

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

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
分担研究項目：イムノクロマトグラフィー法による
ノロウイルス迅速診断法の開発と評価

分担研究者 牛島 廣治 東京大学大学院医学系研究科発達医科学 教授
研究協力者 大亀 路生 東京大学院・医・発達医科学
沖津 祥子 東京大学院・医・発達医科学
西尾 治 国立感染症研究所

研究要旨

抗原抗体反応を用いたノロウイルスの診断法として、イムノクロマトグラフィー（IC）法を開発した。NV1207 株（GⅡ/1 クラスター）を用いて recombinant キャプシド蛋白を作製し、これを抗原とするポリクローナルウサギ抗体を作製使用した。臨床材料 94 検体に対し、同じ抗体を用いた ELISA 法および RT-PCR 法と比較し、さらに遺伝子解析を行った。NV1207 株と同じ GⅡ/1 クラスターに属する検体は 40 検体あった。IC 法と RT-PCR 法を比較すると、GⅡ/1 クラスター検出の感度は 82.5%、特異度は 98.2%となり、この IC 法は GⅡ/1 クラスターに特異的で、RT-PCR 法にも劣らぬ検査法であることがわかった。GⅡ/1 クラスターに属する株は過去の遺伝子解析の結果より臨床的に現在一番多いと言われ、このクラスター特異的な IC 法は臨床応用が可能であることを示した。一方、IC 法と ELISA 法の一致率は 86.2%であった。IC 法は ELISA に比べて速く結果を出すことができ、かつ特殊な機器を必要とせずに判定できるので、有用な迅速診断法であると言え、病院施設や食品の検査へ応用できると考えられる。

A. 研究目的

ノロウイルス（ノーウォーク関連ウイルス：NV）は、小児の下痢症ウイルスの主要な原因ウイルスの一つであるとともに、ウイルス性食中毒の最大の原因ウイルスである。しかし、その診断法としては現在まで RT-PCR が主たる方法で、血清学的診断法はまだ確立されていない。そこで今回は迅速診断法として最近注目されているイムノクロマトグラフィー（IC）法による NV 診断法の確立を目的とし、RT-PCR、ELISA との比較を行った。

B. 研究材料と方法

IC 法：1998 年大阪で得られた

NV1207 株（GⅡ/1 クラスター）から recombinant キャプシド蛋白を作製し、SDS-PAGE によりキャプシド蛋白を精製してウサギに免疫するための抗原とした。ウサギ血清から IgG を精製して IC 法の着色 latex 固定化抗体および試験片の判定用抗体として使用した。

糞便：2000 年 7 月から 2001 年 6 月の一年間に日本 5 ヶ所（札幌、東京、舞鶴、大阪、佐賀）の病院に訪れた下痢症患者の便 622 検体のうち、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、サポウイルス陰性の 94 検体を用いた。糞便は使用まで -30℃ で冷凍保存した。糞便は PBS で 10% に溶かした

後、5分間攪拌し、10,000×gで10分間遠心後、上清を用いた。

ELISA：カプシド蛋白を免疫したモルモット IgG および IC 法で用いたウサギ IgG を使用したサンドイッチ ELISA を確立し、便検体を測定した。

RT-PCR：便上清より QIAamp viral RNA 抽出 kit を用いてウイルス RNA を抽出し、cDNA を作製した。PCR 用の COG2F (5'-CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG-3') と G2SKR(5'- CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3') の primer pair を用いた。さらにいくつかの検体にたいしては G2F3(5'-TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG A-3') と G2R1(5'-TGC ATA ACC ATT RTA CAT TCT-3') の primer pair を用いて再度 PCR を行った。

Sequence：PCR で NV 陽性の検体は ABI PRISM BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit を用いて反応させ、ABI PRISM™ 310NT Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で配列決定を行った。

系統樹解析：Clustal W でアライメントした後、サポウイルス (Sapovirus) の Manchester (MC) 株をアウトグループとしてルートを決め、近隣結合法 (NJ 法) の分子系統樹を描いた。

C. 研究結果

1.IC 法と RT-PCR 法 (表 1)

患者便検体 94 のうち RT-PCR で陽性検体 64 と陰性検体 30 で IC 法を検討した。

表 1

	RT-PCR		
	+	-	total
+	31	3	34
IC -	33	27	60
Total	64	30	94

IC の感度は 31/64 (48.4%)、で特異度は

27/30 (90.0%)であった。RT-PCR(-)で IC(+)の3検体のうち1検体は ELISA(+)であった。この検体および他の2検体のうち1検体はスクリーニングで用いた primer とは別の primer で PCR を行ったところ陽性となった。

2.IC 法と ELISA (表 2)

同じ検体で ELISA と IC 法の比較を行った。IC と ELISA の一致率は 81/94(86.2%)であった。

表 2

	ELISA		
	+	-	total
+	28	6	34
IC -	7	53	60
Total	35	59	94

3.系統樹

PCR 陽性となった検体の cDNA の配列決定を行い、系統樹を作製した (図)。

4.遺伝子解析 (GII/1 クラスタ) と IC 法の比較

表 3

	RT-PCR		
	GII/1	GII/1 以外	total
+	33	1	34
IC -	7	53	60
Total	40	54	94

GII/1 クラスタに属する 40 検体での IC の感度は 33/40 (82.5%)で特異度は 53/54 (98.2%)であった。

D. 考察

RT-PCR 法と比較した感度と特異度において IC は ELISA と差がほとんど見られず、また、IC と ELISA を比較してその一致率は 86.2%と高い結果になった。検体を処理してから判定までに ELISA では最短でも 3 時間かかるが、IC では 30 分以内にできること、特殊な機械を必要とせず肉眼で判定できることを考慮にいと現在汎用されている ELISA に代

わる新しい診断法として応用できると考えられる。遺伝子解析の結果より、IC法とELISAで陽性と診断された検体のほとんどすべてがGII/1クラスターに分類され、今回 recombinant カプシド蛋白を用いて作製した抗体がGII/1クラスターに特異的に反応することが判明した。これより全検体をRT-PCR法と比較した結果IC法の感度は48.8%であったが、GII/1クラスターの検出に対してその感度は82.5%、特異度は98.2%と非常に高いことがわかった。世界的にNVはGII特にGII/1が流行していることを考えるとGII/1特異的なIC法は臨床応用が可能と考えられる。

E. まとめ

IC法はELISAに勝るとも劣らぬ迅速診断法であること、今回開発したIC法は臨床検体のGII/1クラスターに対して感度も特異度も高く、今後NVの主要な迅速診断法として応用できると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1.Yagyu F, Ikeda Y, Ariyoshi K, Sugiura W, Wongkhomthong SA, Masuda M. Differentiation of subtypes B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction using novel env primers. *J. Virol. Methods.* 2002, 101:11-20.

2.Adhikary AK, Numaga J, Kaburaki T, Kawashima H, Araie M, Ikeda Y, Ogino T, Suzuki E, Ushijima H, Mukoyama A, Matsuno S, Inada T, Okabe N.

Genetic characterization of adenovirus type 8 isolated in Hiroshima city over a 15 year period. *J. Clin. Pathol.* 2003 56:120-5.

3.Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H.

Epidemiological features of rotavirus

infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Ming City, Vietnam. *J Med. Virol.* 2003, 69:588-94.

2. 学会発表

1.Ushijima H, Zhou Y, Okitsu S, Zhu L, Ishihara K, Nishio O.

Molecular epidemiological study of diarrheal viruses in Japan from 1996-2000 and gene analysis of rotavirus serotype G9.

