

行に関与していると考えられる。今後は、本研究で得られた PCR で VP2905 遺伝子を持たなかった株 (04:K68, 2003 年分離) が挿入前後を挟み込むプライマー (図 2) による PCR で 16-kb 挿入配列すべてを欠失していることが分かったので (data not shown) この株と Pandemic strain とで様々な表現系を比較する事によりその機能等を明らかにしていく予定である。

#### E. 結論

- ・ Genomic subtraction により Pandemic strain に特異的な DNA 断片が 1 つ得られ、この断片を含む遺伝子 (VP2905) は Pandemic strain に特異的に挿入していると近年報告された約 16-kb の DNA 配列の一部であった。
- ・ この 16-kb 配列は DNA 結合タンパク HU- $\alpha$  をエンコードする塩基配列領域に挿入しており、この挿入によりアミノ酸配列の末端に変異が生じている。
- ・ この挿入配列はファージ等の外来に由来すると考えられ、配列内の遺伝子がエンコードするタンパクの機能は未知である。
- ・ この挿入配列のエンコードするタンパクおよび挿入による HU- $\alpha$  の変異のいずれかあるいは両方が Pandemic strain の世界的流行に関与していると考えられる。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

Okura, M., Osawa, R., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H. Identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* specific DNA sequence by genomic subtraction. J. Clin. Microbiol. 43: 3533-3536. 2005

#### G. 研究課題 2 の研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 (O157) は、分離菌株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) パターンが多様であることから予想されるように、菌株間でのゲノム構造は非常に多様であると考えられる。しかし、そのような多様性がどのようにして起こるのかについてはこれまでにほとんど解明されていない。我々はこれまでの研究で O157 株を実験室で継代培養することにより、PFGE パターンの変化した菌株が派生することを報告している。本研究では O157 のゲノム構造多様化の原因を明らかにするために、継代培養により派生した菌株を用いて PFGE パターンの変化に関与した変異の解析をおこなった。

#### H. 研究方法

- 1) 供試菌株 : EDL933 全塩基配列解析株および継代操作で得られた PFGE パターンの異なる EDL933 派生株 19 株 (継代初代株を含む) を用いた。
- 2) PFGE パターンの比較 : *Xba*I 処理による PFGE パターンの比較をおこな

った。また、EDL933 株全ゲノム配列より *Xba*I サイトマップを作製し、比較する2株間で変化したパターン（フラグメント）のゲノム上での位置を特定した。

3) 変異の解析：サイズが変化したフラグメントの多くは、その内部に構造多型領域として知られるプロファージまたはファージ様 DNA を含んでいたことからこれらの領域に注目し、ラムダ型ファージとファージ様 DNA の両端を標的としたプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、およびプロファージとその周辺領域を標的とした PCR により PFGE パターンの変化に関与した変異の解析をおこなった。

## I. 研究結果

1) 大規模な逆位：サザンハイブリダイゼーション解析により PFGE パターンの変化に関与した変異の一部は大規模な逆位であることがわかった。逆位はゲノム上の複製軸に対してほぼ対称な位置に存在する2つのラムダ型ファージまたはファージ様 DNA 上の領域を介して起こっていた。5つのラムダ型ファージ DNA 領域を介した4つの組み合わせと、EDL933 ゲノム上に2セット存在する亜テルル酸耐性遺伝子やウレアーゼ遺伝子などを含むファージ様 DNA 領域を介した1つの組み合わせでみられ、その大きさは250 kb から 1.4 Mb であった。また一度の逆位で PFGE パターン間の4バンドが変化した。上記いずれかの逆位に

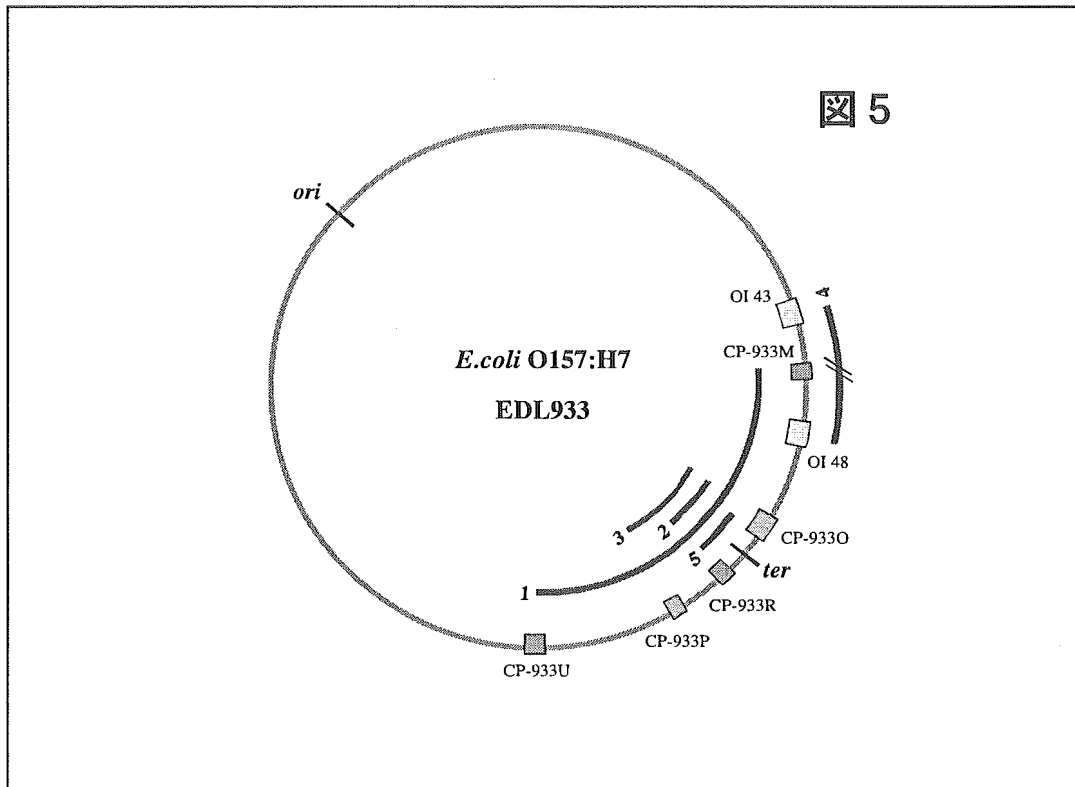
よる PFGE パターンの変化が7株でみられた。(図5)

