197	55	7	+	-	-	-	+
EC83	55	7	+	-	-	-	+
EC573	55	UT	+	-	-	-	+
EC343	63	6	+	-	+	-	+
EC124	63	7	+	-	+	-	+
75-1"	86a	UT	+	+	+	-	+
EC96	114	12	+	-	+	-	+
EC488	119	UT	+	-	+	+	+
EC214	125	UT	+	-	+	-	+
EC12	128	2	+	-	+	-	+
EC323	128	2	+	-	+	-	+
EC333	142	UT	+	-	-	-	+
124-1"	153	7	+	-	+	-	+
135-1"	153	7	+	-	+	-	+
278-1"	153	7	+	-	+	-	+
86-1"	153	7	+	-	+	-	+
EC159	153	7	+	-	+	-	+
EC527	167	UT	+	-	+	-	+
EC340	UT	21	+	-	+	-	+

*: *espA*O119

表4. 患者及び健康者由来大腸菌の主な血清型分布

データの個数		H																	総計				
○	H/P	2	4	6	7	9	10	11	12	16	18	19	20	21	27	28	34	41		42	45	NM	UT
1	Healthy		4	10	102				20		1	2		1			2		2	1	16	30	191
	Patient		1	15	178				2	13		4	8				2		7	2	90	102	424
1 合計			5	25	280				22	13	5	10	1			4		9	3	106	132	615	
6	Healthy						3		16												15	16	50
	Patient		1	2	1		3	1	40	4		5							1		49	115	225
6 合計			1	2	1		6	1	56	4		5							1		64	131	275
8	Healthy			2	5		1							1							1	1	11
	Patient		2	1		1	5	3		2			1	2								1	18
8 合計			2	1	2	6	5	4		2			1	3							1	2	29
15	Healthy												2								1	2	6
	Patient		2		1		1		3				2	1							1	10	26
15 合計			2		1		1		3				4	1							2	12	32
18	Healthy			7	1	65			4				1								7	11	96
	Patient		1	8	1	162			5						1						12	42	233
18 合計			1	15	2	227			9						1						19	53	329
20	Healthy			4	1														1		2	3	11
	Patient			1				2	1									4				5	13
20 合計				4	2			2	1									5			2	8	24
25	Healthy						1						1								3	1	5
	Patient			12	1			3	4				1							1	20	19	61
25 合計				12	1			4	4				1							1	23	20	66
26	Healthy				2									1								3	7
	Patient						1						3			1			2			10	43
26 合計					2			1					3			1			2			13	50
28	Healthy								1					1								3	5
	Patient				2				1							1					2	5	11
28 合計					2				1							1					2	8	16
44	Healthy																					1	2
	Patient																		2			1	8
44 合計																			2			1	10
55	Healthy								1													1	9
	Patient							8	1													9	41
55 合計								8	2													9	50
63	Healthy			2	8																	1	11
	Patient		1		11	1																2	15
63 合計			1	2	19	1																2	26
78	Healthy								1													2	3
	Patient						4															2	6
78 合計							4		1													4	9
111	Healthy																					1	4
	Patient			2	1																	9	13
111 合計				2	1																	9	14
112	Healthy									2			1									1	5
	Patient																					2	8
112 合計										2			1									3	13
114	Healthy			2	2																	1	5
	Patient			2	1	3	1	1	1			3		1								3	4
114 合計				4	1	5	1	1	1			3		1								3	5
119	Healthy		4	3										1	1							1	10
	Patient		2	4										1								8	3
119 合計			6	7										2	1							9	4
125	Healthy																					1	2
	Patient																					1	2
125 合計																						1	2
126	Healthy				1	1				1			2	3	19							2	30
	Patient						1	1		1			2	7	44					1		9	18
126 合計					1	1	1	1		2			2	7	63					1		10	20
127	Healthy													7								2	9
	Patient																					2	9
127 合計																						2	9
128	Healthy								8									1				6	18
	Patient								11	1		1						1				13	43
128 合計									19	1		1						2				19	61
142	Healthy																					3	3
	Patient																					3	3
142 合計																						6	6

143	Healthy	1																1	2	
	Patient	4																2	6	
143	合計	4																3	6	
146	Healthy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	8
	Patient	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	14	28
146	合計	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	18	36
148	Healthy	1																2	3	
	Patient	1																3	2	
148	合計	1																5	5	
151	Patient	1																2	2	
151	合計	1																2	2	
152	Healthy	1																2	3	
	Patient	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	9
152	合計	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	12
153	Healthy	4	3	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	22
	Patient	6	13	3	2	7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	25	60
153	合計	6	17	6	6	7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	34	82
157	Healthy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	7
	Patient	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	35
157	合計	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	42
158	Healthy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Patient	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
158	合計	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
159	Healthy	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	6
	Patient	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	13
159	合計	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	19
164	Healthy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	6
	Patient	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
164	合計	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	8
166	Healthy	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	14	12
	Patient	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	46
166	合計	3	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	14	58
169	Healthy	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3
	Patient	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	14
169	合計	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	17
86a	Healthy	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	5
	Patient	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100	10
86a	合計	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	106	15
UT	Healthy	1	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	14	1
	Patient	1	7	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	14	21
UT	合計	1	8	7	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	14	22
総計		32	69	83	600	17	31	21	148	10	35	35	22	70	103	19	20	8	19	9
																			440	672
																				2463