4th China-Japan International Congress of Virology (Kun Ming, China, 26-28, Jun, 2002)

2.Ushijima H, Li L, Lan DTP, Okitsu S, Nishio O, Seo, JK, Sim JG.

Molecular epidemiology of adenovirus among children with diarrhea in Japan, Vietnam, and Korea.

36th Joint Meeting Conference on Viral Disease (Matsumoto, 16-18, Aug, 2002)

3.Yagyu F., Okitsu S., Wongknomthong S, Ushijima, H.

Differentiation of subtypes A, B, C, E, F and G of HIV by PCR with novel env gene primers. 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Disease (Pattaya, Thailand, 10-13, Nov, 2002)

4.Doan TPL, Okitsu S, Nishio O, Pham TD, Nguyen HD, Ushijima H.

Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Disease (Pattaya, Thailand, 10-13, Nov. 2002)

5.Ushijima H, Zhou, Y, Okitsu S, Zhu L, Nishio, O.

Molecular epidemiology of rotaviruses, especially G9, in Japan(1999-2000). 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Disease (Pattaya, Thailand, 10-13, Nov, 2002)

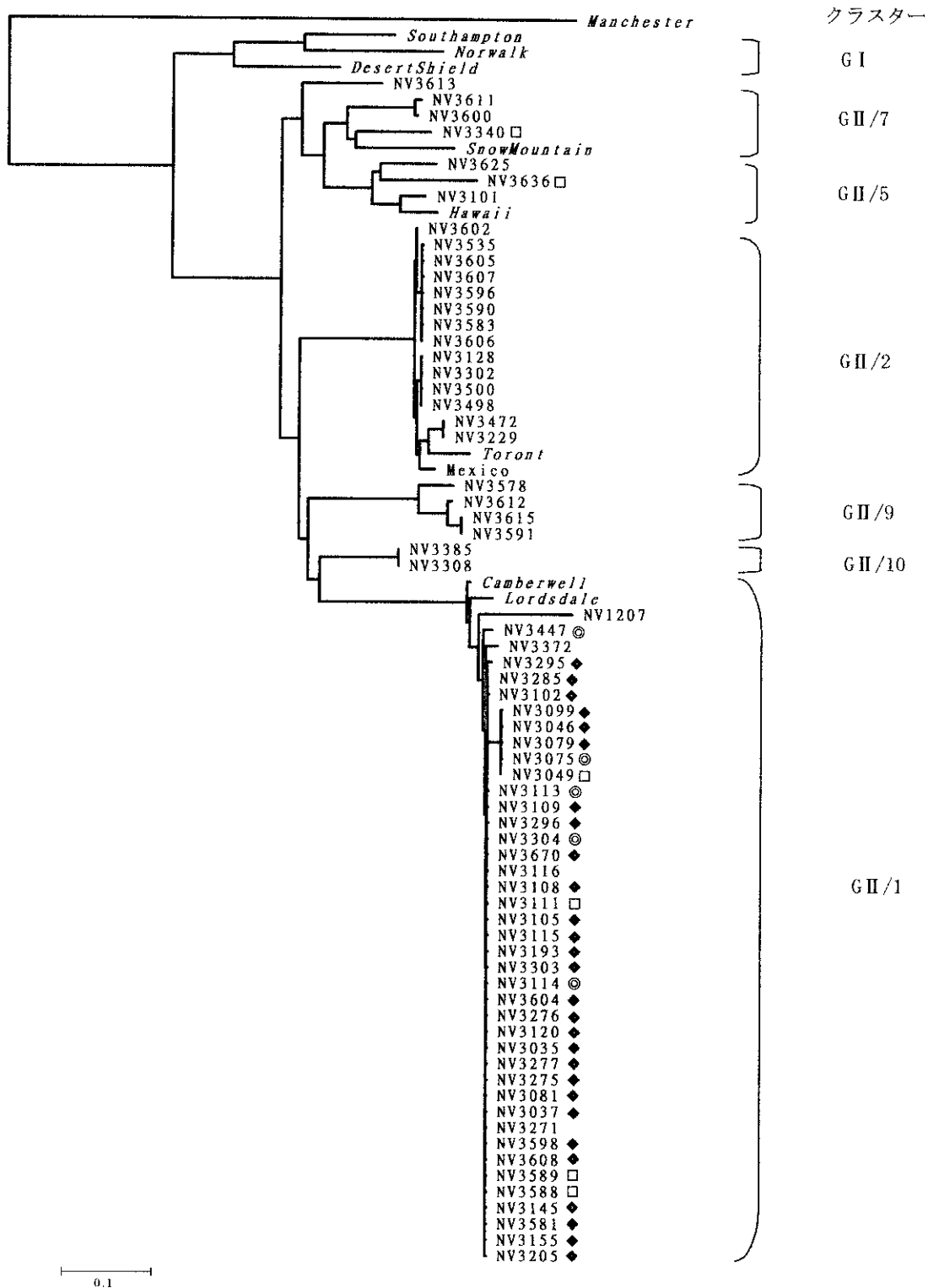


図1 RT-PCR法 (+) 検体の分子系統樹

- ◆ : IC法 (+) ELISA法 (+)
- ⊙ : IC法 (+) ELISA法 (-)
- : IC法 (-) ELISA法 (+)
- 無印 : IC法 (-) ELISA法 (-)

厚生科学研究費補助分（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

食品汚染と危機管理、対応

分担研究者 鈴木 宏 新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際感染医学講座公衆衛生学分野
共同研究者 坂井 胤、斎藤玲子 新潟大学医学部公衆衛生学
西川 眞、篠川 且 新潟県保健環境科学研究所ウイルス科
山下和予、岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター

研究要旨

本邦では食中毒の病原としてSRSVがそのトップになり、新潟県でも年々患者数が増加し、平成15年度は既に患者数は300を超えるほどと過去最大となり、重要性が増してきた。

1999-2001年における集団急性胃腸炎事例と小児の散発性急性胃腸炎について地図情報システム（geographic information system,GIS）を用い検討し、分子疫学的には両疾患の関連性が強く示唆されたが、ウイルスのGIとGII別にした空間的解析においては関連性は示されなかった。この原因として小児の散発性急性胃腸炎報告が特定の地域に偏っていることが考えられた。

SRSV関連の発生状況調査法、特に集団急性胃腸炎発生において、食中毒に区分されない事例が多数存在によりSRSVの全容が不明のまま本疾患の把握方法の改善が必須であることが明確になった。

過去20年間のSRSV感染症とロタウイルス感染症についてその変遷を検討し、SRSV感染症のピークは12月と1月と変化は見られていないが、ロタウイルス感染症のピークは、これまでの1、2月から90年代中間から2、3月と約1ヶ月間遅延傾向が見られた。地球の温暖化による可能性が示唆されたが、更なる検討が必要と思われた。

A 研究目的

昨年度は食品汚染ではないがウイルス性で糞口感染である類似性に注目し、無菌性髄膜炎流行時の県内2地域における患者発生状況の疫学解析を地図情報システム（geographic information system,GIS）を用いて行い有用性を示唆した。本年度は、食中毒中のNV感染症の頻度と、昨年度行ったNVの分子疫学的分析について、GISに展開し解析を試みた。また、1982年から2002年の20年間の本邦におけるSRSV感染症とロタウイルス感染症の変遷を検討

した。

B 研究方法

1. GISによるのNV感染症の疫学的分析

新潟県における食中毒発生状況をサーベイランスと県への届け出でから検討した。また、昨年までNVによる集団急性胃腸炎事例と同時期に発生した胃腸炎散発事例からの検出株間、各事例検出株と食品検出株等との関連性、更には両胃腸炎間の地理的な関連性の有無をGISを用いて検討した。