2) その他の変異：Stx2 ファージ (BP-933W) DNA の欠落による PFGE パターンの変化が3株でみられた。また、あるプロファージ (CP-933Y) 上  
2) その他の変異：Stx2 ファージ (BP-933W) DNA の欠落による PFGE パターンの変化が3株でみられた。また、あるプロファージ (CP-933Y) 上に存在する挿入配列 (IS629) を介した30から50 kb に及ぶ欠失が3株での PFGE パターンの変化に関与していた。

## J. 考察

継代操作で得られた派生株の PFGE パターンの変化の多くは、ラムダ型ファージ DNA 領域を介した逆位が関与していた。大規模な逆位の多くは全塩基配列の解析などから相同性の高い配列を介した相同組換えにより起こると考えら、共有するラムダ型プロファージ領域間で起こった逆位は DNA 上の相同性が極めて高い領域を介して逆位が起こったと予想された。現在、変異箇所の特特定をおこなっている。この種類の変異が高頻度に起こった原因として、相同性の高い配列を共有するラムダ型ファージ DNA がゲノム上に多数 (12 個) 挿入していること、また全てのラムダ型ファージの挿入方向が複製開始点から終結点に向けて同じであること等が考えられる。大規模な逆位が O157 ゲノムの多様化に関与する可能性が予想されたことから、

図 5



環境や臨床より分離される菌株の逆位によるゲノム多様化についても検討すべきであると考えられる。

#### K. 結論

PFGE パターンの変化に関与した変異の一部は EDL933 ゲノム上に挿入しているラムダ型ファージ領域を介した大規模な逆位であった。実験室などでの連続した継代培養がこのような変異を引き起こすことに留意すべきである。また PFGE パターンから得られる情報をより正しく理解するために、環境や臨床より分離される菌株の逆位によるゲノム多様化についても検討すべきであると考えられた。

#### L. 健康危機情報

特になし

#### M. 研究発表

Iguchi, A., Iyoda, S., Terajima, J., Watanabe, H. Osawa, R. Genetic basis for the genomic plasticity of Escherichia coli O157:H7. 40th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting 2005 Nov. 30 - Dec. 2, 2005

## アエロモナスの感染発症に関わる因子の解析

岡本敬の介

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・薬学系

### 研究要旨

*Aeromonas sobria* や *A. hydrophila* は強い溶血活性を示す。この溶血活性は下痢毒でもある溶血毒に由来する。しかし近年培養上清や血液寒天培地で溶血活性を示さないアエロモナス、すなわち *A. trota* や *A. caviae* の分離頻度が上昇してきた。そこでこれらの菌、特に *A. trota* の溶血毒と下痢症との関連について研究を行った。またアエロモナスは腸炎の他にも血性水泡や筋肉壊死を引き起こすことも知られている。そこでこれらの症状の発症に関与していると思われる因子の性状を解析し、以下の事を明らかにした。

- 1) *A. trota* は *A. sobria* 溶血毒と共通抗原性のある蛋白毒素を産生しており、この毒素が下痢毒素として作用している。この毒素はプロテアーゼで容易に分解を受けるため、培養上清では本毒素の活性が検出できない。
- 2) 本菌の感染による血性水泡の発症には、菌の産生するセリンプロテアーゼのプレカリクレイン分解活性が関与している可能性がある。

### A. 研究目的

アエロモナスは水中に生息しており、多くの菌は非病原性である。しかしある種のアエロモナスはヒトに下痢を引き起こし、さらに菌が血中に移行し、血性水泡、筋壊死、さらには敗血症や髄膜炎を引き起こす。この病原性を発揮するアエロモナスは特有の病原因子を保有していると考えられ、従来より病原性因子の研究が行われてきた。その結果 *Aeromonas sobria* や *A. hydrophila* では菌が産生する溶血毒素が下痢毒素として作用し、宿主に下痢を引き起こしていることが証明された。また、一方、アエロモナスの研究が進展するとともに、*A. sobria*、*A. hydrophila*

以外の菌、すなわち *A. trota* や *A. caviae* もヒトに下痢を起こしていることが明らかになってきた。述べたように、*A. sobria* や *A. hydrophila* では溶血毒素が下痢毒素である。これらの菌は血液寒天で培養すると24時間後には、菌の周囲に明らかなβ-溶血が生じる。また培養上清は強い溶血活性をしめす。しかし *A. trota* や *A. caviae* はこのような顕著な溶血活性は示さない。すなわちこれらの菌では溶血毒、すなわち下痢毒が産生されていない可能性もある。本研究では、まず *A. trota* の下痢発現機構を明らかにするために、本菌の溶血毒素について検討した。