 厚生科学研究費小林班のEPEC血清型
 Nataro & Kaperの総説におけるEPEC血清型
 Nataro & Kaperの総説におけるEHEC血清型
 Nataro & Kaperの総説におけるEAaggEC血清型

健康者検体数: 903株
患者検体数: 2066株

表5. eae陽性大腸菌の主な血清型分布

データの個数		eae H														+ 合計	総計
		+															
O	H/P	2	6	7	11	12	16	19	21	28	34	42	45	NM	UT		
15	Patient	2															2
15	合計	2															2
18	Patient	1															1
18	合計	1															1
20	Healthy		1											2	2		5
	Patient		1												2		3
20	合計		2											2	4		8
25	Patient														1		1
25	合計														1		1
26	Healthy		1						1								2
	Patient				11									14	1		26
26	合計		1		11				1					14	1		28
28	Healthy						1										1
	Patient									1							1
28	合計						1			1							2
55	Healthy			8													8
	Patient			16										8	4		28
55	合計			24										8	4		36
63	Healthy		7											1			8
	Patient		11	1											1		13
63	合計		18	1										1	1		21
111	Patient														1		1
111	合計														1		1
114	Patient					1											1
114	合計					1											1
119	Healthy		4														4
	Patient		2						1						2		5
119	合計		6						1						2		9
125	Patient														1		1
125	合計														1		1
126	Healthy		1														1
126	合計		1														1
128	Healthy		2														2
	Patient		14											1	6		21
128	合計		16											1	6		23
142	Healthy														1		1
142	合計														1		1
153	Healthy			4												1	5
	Patient			9				2	3							5	19
153	合計			13				2	3						6	24	24
157	Healthy			1											2		3
	Patient			21					1				2	5	3	32	32
157	合計			22					1				2	5	5	35	35
158	Patient			1													1
158	合計			1													1
159	Healthy			1													1
	Patient		1									1					2
159	合計		1	1								1					3
164	Patient												1				1
164	合計												1				1
169	Patient									1							1
169	合計									1							1
86a	Healthy														2		2
86a	合計														2		2
UT	Healthy		1							1							2
	Patient						1							4	1		6
UT	合計		1				1			1				4	1		8
総計		25	24	62	11	2	1	2	6	1	2	1	3	37	34	211	211

eae陽性健康者検体数(健康者全体): 59株(903株)
eae患者検体数(患者全体): 197株(2066株)

表6. *aggR*陽性大腸菌の主な血清型分布

データの個数		aggR H											+ 合計	総計			
O	H/P	2	7	9	10	12	18	19	21	27	NM	UT					
6	Patient					1										1	1
6	合計					1										1	1
15	Patient						1									1	1
15	合計						1									1	1
25	Patient											1				1	1
25	合計											1				1	1
28	Healthy											1				1	1
28	合計											1				1	1
44	Patient							1					1			2	2
44	合計							1					1			2	2
55	Patient				8											8	8
55	合計				8											8	8
78	Healthy												1			1	1
78	Patient												1			1	1
78	合計												2			2	2
111	Healthy									3			1			4	4
111	Patient		1							35		5	11			52	52
111	合計		1							38		5	12			56	56
114	Patient				1											1	1
114	合計				1											1	1
126	Healthy					1					17					18	18
126	Patient							2			37	7	12			58	58
126	合計					1		2			54	7	12			76	76
127	Patient									7			1			8	8
127	合計									7			1			8	8
128	Patient						2									2	2
128	合計						2									2	2
153	Patient												1			1	1
153	合計												1			1	1
159	Healthy												1			1	1
159	合計												1			1	1
86a	Healthy									3	5					8	8
86a	Patient	1		1						29	96	2				129	129
86a	合計	1		1						32	101	2				137	137
UT	Patient												1	1		2	2
UT	合計												1	1		2	2
総計		1	1	1	9	4	2	2	45	86	115	34				300	300

*aggR*陽性健康者検体数(健康者全体): 37株(903株)
*aggR*患者検体数(患者全体): 270株(2066株)

図1. 漬け物の大腸菌汚染実態調査検査法

検査方法