調査は、本研究班で定めた方法及び平成13年11月16日付け食監発第267号厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知に定めた方法に基づいて行った。検査材料は、平成13年4月から翌年1月までの9か月間に新潟県内で発生した集団急性胃腸炎患者の糞便と、県内5か所の感染症サーベイランス定点医療機関で得られた感染性胃腸炎患者糞便及び食品等である(表1)。本ウイルスの遺伝子系統樹解析はUPGMA法によりポリメレース領域222bpの部分について行った。

2. 感染症サーベイランスで得られた1982年から2002年の20年間の本邦におけるSRSV感染症とロタウイルス感染症の変遷を検討した。

C 結果・考察

1. GISによるのNV感染症の疫学的分析

本邦では平成13年度から食中毒の病原としてSRSVがそのトップになり、重要性が増してきた。新潟県でも年々患者数が増加し、平成15年度はまだ2つの流行ではあるが、既に患者数としては300を超えるほどと過去最大となった。

昨年までNVによる集団急性胃腸炎事例と同時期に発生した胃腸炎散発事例からの検出株間、各事例検出株と食品検出株等との関連性、更には両胃腸炎間の地理的な関連性の有無をGISを用いて検討した。

これまでの検索において、地域内で小児の散発性急性胃腸炎と同時期に同一genotypeによる集団急性胃腸炎事例が高頻度に発生し、時には同一genotypeが長期間検出されている事実が捕まえられている(図1)。1999-2000年と2000-2001年における集団急性胃腸炎事例の市町村位置と保健所別の小児の散発性急性胃腸炎について、GIとGII別に関連を検討した(図2)。両者が一致してみられることもあるが大半は別個に発生していた。

以上のように、分子疫学的には両疾患の関

連性が強く示唆されたが、空間的解析とするGISにおいては、強い関連性は示されなかった。この原因として、小児の散発性急性胃腸炎報告が全県でなくある特定の地域に偏っていることが考えられた。

また、県内のSRSV関連の発生状況調査法においても大きな問題があることも明らかになった。発生に当たり、一つは感染症サーベイランスの中の感染性胃腸炎として、もう一つは食中毒として把握される。しかし、集団急性胃腸炎発生においては、食中毒に区分されない事例がそのまま埋もれてしまい、しかもその数が決して見過ごすことが出来ないことが判明した。この事実には担当部署では認識しているが、現行ではいかんともしがたいのも事実であった。即ち、SRSVの全容が不明のままであり、今後本疾患への対策を講ずる際の疫学調査での解決が急がれる問題であることが明らかになった。このことより、新潟県では、SRSVの全数を把握する手だてを来年度から着手予定となった。

2. 感染症サーベイランスで得られた1982年から2002年の20年間の本邦におけるSRSV感染症とロタウイルス感染症の変遷を検討した(図3, 4, 5)。

SRSV感染症は毎年冬季に見られ、ピークとして12月と1月に最多で、11月から3月にわたっている。3年ごとの移動平均でピークは12月と1月でありこの20年間では大きな変化は見られていなかった(図3, 4)。

一方、ロタウイルス感染症は、これまで冬季に流行すると思われ、1, 2月にピークを示してきた。しかし、90年代中間から春に移動しはじめ、2, 3月と約1ヶ月間遅くピークを迎えた(図3, 5)。我々の1970年代の仕事において、ロタウイルス感染症は相対湿度ではなく温度が関係していることを報告した。このことから、本邦の気温の変化を調査し、ロタウイルス感染症したほぼ同時期に、温暖

化が進んでいる事も確認された(図6)。以上より、本疾患が地球の温暖化により、ピークがずれた可能性が示唆されたが、更なる検討が必要と思われた。しかし、海産物との関連が強いSRSVでは地球の温暖化の影響が見られていず、一元的な説明が可能か多くの検討が必要であることを示唆しているとも思われた。

D 結論

1. 食中毒の病原としてSRSVがそのトップになり、新潟県でも年々患者数が増加し、重要性が増してきた。

2. 集団急性胃腸炎事例の市町村位置と保健所別の小児の散発性急性胃腸炎について、分子疫学的には両疾患の関連性が強く示唆されたが、空間的解析とするGISにおいては、強い関連性は示されなかった。

3. SRSV関連の発生状況調査に際し、集団急性胃腸炎発生の扱いが不備でSRSVの全容が不明のままであり、今後本疾患への対策を講ずる際の疫学調査での解決が急がれる問題であることが明らかになった。

4. 過去20年間の本邦におけるNV感染症とロタウイルス感染症についてその変遷を検討し、SRSV感染症ピークは12月と1月と変化は見られていなかった。一方、ロタウイルス感染症は、1, 2月から2, 3月と約1ヶ月間遅くピークを迎え、同じ時期に温暖化が進んでいる事も確認され、本疾患が地球の温暖化により、ピークがずれた可能性が示唆されたが、更なる検討が必要と思われた。

1. 鈴木宏、西川眞。ノーウオークウイルス手
集団食中毒と小児急性胃腸炎の関連性 一
本邦での歴史を踏まえて一。日本臨床、60:1208
-1213, 2002.