次に本菌感染でしばしば発症する血

性水疱の発症機構を明らかにする実験を試みた。*A. sobria* が産生するセリンプロテアーゼを皮下に投与すると浮腫が生じる事がわかっているため、本実験ではその機構を明らかにするため、本セリンプロテアーゼのプレカリクレイン分解活性を調べた

## B. 研究方法ならびに結果

### 1) *A. trota* の溶血毒素遺伝子の増幅とクローニング

これまでに *A. trota* の溶血毒素の遺伝子塩基配列は1菌株だけで報告されている。この配列をもとに *A. trota* の溶血毒のプライマーを設計し、これを用いて研究室保有の全てのアエロモナス (*A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. trota* を含む) について PCR での遺伝子の増幅を行った。その結果、*A. trota* に特異的に増幅がみられた。同時に、報告されている *A. caviae* の溶血毒素の報告を元にプライマーを設計し PCR での増幅を試みたが、増幅することができなかった。そこで *A. trota* の溶血毒素の解析を進めることとした。*A. trota* 701 株から PCR で増幅した溶血毒素遺伝子をプラスミドにクローニングした。さらに塩基配列の決定、*A. trota* 溶血毒のアミノ酸配列を推定した。*A. trota* 701 株の推定アミノ酸配列と *A. sobria* 357 株の溶血毒素 (ALH) のアミノ酸配列の相同性は 61.1% であった。*A. sobria* 357 株の 446 位付近 (*A. trota* 701 では 447 位に相当) は溶血毒素の前駆体が活性化型へ移行する際に切断を受ける部位である。この周辺には両毒素での配列の差異が多くみられたので、*A. trota* 701

株の溶血毒素の活性化型への移行形式は ALH とは異なると考えられた。

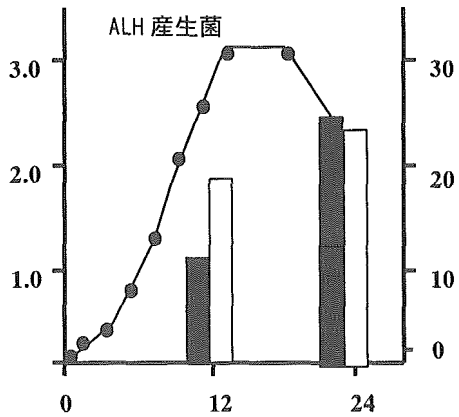
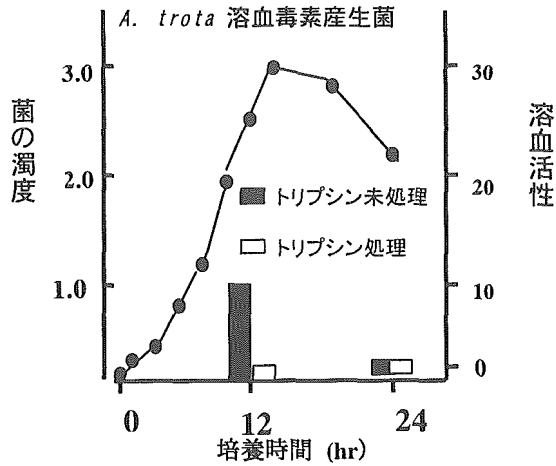
```
MKALKITGLSLIIISATLAAQAGAAEPIYDQLRLFSLGEDVCGADY
RPIINREEAQSVRNNIVAMMGWQISGLANNWVILGPGYNGEIK'PGKASTT
WCYPTRPATAEIPVLPAFNIPDGDVAVDQWRMVHDSANFIKPVSYLAHYLG
YAWVGGDHSQFVGDDMDVIQEGDDWVLRGNDGGKCDGYRCNEKSSIRVSNF
AYTLDPGSFSGHDVVTQSERTLVTHTVVGWATNISDTPQSGYDVTLLNYTTMSN
WSKTNTYGLSEKVKSTKNKFKWPLVGETEVSIEIAANQSWASQNGGAVTTAL
SQSVRPVVPARSRVPVKIELYKANSYPYEFKADMSYDLTFNGFLRWGGNA
WHTHPEDRPTLSHTFAIGPFKDKASSIRYQWDKRYLPGEMKWWDDWNAIQQ
NGLATMQDSLARVLRPVRASITGDFRAESQFAGNIEIGTPVPLGSDSKVRR
TRSDVGANTGLKLDIPLDARELAELGFENVTL SVTPARN
```

### *A. trota* 701 株の溶血毒の推定アミノ酸配列

### 2) 溶血毒素の性状

先に述べた *A. trota* の溶血毒をクローニングしたプラスミドで形質転換したアエロモナスの液体培地での増殖及び培養上清の溶血活性を測定した。溶血活性は、不活性の溶血毒を活性化するために、サンプルをトリプシン処理したサンプルの活性も測定した。対照として、*A. sobria* の溶血毒 (ALH) を挿入したプラスミドで形質転換した菌を用いて、同様に溶血活性を測定した。図にはそれぞれの形質転換菌の増殖と溶血活性を示している。

*A. trota*, *A. sobria* の溶血毒素の遺伝子を有するトランスフォーマントは同じように増殖した。しかし、溶血活性は異なった。*A. trota* の溶血毒素産生株は 12 時間では溶血活性がみられるものの、その活性はトリプシン処理で活性が低下し、また、24 時間後になると、溶血活性はほとんどみられなかった。一方、AHL 産生株はトリプシン処理で活性が上昇し、12 時間後よりも 24 時



間後の方で活性が強く現れた。このことは *A. trota* の溶血毒もこの形質転換菌で産生されるが、菌体外に存在するプロテアーゼで容易に分化されるため、活性が低いと推察された。このプラスミドにクローニングした菌では産生量が多いので、かろうじて活性がみられたが、通常の *A. trota* の菌では遺伝子も染色体に有り、産生量も少なく、また *A. trota* ではプロテアーゼも多く産生されている可能性もあり、通常の液体培養の上清

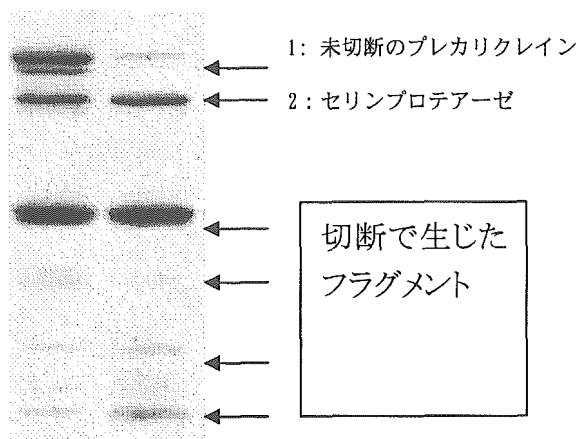
では溶血活性がみられないと考えられた。

### 3) *A. trota* の生菌ループ試験と抗血清の効果

*A. trota*701 株の生菌と正常血清をマウス結紮腸管に注入した。3 時間後に開腹するとマウス腸管ループには液体が貯留していた。一方同様に、正常血清の代わりに ALH の抗血清を注入すると液体貯留は抑制された。このことは、*A. trota* の溶血毒素は ALH と共通抗原性があり、*A. trota* の下痢の主原因毒素として働いていることを示している。

### 4) アエロモナス感染で発症する血性水疱の発症機序に関する研究

*A. sobria* のセリンプロテアーゼをラット皮下に注射すると浮腫が形成される。組織学的な検討では、本浮腫はプロテアーゼによる細胞障害ではなく、むしろ生体側のプロテアーゼに対する反応の結果、浮腫が形成されたと考えられた。さらにこの浮腫発症の機序を検索するため阻害剤の影響を調べた。その結果抗ヒスタミン薬 (diphenhydramine および pyrilamine) やトリプシン阻害薬 (soybean) は本プロテアーゼによる浮腫の形成を有意に阻害することがわかった。これらからセリンプロテアーゼの作用機序としてプレカリクレイン活性化が考えられた。そこでプレカリクレインとセリンプロテアーゼを 37℃、30 分間保温後、SDS-PAGE で解析した。その結果プレカリクレインは 4 個の断片に切断されることが判明した。



カリクレインのセリンプロテアーゼでの切断

### C. 考察

一般の性状検査では溶血活性が認められない *A. trota* も溶血毒素を産生していることが明らかとなった。この溶血毒は ALH と類似性はあるが、構成アミノ酸が異なるため、プロテアーゼに対して極めて感受性となり、分解を受けやすくなっていると思われる。生菌を用いた腸管ループ試験の結果では、本毒素は腸管内でも産生され、この菌の感染時の下痢の主たる原因毒素である事をしめている。

これらのことを総合すると、全てのアエロモナスの感染時の下痢は、この種の溶血毒素の抗体で治療できる可能性を示している。またこれらの溶血毒の共通部位に作用する薬物の開発はアエロモナス感染の治療に有望である。

一方アエロモナス感染から生じる血性水疱の形成には、菌のセリンプロテアーゼのプレカリクレインの切断活性が大きく関与していると思われる。この血性水疱の形成は引き続きの筋壊死発症

につながる事も考えられる。ここで得た知見は治療方法の開発に寄与している。

### D. 結論

*A. trota* が産生する溶血毒はプロテアーゼに対して極めて感受性が高く、菌体外では菌が産生したプロテアーゼで容易に分解を受けられると思われる。しかしこの溶血毒は腸管内で産生されると、宿主に下痢を生じせしめる。またアエロモナスのセリンプロテアーゼにはプレカリクレインの切断活性があり、アエロモナス感染で生じる血性水疱の形成に関与していると思われる。

### E. 健康危機情報

溶血活性を示さないアエロモナスもプロテアーゼに極めて感受性の溶血毒を産生しており、この毒素が下痢を引き起こす。一般の性状検査でこれらの溶血活性陰性のアエロモナスを見逃さないように注意すべきである。

### F. 研究発表

- (1) Takahashi A, Tanoue N, Nakano M, Hamamoto A, Okamoto K, Fujii Y, Harada N, and Nakaya Y. A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates  $Ca^{2+}$ -dependent  $Cl^{-}$  secretion. *Microbial Pathogenesis*, 38(4): 173-180, 2005.
- (2) Li Y, Okamoto K, Takahashi E, Miyoshi S, Shinoda S, Tsuji T, and Fujii Y. A hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce ATP and cyclic AMP which appear to be

- secretory mediators, *Ycrobiology and Immunology*, 49(1):73-78, 2005
- (3) Tanoue N, Takahashi A, Okamoto K, Fujii Y, Taketani Y, Harada N, Nakano M, and Nakaya Y. A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates cAMP-dependent Cl-secretory pathways to cause diarrhea, *FEMS Microbiology Letters*, 242(2): 195-201, 2005.
- (4) Wada A, Wang A, Isomoto H, Satomi H, Takao H, Takahashi A, Awata S, Nomura T, Fujii Y, Kohno S, Okamoto K, Moss J, Millán J, and Hirayama T. Placental and intestinal alkaline phosphatases are receptors for *Aeromonas sobria* hemolysin, *International Journal of Medical Microbiology*, 294(7): 47-435, 2005.
- (5) Senoh M, Miyoshi S, Okamoto K, Fouz B, Amaro C, and Shinoda S. The cytotoxin-hemolysin genes of human and eel pathogenic *Vibrio vulnificu* strains: comparison of nucleotide sequences and application to the genetic grouping. *Microbiol. Immunol*, 49:513-519, 2005.