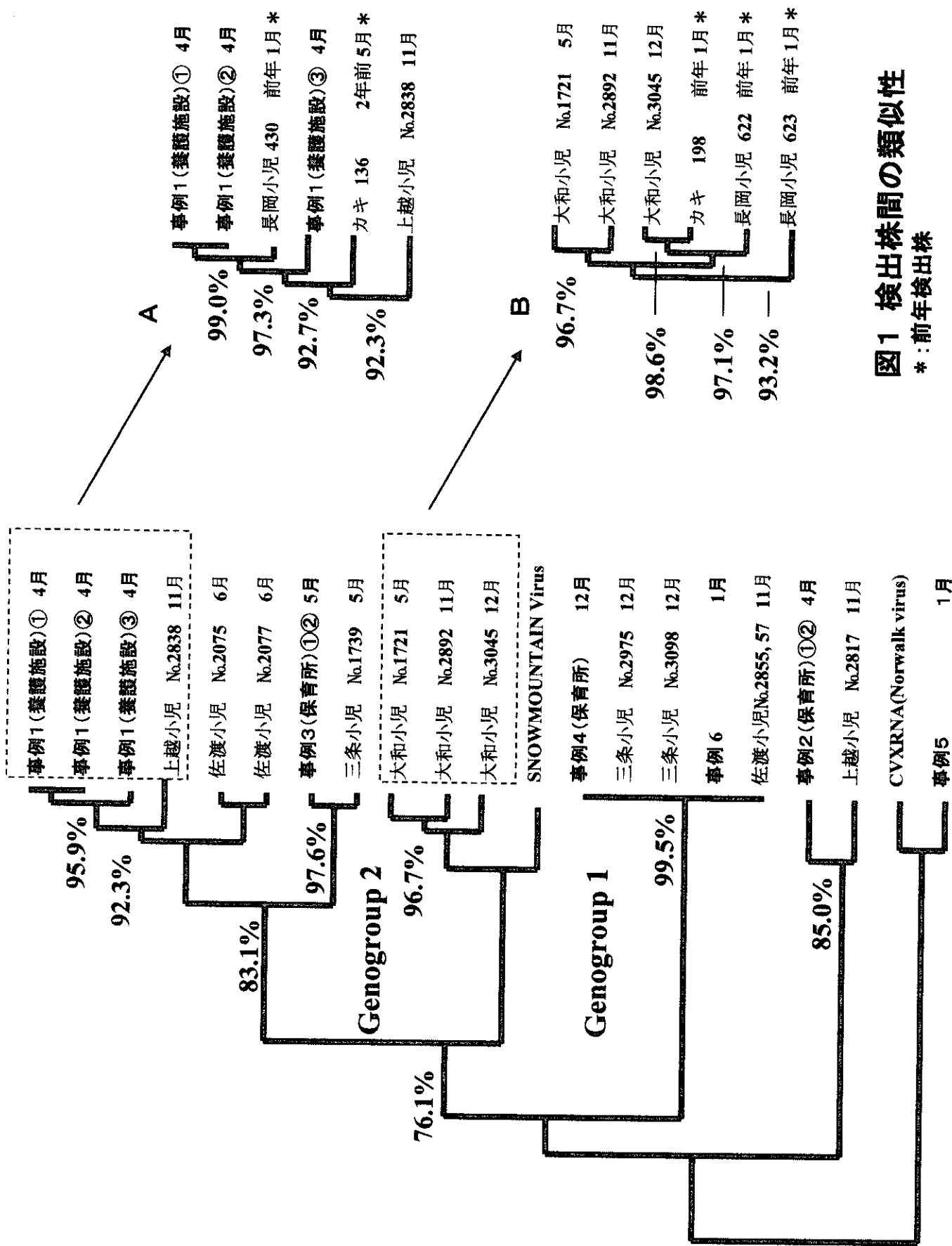


図1 検出株間の類似性

*: 前年検出株

図2. 1999-2000年と2000-2001年における市町村毎の集団急性胃腸炎事例と
保健所別の小児の散発性急性胃腸炎由来のNVウイルスの地域分布

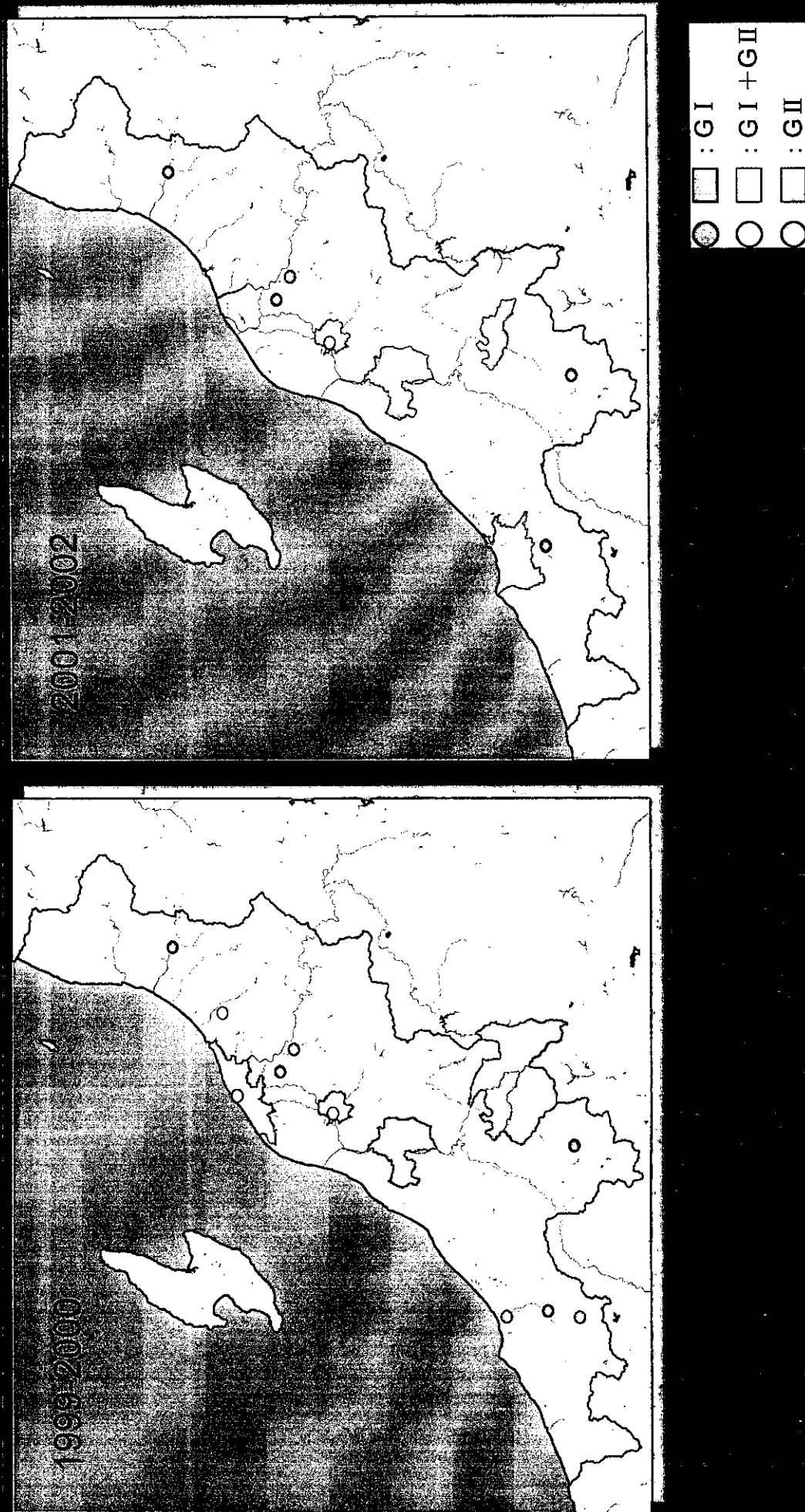