## 平成17年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

研究課題名： 東京都内で発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症の  
細菌学および疫学的解析

分担研究者 東京都健康安全研究センター・微生物部  
甲斐 明美

協力研究者 東京都健康安全研究センター・微生物部  
小西 典子, 下島 優香子, 尾畑 浩魅, 高橋 正樹,  
横山 敬子, 松下 秀, 矢野 一好, 山田 澄夫, 諸角 聖

### 研究要旨：

下痢原性大腸菌による集団下痢症の発生動向を把握する目的で、1966年から2005年に東京都内で発生した集団下痢症事例245事例について、細菌学および疫学的解析を行った。下痢原性大腸菌のカテゴリー別に発生状況をみると、ETEC 116事例(47.3%)、EPEC 30事例(12.2%)、EHEC 20事例(8.2%)、EIEC 3事例(1.2%)、EAggEC 1事例(0.4%)、不明75事例(30.6%)であった。ETECの血清型および産生毒素型は、O6:H16/NM (LT,ST)、O148:H28 (ST)、O27:H7 (ST)、O159:H20/NM (ST)、O25:NM、O169:H41が多く、年代により異なる流行が認められた。推定原因は、旅行先(国内)での食事24事例、集団給食15事例、仕出し弁当、および飲食店の食事が各13事例、井戸水・飲料水10事例等である。近年は海外旅行中の食事が疑われた事例も増加している。国内、海外共に旅行先の食事が原因となった事例では、複数の血清型・毒素型菌が検出された事例が多い。海外旅行者下痢症患者の多くからETECが検出されることから、近年日本で発生した集団下痢症もこの影響を強く受けているものと推定される。

### A. 研究目的

下痢原性大腸菌は、その発症機序により病原血清型大腸菌(EPEC)、毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管出血性大腸菌(EHEC)、組織侵入性大腸菌(EIEC)、腸管凝集接着性大腸菌(EAggEC)に分

類されている。これらはわが国においても、重要な下痢起因菌である。本研究では、東京都内で発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症の発生状況および最近の発生傾向を明らかにすることを目的として、1966年から

2005年までの40年間に発生した集団下痢症事例について、細菌学および疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

1966年から2005年までの過去40年間に東京都内で発生し、下痢原性大腸菌によると推定された集団下痢症事例245事例を対象とした。

### 1) 大腸菌病原因子の検出

易熱性エンテロトキシン (LT)：市販のラテックスキット (セロトキシン LT, 栄研化学) および LT 毒素遺伝子を対象とした PCR 法で調べた。

耐熱性エンテロトキシン (ST)：乳のみマウス法, ELISA 法 (コリスト EIA, デンカ生研) および ST 遺伝子を対象とした PCR 法で調べた。

ベロ毒素 (VT)：市販のラテックスキット (VTEC-RPLA, デンカ生研) および PCR 法で調べた。

組織侵入性：Seleny 試験および *invE* を対象とした PCR 法で調べた。

接着因子等遺伝子の検出：大腸菌の接着因子等に関わる遺伝子 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*) および EAggEC が産生する耐熱性エンテロトキシン EAST1 関連遺伝子 (*astA*) を PCR 法で確認した。

### 2) 血清型別試験

市販血清 (デンカ生研) および自家調製した O および H 抗血清を用いて、常法に従い型別を行った。

## C. 研究結果

### 1) 下痢原性大腸菌集団事例の発生状況

1966年から2005年に発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症事例245事例について、大腸菌のカテゴリー別発生状況をまとめた結果、ETEC 116事例 (47.3%), EPEC 30事例 (12.2%), EHEC 20事例 (8.2%), EIEC 3事例 (1.2%), EAggEC 1事例 (0.4%), 不明 75事例 (30.6%)であった。

年代別に発生状況をみると、ETEC は 60年代 5事例 (13.9%), 70年代 26事例 (35.6%), 80年代 30事例 (63.8%), 90年代 42事例 (67.7%), 2000年代 13事例 (48.1%)と、いずれの年代においても、最も多く発生していた。EPEC は 1960年代 11事例 (36.3%), 70年代 7事例 (9.6%), 80年代 5事例 (10.6%), 90年代 7事例 (11.3%) の発生が認められたが、2000年代には発生していない。EHEC による事例は 80年代で 1事例 (2.1%), 90年代 8事例 (12.9%), 2000年代 11事例 (40.7%)と増加傾向であった。EIEC は、1970年、1980年および 2005年に各 1事例の発生があった (図 1)。

### 2) 原因となった ETEC の血清型

原因となった ETEC の原因血清型および産生毒素型についてまとめた (表 1)。主な原因血清型は O6 : H16 / NM (LT,ST) 34事例 (23.9%), O169 : H41 / NM (ST) 28事例 (19.7%), O27 : H7 / 20 (ST) 22事例 (15.5%) O148 : H28 (ST) 17

事例 (12.0%), O159:H20/NM (ST) 8 事例(5.6%), O25:NM (ST) 8 事例 (5.6%), O25:NM (LT) 4 事例 (2.6%), その他 21 事例 (14.8%) であった。

血清型および毒素型は、年代によって流行が認められた。すなわち、O6:H16(LT, ST), O27:H7 (ST), O148:H28 (ST) は、いずれの年代でも発生が認められるが、O159:H20/NM (ST) は 70 年代に 7 事例、80 年代に 1 事例発生した後は発生していない。一方、O25:NM (LT), O25:NM (ST) および O169:H41/NM (ST) は 60～80 年代には全く分離されていなかったが、90 年代以降多く分離されている (表 2)。

### 3) 複数血清型が検出された ETEC 事例

ETEC による集団下痢症事例では、複数の血清型・毒素型の大腸菌が原因となることも多い。その様な事例がこれまでに 12 事例あった (表 3)。これらは 90 年代に 4 事例 (33.3%), 2000 年代 5 事例 (41.7%), また、1999 年以降 6 事例発生している。検出された血清型・毒素型数は 2 種類が最も多く 6 事例であったが、6 血清型が検出された事例 (1982 年および 2003 年) や 7 血清型が検出された事例 (1999 年) もあった。複数血清型・毒素型が検出された事例の多くは旅行先での食事が疑われた事例が多く、特に近年では海外旅行先での食事が原因と推定される事例が多く飲料水の関与が

疑われる。

### 4) 推定原因食品

ETEC による集団下痢症事例(116 事例)の推定原因食品についてまとめた (表 4)。最も多いのは旅行先 (国内) での食事 24 事例(20.7%), 次いで集団給食 15 事例(12.9%), 仕出し弁当, および飲食店での食事 (会食料理) が各 13 事例(11.2%), 井戸水・飲料水 10 事例(8.6%), 旅行先 (海外) での食事 3 事例(2.6%), 寮の食事, および家庭の食事が各 2 事例(1.7%), 不明 34 事例(29.3%)であった。旅行先での食事とされている事例の中にも飲料水が疑われた事例がある。1966 年以来、集団給食が原因となった事例が比較的多く発生していたが、90 年代以降、仕出し弁当が原因である事例が増加してきている。また、2000 年以降は海外旅行中の食事が原因とされる事例の割合が多くなっている。

### 5) 稀なタイプの大腸菌による集団下痢症事例

過去 40 年間に EIEC による集団事例が 3 事例発生している (表 5)。1970 年に発生した事例は、患者数 4 名で「串団子」が原因で発生した事例であった。串団子を製造するために井戸水を使用しており、井戸水からも同血清型菌が検出された。

2005 年に発生した事例は、小学校の給食として提供された仕出し弁当を原因とし、児童、教員合わせて 151 名の患者が確認された事例であった

が、残品や検食は残っていなかったため、それ以上の原因追求には至らなかった。

この他、大腸菌接着因子に関わる遺伝子 *eaeA*, *aggR* を保有した EAggEC や耐熱性エンテロトキシン EAST1 関連遺伝子 (*astA*) 単独保有大腸菌によると推定された事例も発生している。これらの大腸菌の病原性については未だ十分に解明されてはいないが、患者から本菌が高率に検出されていることから、何らかの関与があったものと推定された。

#### D. 考察

1966 年から 2005 年までに東京都内で発生した集団下痢症事例の発生状況についてみると、発生件数の多い年で年間 13~14 事例、近年では毎年数事例が発生している。原因菌の多くは ETEC によるもので、今回解析した 245 事例のうちの 43% を占めていた。ETEC による集団下痢症の推定原因として多いものは旅行先（国内）での食事、集団給食、井戸水・飲料水、仕出し弁当、旅行先（海外）での食事等であった。旅行先での食事の中には、飲料水が疑われた事例もあることから、飲料水が ETEC による下痢症と関連する事例の多いことが推定された。海外旅行先での食事が原因と推定された事例は、2000 年以降 4 事例発生している。そのうち 3 事例は患者から複数血清型・毒素型が検出された事例であった。

東京都で実施した海外旅行者下痢

症患者からの病原菌検出状況をみると、患者の約 60% から病原菌が検出され、そのうち ETEC が最も多く検出されている（陽性率約 38%）。更に、海外旅行者下痢症患者からは、複数の病原菌が検出されることが多いことから、日本で発生した集団下痢症も海外の影響を受けているものと推定された。

#### E. 結論

1966 年から 2005 年に発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症事例 245 事例について、大腸菌のカテゴリ別発生状況をまとめた結果、ETEC (47.3%), EPEC (12.2%), EHEC (8.2%), EIEC (1.2%) の順に多く、近年は ETEC が主流、次いで EHEC によるものであった。

ETEC の主な原因血清型は O6, O169, O27, O148, O159, O25 等であった。血清型および毒素型は、年代によって流行が認められた。すなわち、O6, O27, O148 は、いずれの年代でも発生が認められるが、O25 および O169 は 90 年代以降多く分離されている。

ETEC による集団下痢症事例の推定原因食品についてまとめた結果、飲料水の関与が疑われる事例が多く、また、近年では仕出し弁当が原因である事例や海外旅行中の食事が原因とされる事例の割合が増加してきている。

#### F. 健康危機情報

ETEC による集団下痢症が多く発生し

ている。原因としては、飲料水の関与が疑われるものが多い。また、近年では仕出し弁当が原因である事例が増加してきており、その対策が必要である。

#### G. 研究発表

(学会発表)