図3 1985年から2002年におけるロタウイルスとSRSV感染症の推移

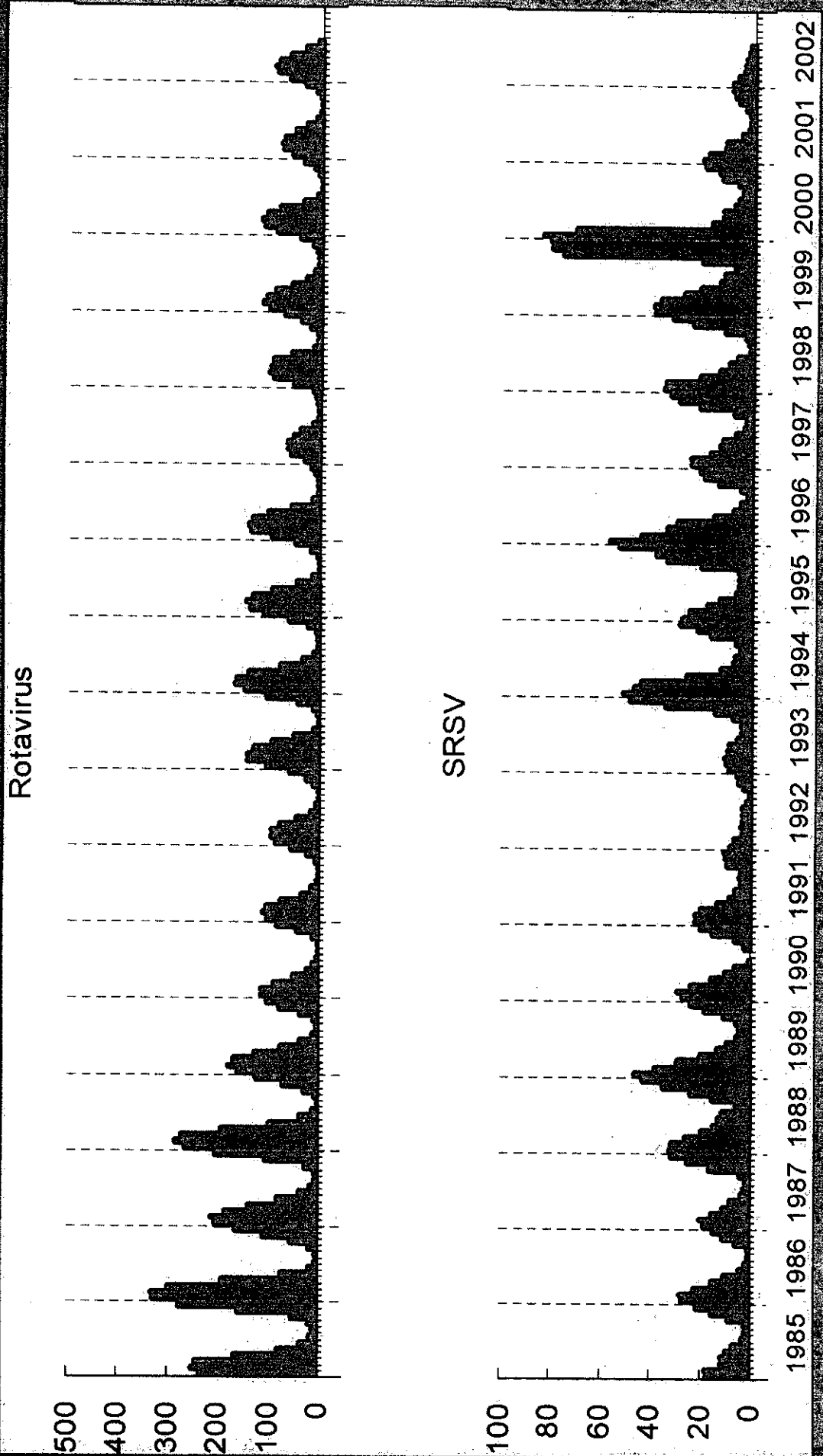


図4. SRSV感染症ピーク月の3年移動平均の推移

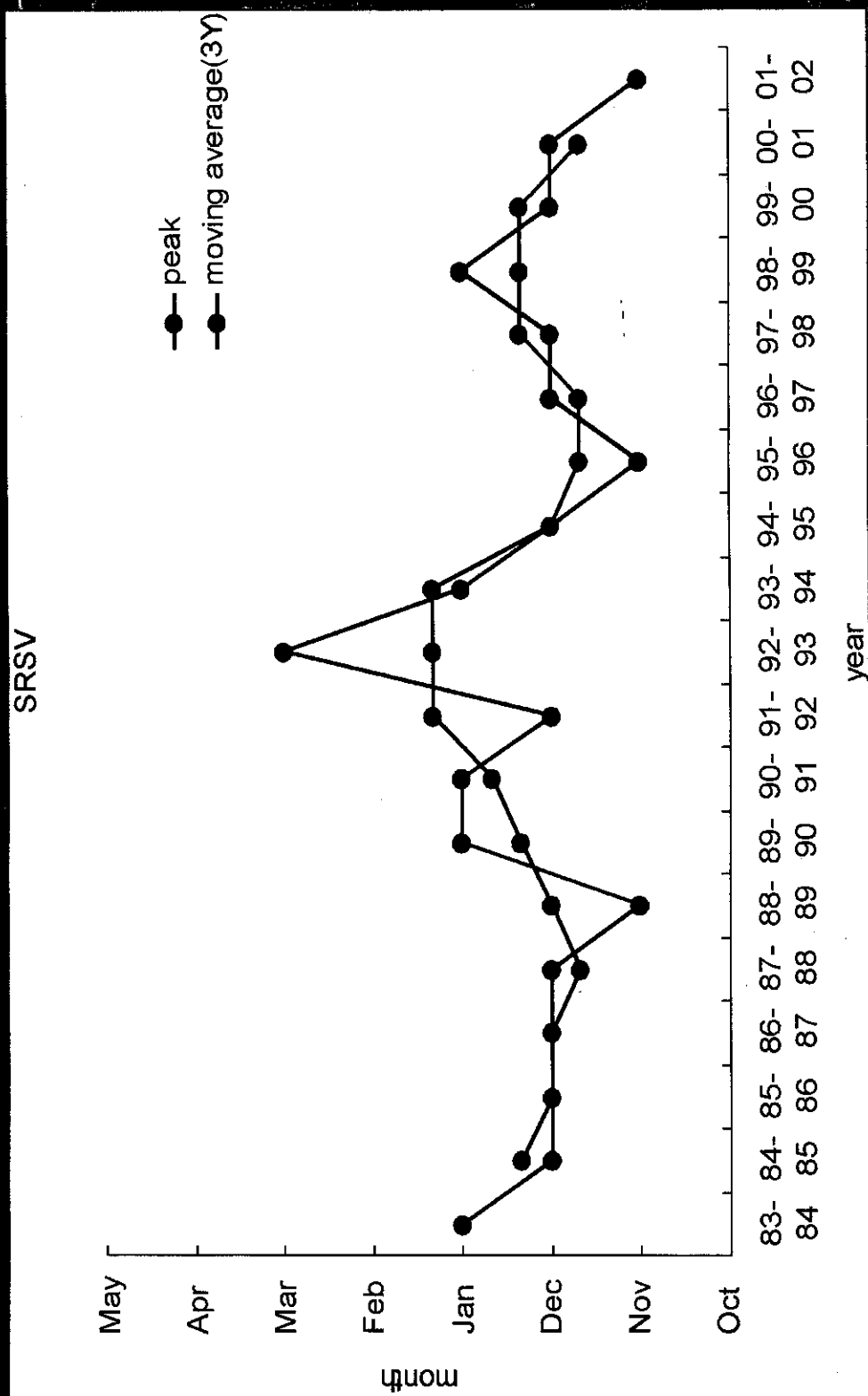
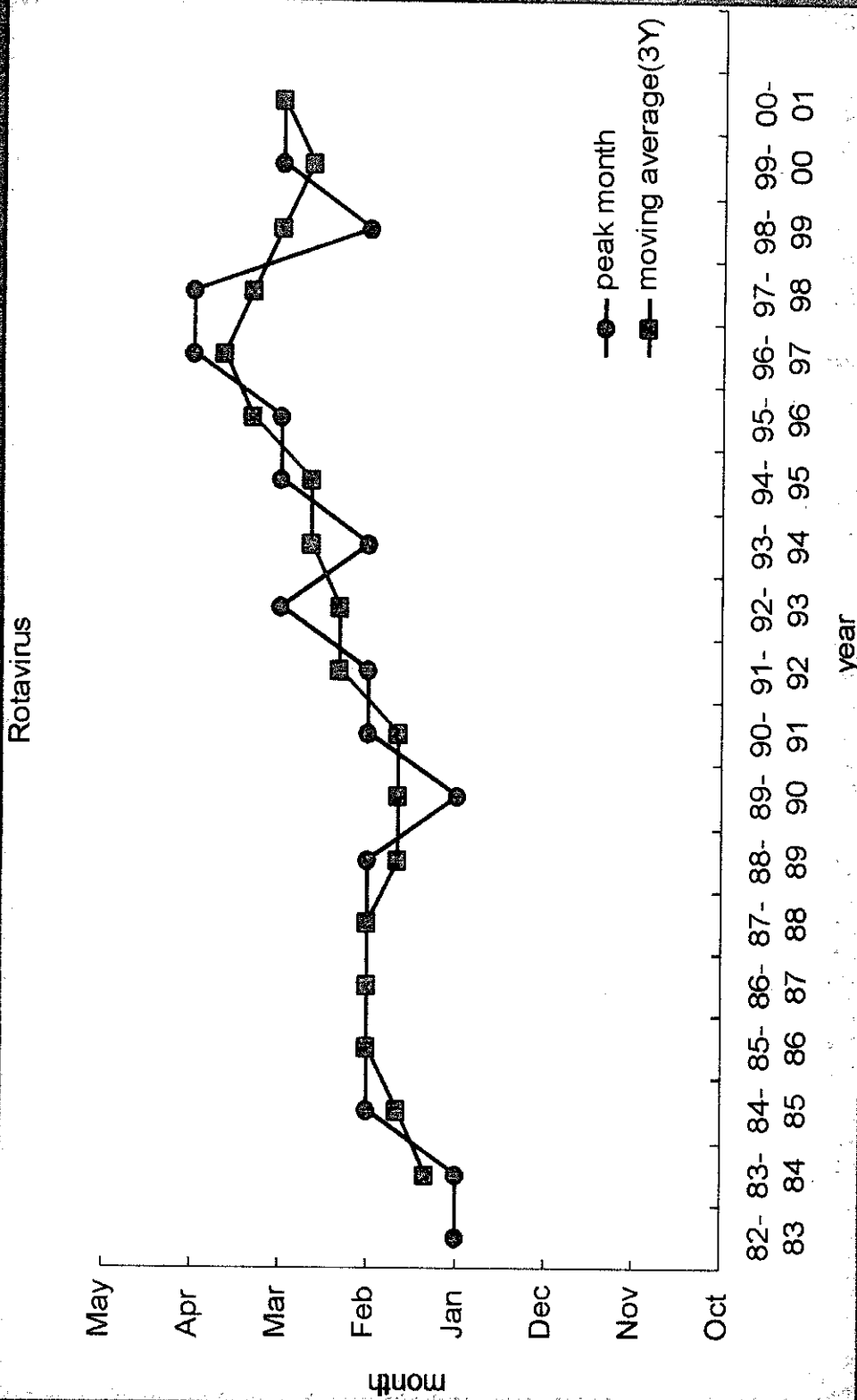