1) Noriko K., Hiromi O., Yukako S., Naoto I., Chie M., Akiko N., Kazuyoshi Y., Shigeru M., Sumio Y., Akmei K., Satoshi M., and Yasuo K., Epidemiological and bacteriological aspects on gastroenteritis outbreaks occurred by *Escherichia coli* in Tokyo. 40<sup>th</sup> U.S-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, 2005, Boston

2)小西典子, 尾畑浩魅, 下島優香子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖. 東京都における腸管出血性大腸菌による感染症・食中毒菌の発生状況と感染源追求. 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, 2005, 岩手

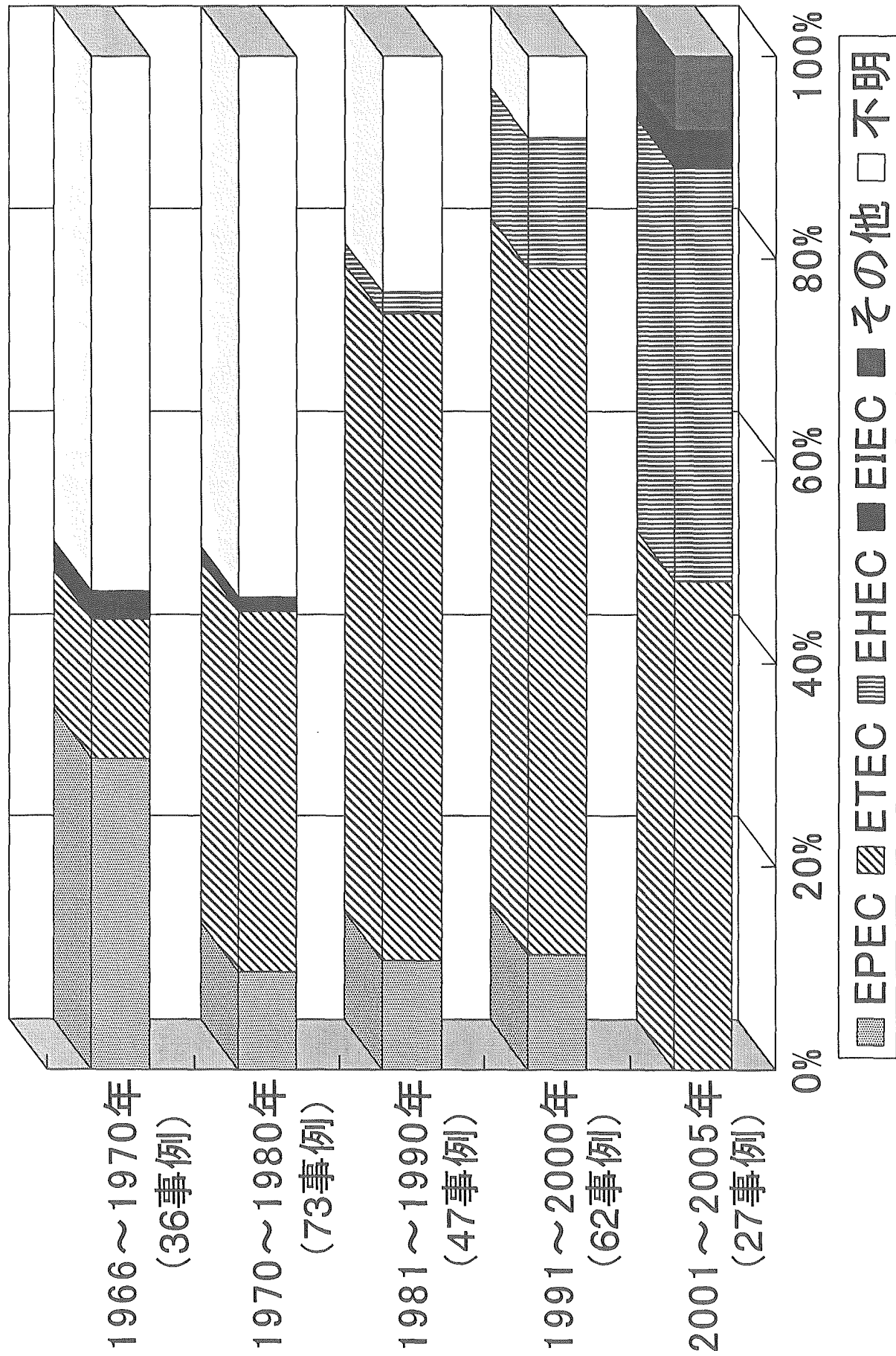


図1. 東京都内で発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症事例

表1 毒素原性大腸菌による集団下痢症の原因血清型：  
1966年－2005年，東京都

血清型	毒素型	検出数
O6:H16	LT+ST	30 (21.1%)
O6:NM	LT+ST	4 (2.8%)
O169:H41	ST	19 (13.4%)
O169:NM	ST	9 (6.3%)
O148:H28	ST	17 (12.0%)
O27:H7	ST	16 (11.3%)
O27:H20	ST	6 (4.2%)
O25:NM	ST	8 (5.6%)
O159:H20	ST	6 (4.2%)
O159:NM	ST	2 (1.4%)
O25:NM	LT	4 (2.8%)
その他		21 (14.8%)
合計		142

EHECによる集団事例総数 116事例，  
1事例から複数血清型が検出された事例もあるので，総事例数とは一致しない

表2 集団下痢症の原因となった毒素原性大腸菌の  
主な血清群の推移

血清群 産生毒素	O6 LT+ST	O27 ST	O148 ST	O159 ST	O25 LT	O25 ST	O169 ST
1966～1970年	—	4	—	—	—	—	—
1971～1980年	11	6	2	7	—	—	—
1981～1990年	15	6	8	1	—	—	—
1991～2000年	6	3	5	—	3	4	21
2001～2004年	2	3	2	—	1	4	7
計	34	22	17	8	4	8	28



表3 複数血清型が検出された毒素原性大腸菌による集団下痢症事例

No.	発生年	患者数	原因食品	旅行先	検出血清群数	検出血清群								
						O6	O148	O27	O159	O25	O169	その他		
1	1979	19	旅館の食事	香川県	2	●								
2	1982	23	不明(旅行の食事?)	神奈川県	6	●	●						●	
3	1985	都内54	旅館の食事	神奈川県	2	●			●					
4	1990	129	ホテルの食事	千葉県	2	●	●							
5	1992	391	旅館の食事	群馬県	2	●		●						
6	1992	385	旅館の食事	福島県	2	●							●	
7	1999	342	事業所の給食		7	●	●	●			●		●	
8	2001	107	旅行中の食事	中国	4	●							●	
9	2001	219	飲料水		2				●			●		
10	2002	不明	旅行中の食事	上海	4	●						●	●	●
11	2003	都内130	仕出し弁当		6		●	●				●	●	●
12	2004	不明	旅行中の食事	上海	4			●				●	●	●

表4 毒素原性大腸菌による集団下痢症の推定原因食品

原因食品	事例数			
	1966— 1970年	1971— 1980年	1981— 1990年	1991— 2000年 2001— 2004年
集団給食	2 (40.0%)	3 (11.5%)	3 (10.0%)	7 (16.7%)
仕出し弁当	—	—	2	9 (21.4%)
寮の食事	—	1	—	1
家庭の食事	—	1	—	—
飲食店の食事	—	4 (15.4%)	4 (13.3%)	4
井戸水・飲料水	2 (40.0%)	7 (26.9%)	1	—
旅行中の食事：国内	—	4 (15.4%)	11 (36.7%)	7 (16.7%)
旅行中の食事：海外	—	—	—	—
不明	1 (20.0%)	6 (23.0)	9 (30.0%)	14 (33.3%)
合計	5	26	30	42

表5 希なタイプの大腸菌による集団下痢症事例：1966年～2005年

No.	発生年月	患者数	発生場所	原因食品	原因菌	血清型
1	1970. 10	4	家庭	串団子*	EIEC	O136:NM
2	1980. 4	17	福祉施設	不明 (感染症?)	EIEC	O28:NM
3	2005. 5	151	小学校	仕出し弁当	EIEC	O164:NM
-----						
4	2002. 7	176	わさび園	旅行先の食事 (氷?)	EAggEC	O144:H16, O78:H21他
5	2003. 5	259	事業所	仕出し弁当	<i>astA</i> 単独保有 大腸菌**	O71, O45, OUT

\* 使用水(井戸水)から同菌を検出

\*\* 患者の24.7%から*astA*単独保有株を検出

課題名： 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染合併症 (HUS) 発症機序解析

分担研究者 喜多 英二 (所属： 奈良県立医科大学細菌学)

協力研究者 岡山 明子、東 伸山岳、(奈良県立医科大学細菌学)

#### 研究要旨：

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染合併症 (HUS) の発症リスクは年齢や栄養状態など個体差が大きい。低蛋白栄養マウスや内毒素高感受性マウスが STEC 感染に高い感受性を示すことから、志賀毒素に対する標的細胞の感受性と膜脂質量との関係を検討し、以下の事実を確認した。

- 1) 低蛋白飼育マウス (PCM) において、志賀毒素 (Stx) 産生性大腸菌 (STEC) O157:H7 経口感染後 3 ~ 4 日以内に、3 型、4 型 phosphodiesterase 阻害剤 (PDEI) (各 7.5 mg/kg/day) を 1 日 2 回 (1 2 時間間隔) 腹腔内へ 3 日間連続投与することで、感染マウスの腸管上皮組織及び血中炎症性サイトカイン量・毒素量が低下し、感染マウスは神経障害を併発することなく、85%以上の生存率が得られた。
- 2) 両 PDEI は *in vitro* において、2.5 µg/ml 以上の濃度でヒト血管内皮細胞膜からのコレステロール遊離抑制作用 (35~67%減量) をしめした。この抑制作用は、コレステロールの細胞外遊離を担う ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1) 蛋白の発現抑制と相関していた。
- 3) 標識 Stx を用いた解析から、両 PDEI 処理ヒト血管内皮細胞膜への有意な Stx 結合の低下を認めなかった。しかし、内皮細胞内への internalization の有意な抑制が認められた。
- 4) ヒト血管内皮細胞膜から分離した lipid raft 分画には、ABCA1 蛋白は存在せず、non-raft 中に存在しており、PDEI 処理により lipid-raft と non-raft 間の脂質量の平衡化が障害されることが、Stx に対する感受性の差を生み出すと考えられた。

#### A. 研究目的

既に、低蛋白食飼育マウス (PCM) や内毒素高感受性マウス ( $\beta$ 2KO) が、志賀毒素 (Stx) 産生性大腸菌 (STEC) 経口感染に高い感受性をしめし、脳症を伴って死亡することを確認してい

る。しかし、これら両マウスの精製 Stx 単独投与に対する感受性には、正常野生型マウスとの間で有意の差を認めない。さらに、ホスフォジエステラーゼ阻害剤 (PDEI) が、これらのマウスの