図5 ロタウイルス感染症ピーク月の3年移動平均の推移



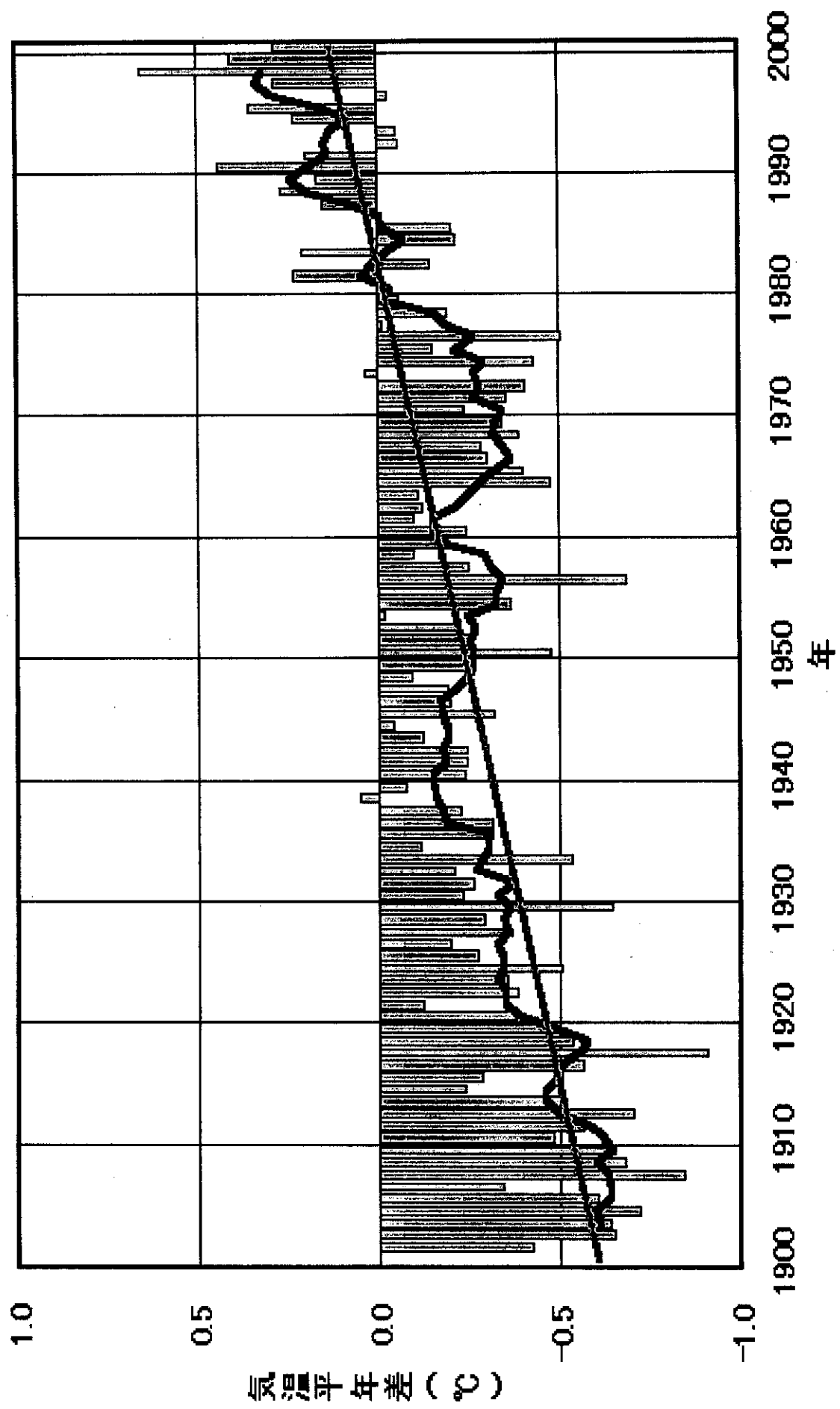


図6. 地球全体(陸上のみ)の年平均地上気温の経年変化(1901-2000年)

平成 14 年度 食品化学物質安全総合研究事業

(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「食品中の細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 国立感染症研究所感染症情報センター 伊藤 健一郎

研究協力者 佐賀県衛生薬業センター微生物課 森屋 一雄

日本海事検定協会理化学分析センター食品衛生チーム 松崎 充宏

栃木県保健環境センター微生物部 岡本 その子

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。今年度は初年度に続き下痢原性大腸菌の検査法の検討を行い、さらにわが国で分離された代表的な株を検査した。また、食品における細菌の汚染状況を調査する方法についてさらに検討した。

局在性付着大腸菌では、(1) 血清型または *eae* 遺伝子型により、病原性に関連する遺伝子に変異または欠損があること、(2) コンタクトヘモリシス法を用いた生物活性は同じ血清型でも異なるものがあること、また遺伝子型により増菌培地による影響を受けること、(3) 分泌タンパクである EspB の発現は生物活性と相関していることが判明した。病原性の検査法として Protein Chip 等が応用できる可能性がある。

平成 13 年にキムチが原因食の O157 流行が見られたこともあり、前年度に引き続き漬物に関連した食品の汚染状況を調べた。本年度は対象を白菜以外の漬物及び生鮮野菜に広げた。漬物では、腸管出血性大腸菌 O157 と他の病原大腸菌及びサルモネラは全て陰性であった。黄色ブドウ球菌は 1 件 (小松葉) から検出された。大腸菌は公定法では 4 件 (9.3%) だけであったが、食中毒検査法では 8 件 (18.6%) から検出された。セレウス菌は 23 件 (53.5%) から検出され、分離株の半分以上に下痢性毒素の産生性が見られた。一方、生鮮野菜からは病原菌は検出されなかったが、*Klebsiella*、*Citrobacter*、大腸菌が検出された。一般細菌や大腸菌群による白菜の汚染率が非常に高いことが明らかになった。大腸菌とセレウス菌の検査には問題があり、簡便で特異性の高い方法の開発等検討が必要と思われる。

A 研究目的

ヒトの腸管には大腸菌が常在している。ほとんどは無害であるが、一部の大腸菌は下痢を惹き起し、下痢原性大腸菌と総称されている。細菌性下痢症の原因の上位を占めている。いろいろな病原機序を持っており、(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、はよく知られているカテゴリーである。

新しい病原機序を持つ大腸菌も提案されている。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。前回の調査において、埼玉県・佐賀県・愛知県等の患者由来大腸菌 2066 株及び健康者由来大腸菌 903 株を調べた結果、日本の付着性関連遺伝子陽性大腸菌の血清型は、国際標準の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有状況から、*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が、分離数の多い O55:H7 や O126:H27 は有意性が否定された。*eae* 陽性株については全体では有意差は見られなかった。

本年度は局在性付着大腸菌を精査した。EPEC の検査としてよく使用される *eae* 遺伝子は必要ではあるがそれだけで十分ではなく、下痢原性とは必ずしも一致しない可能性が高い。前年度に開発した Multiplex PCR 法で、患者・健康者由来の株における病原性関連遺伝子の分布状況を調査し、また、生物活性や病原性関連因子の発現を免疫学的方法で調べ、あわせて適当な検査方法を検討した。

2. 細菌の食品汚染に関する調査

前回の調査では、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の食品検査法と食中毒の原因食品を調べるときの検査法（食中毒検査法）を比較した。大腸菌は公定法では検出されなかったが、食中毒検査

法では 22.2%から検出され、現行の検査法では下痢原性大腸菌を見落とす可能性が示された。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、調査材料を白菜以外の漬物や生鮮野菜にも広げ、検査法の比較検討を継続した。

B 研究方法

1. 局在性付着性大腸菌の検査法開発

a) PCR

前回開発した Multiplex PCR で行った。標的遺伝子は表 1-1 にあげた。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*、局在性付着に必要な遺伝子群をコードしている 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 *ler* を調べた。また、プラスミド上の遺伝子として、局在性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* を対象とした。

寒天平板上に一夜培養した菌体を 100 μ l 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 μ l で、0.1~0.2 μ M primer 溶液、0.1mM dNTP 混液、 $\times 1$ 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 μ l 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 回繰り返す、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。

b) 生物活性検査法の検討:

病原性を持つ細菌では、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。この装置を保有する菌は、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ぬ、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°C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°C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°Cで溶血を観察した。一部の大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 540 nm で吸光度を測定した。

液体培地は細菌培養用の Penassay Broth(PAB と略、Difco) と細胞培養に使用される DMEM (Gibco) を使用した。

c) Western Blotting 法による EspB タンパクの検出

コンタクトヘモリシス法の時に菌培養した上清から 10%TCA でタンパクを調製した。13%のポリアクリルアミドゲルで電気

泳動した後、PVDF 膜に電氣的にブロッキングして、スキムミルクでブロッキングした。抗 EspB 抗体(感染研細菌 1 部から分譲)、HRP 標識 2 次抗体を順次反応させ、4-クロロナフトールで染色した。

2. 細菌の食品汚染に関する調査

大腸菌の分布に関する調査食品として、白菜以外を原料とする漬物も対象とした。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 2-1 に示した。検体は表 2-1 に示した。

生野菜に関しては、市販のとうがん・チンゲン菜・ねぎ・キャベツ・もやし・人参・きゅうり・ピーマン・玉葱・ほうれん草の計 31 検体を調べた。検査法は出血性大腸菌の検査法を主として、出血性大腸菌 O157:H7 ではないと推定される集落については IMViC 試験を行った。

C 結果

1. 局在性付着性大腸菌の検査法開発

a) 大腸菌の付着に関連する遺伝子の PCR *eae* 遺伝子の HMA 型により対象遺伝子の保有状況に特徴があった。局在性付着大腸菌の標準株として用いられている E2348/69 を含む 2 型の多くは対象とした遺

伝子をすべて保有していた。2a型では O63:HNM が *bfpA* と *perA* が検出されなかったが、他はすべて保有していた。2b型は O55:H6 のみがすべて保有しており、*bfpA* と *perA* を保有していなかった。4型は O15:H2 と O119:H2 は *bfpA* のみ陰性だが、他の株は加えて *perA* も検出されなかった。O157:H7 を含む 1型では *ler*、*espA*、*tir* 保有型と *ler*、*tir* 型に分かれた。O55:H7 は後者に属していた。3型は全遺伝子保有か *bfpA* のみ陰性であった。

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存在するため、対照を常におく必要がある。PAB および DMEM の両培地で活性が観察されたが、HMA 型で特徴が見られた。2型は DMEM で強い活性を示すが、PAB では弱く、活性が見られない株もあった。わが国で比較的多く分離される O157:H45 は両培地とも活性が見られなかった。4型は逆に PAB で高い活性が見られるが DMEM では低い傾向が見られた。1型や 3型はまったく活性が見られなかった。

c) EspB の発現

EspB は、2型ではほとんどの株から検出されたが、O157:H45 では検出されなかった。4型では血清型 O128:H2 はすべてで検出されたが、O26:H11 や O15:H2 では一部で検出された。O119:H2 では検出されなかった。1型では O55:H7 で 1株 O153:H19 の 1株から検出されたが、O157:H7 は全株、O55:H7 はほとんどが陰性であった。3型は全て陰性だった。

2. 細菌の食品汚染に関する調査

表 2-1 に漬物の種類と主材料および検査結果を示した。一般細菌数は、 $10^3 \sim 10^8/g$ の範囲で検出され、うち $10^5 \sim 10^6/g$ の検体

が半数を占めた。変質が疑われる $10^8/g$ 以上が、14.0% (6/43) 認められた。種類別にみると、主材料が白菜では 15 検体中 8 件が $10^6/g$ 以上検出され、 $10^8/g$ 以上が、5 検体 (30.0%) に認められた。きゅうりでは、 $10^6/g$ 以上が、16 検体中 5 件検出されたが、 $10^8/g$ 以上は 1 検体 (6.3%) と比較的少なかった。

大腸菌群数は、全体の 60.5% (26/43) から検出された。 $10^6/g$ 以上が、6 検体 14.0% (6/43) 検出された。材料別では、きゅうりに検出されないものが多かったが、白菜ではすべてから検出された。

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。公定法の 44.5°C 培養検査では大腸菌は 4 件 (9.3%) から検出されたただけであったが、食中毒検査法では倍の 8 件 (18.6%) から検出された。

腸管出血性大腸菌 O157 及び他の病原大腸菌、サルモネラは全て陰性であった。黄色ブドウ球菌が 1 件の小松葉を主材料とする漬物から検出された。セレウス菌は菌量は少ないものの半分以上の 23 件 (53.5%) の検体から検出された。RPLA および PCR により下痢毒を調べたところ、分離株の 70% 以上から検出された。

生野菜では病原菌は検出されなかった。ほうれん草 2 検体から *Klebsiella* が、キャベツ 2 検体から *Klebsiella* と *Citrobacter* が、きゅうり 4 検体から *Klebsiella* と大腸菌が検出された。

D 考察

1. 局在性付着性大腸菌の検査法開発

古典的な病原大腸菌の血清型は O55:H6、O86:H34、O111:H2、O111:H12、O119:H6、O125:H21、O126:H27、O127:H6、O128:H2、O142:H6、および各 O 抗原の運動性陰性株

が含まれている。この中で O86:H34、O126:H27 は遺伝子の保有状況等から、EAggEC に属している。O157:H7 や O26:H11 等の出血性大腸菌は志賀毒素を産生する他に、局在性付着大腸菌と同じ付着因子を持っていることが多い。付着の中心的役割を果たす *eae* は遺伝子多型を示し、 α から ϵ に分類されている。我々の HMA 法を用いた分類では 1 から 5 までに大きく分け、さらに細かく分類される。HMA 1 型は γ 、2 型は α 、4 型は β と一致する。しかし、それぞれの型でも健康者から頻繁に分離され有意差は見られない (表 1-2)。今回の調査で各型の下痢原性について検討した。

局在性付着大腸菌 (EPEC とされる) の標準株とされる E2348/69 が含まれる 2 型のうち古典的血清型 O55:H6、O119:H6、O127:H6、O142:H6 は遺伝子の保有状況、コンタクトヘモリシス活性および EspB の発現とも陽性であり下痢原性を有することが強く示唆される。一方わが国で比較的分離されることが多い O157:H45 は、今回調べた全遺伝子を保有してはいたが、コンタクトヘモリシス活性および EspB の発現は見られなかった。また 2 型の残りの血清型では遺伝子の欠損または変異があり、コンタクトヘモリシス活性および EspB の発現も見られなかった。2 型の他の血清型では下痢原性を持たない可能性が高い。

4 型の遺伝子保有状況はプラスミド性の遺伝子に欠損または変異があることが推定される。O128:H2 で *bfpA* と *perA* が検出されないが、コンタクトヘモリシス活性および EspB の発現は陽性であり、E2348/69 とは少し異なる機構ではあるが下痢原性を持つ可能性が高い。本菌は古典的病原血清型にも含まれている。O26:H11 や O15:H2 では同じ型の株でも結果が異なり、下痢原性

を有するものともたないものが混在していることが推測される。O119:H2 は *bfpA* のみ陰性で、コンタクトヘモリシス活性を持つが、EspB は保有していなかった。今回調べた本血清型の株はすべて健康者由来であり、下痢原性を持たない株のみが含まれていた場合も考えられる。患者・健康者間の分布では健康者からの分離が多いことから、下痢原性を持たない可能性もある。

1 型および 3 型は全体的に遺伝子の保有状況は 4 型と同様だが、O55:H7、O157:H7 は *espA* も陰性であった。データベースに載っている *espA* の配列から、今回使用した primer セットでは O157:H7 の *espA* は検出不可能と推定される。しかし、O55:H7 はデータベースの配列からは検出可能であり、わが国の株では変異が起きているのかもしれない。コンタクトヘモリシス法はすべて陰性であった。EspB は O55:H7 の 1 株と O153:H19 の 1 株から検出されたが、O157:H7 では全株が陰性であった。O157:H7 は患者から有意に分離されているため、今回用いた条件では病原性を発揮していない可能性は残る。

今回の調査では EspB の検出が最も下痢原性と関連していると思われる。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。引き続き条件の検討と分離株の検査を行う必要がある。またコンタクトヘモリシス法は 3 型分泌機構と関連するとされるが、分化した Caco2 細胞を用いた電気抵抗測定法等、ほかの原理の生物活性測定法も導入し、多角的に推定する必要を感じる。

EspB は細菌細胞外に分泌されるため、RPLA やイミュノクロマト法等の方法が応用できる。また、ほかの病原性関連タンパ

クも含め Protein Chip 法を使用すれば、より厳密な検査法も可能であろう。

2. 細菌の食品汚染に関する調査

今回の調査では、腸管出血性大腸菌O157を含む病原大腸菌は検出されなかった。公定法による大腸菌検査は、4件（9.3%）検出された。また、他の培養法（37°C培養や免疫ビーズ法、食中毒検査法）による検査では、さらに4件から大腸菌を検出し、あわせて18.6%（8/43）から検出された。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。

汚染状況については、一般細菌や大腸菌群による白菜の汚染率が非常に高いことが明らかになった。一般細菌や大腸菌群による汚染は、食品の劣化を早め、苦情原因ともなるため、取り扱い従事者への衛生指導が必要である。

また今回、セレウス菌が多く検出された。セレウス菌は、漬物のような未加熱食品では極めて多い菌量で検出されない限り、直ちに問題となることはないが、一部は食中毒起因菌でもある。従って原料野菜の入念な洗浄を指導することは、製造者の衛生意識の向上、食中毒菌による危害防止および腐敗細菌等による品質低下防止の観点からも重要と思われる。

検査法上の問題としては、公定法では、検出できなかった大腸菌が、他の検査法を併用することで検出された。大腸菌は、少量の菌でも感染発病することが近年いわれ

ており、より高感度な公定法の検討が必要である。またセレウス菌と同定された中に、現在生物農薬として使用が許可されている *Bacillus thuringiensis* は鑑別が困難なため、誤同定されている可能性がある。簡便で特異性の高い検査法の開発が望まれる。

E 結論

1. 局在性付着性大腸菌の検査法開発

今回の調査で各型の下痢原性について検討した結果、*eae* 陽性の株のうち、古典的病原血清型に属する菌に下痢原性があると思われた。*eae* 遺伝子の HMA 型では、2 型の O55:H6、O119:H6、O127:H6、O142:H6 および 4 型の O128:H2 に下痢原性があると思われた。一方わが国で比較的分離されることが多い 2 型の O157:H45 や他の血清型、4 型の O119:H2 では下痢原性を持たない可能性が高い。O26:H11 や O15:H2 では同じ型の株でも結果が異なり、下痢原性を有するものともたないものが混在していることが推測される。1 型および 3 型は、さらに検査法の条件を検討する必要がある。

今回の調査では EspB の検出が最も下痢原性と関連していると思われる。引き続き条件の検討と分離株の検査を行う必要があるが、EspB は細菌細胞外に分泌されるため、RPLA やイミュノクロマト法等の方法が応用できる。また、ほかの病原性関連タンパクも含め Protein Chip 法を使用すれば、より厳密な検査法も可能であろう。

2. 細菌の食品汚染に関する調査

今回の調査では、公定法による大腸菌検査では 4 件（9.3%）から検出されたが、食中毒検査法では 8 件（18.6%）から検出された。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。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。

汚染状況については、白菜の汚染率が非常に高いことが明らかになった。取り扱い従事者への衛生指導が必要である。

セレウス菌と現在生物農薬として使用されている*Bacillus thuringiensis*は鑑別が困難なため、誤同定されている可能性があり、簡便で特異性の高い検査法の開発が望まれる。

F 発表業績

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) 森屋一雄、増本喜美子、隈元星子、藤原義行、山口博之、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄：保育園における腸管出血性大腸菌 O121:H19 の集団事例について。第 6 回腸管出血性大腸菌シンポジウム。東京、2002.6.

3) 成松浩志、小林貴廣、世古庄太、後藤祐司、木元正一、尾形長彦、瀧 祐一、伊藤健一郎：と畜場に搬入された豚の糞便中におけるペロ毒素産生性大腸菌（VTEC）の分布と病原性関連因子保有状況調査。食品微生物学雑誌、2002、19：21-26.

4) 小林一寛、伊藤健一郎他：下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査の一考察。感染症学雑誌、76：911-920.

5) 伊藤健一郎、松崎充宏：腸管出血性大腸菌 O157 の迅速検査法とその成績の取り扱い。日本臨床。2002、60：1114-1120.