

図1 クロモアガーO157での各血清群コロニーの発色性および生育性

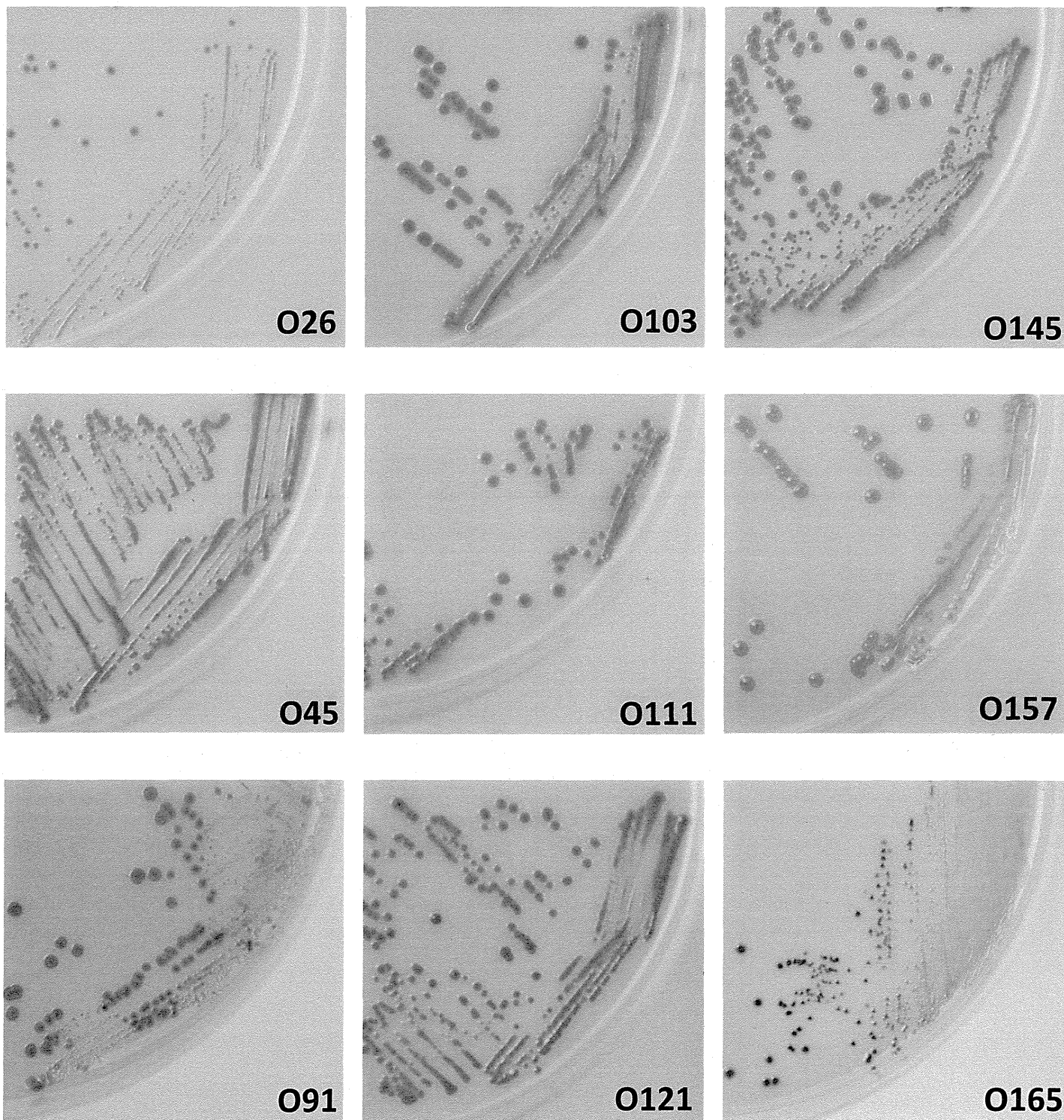


図2 クロモアガーO26/O157での各血清群コロニーの発色性および生育性



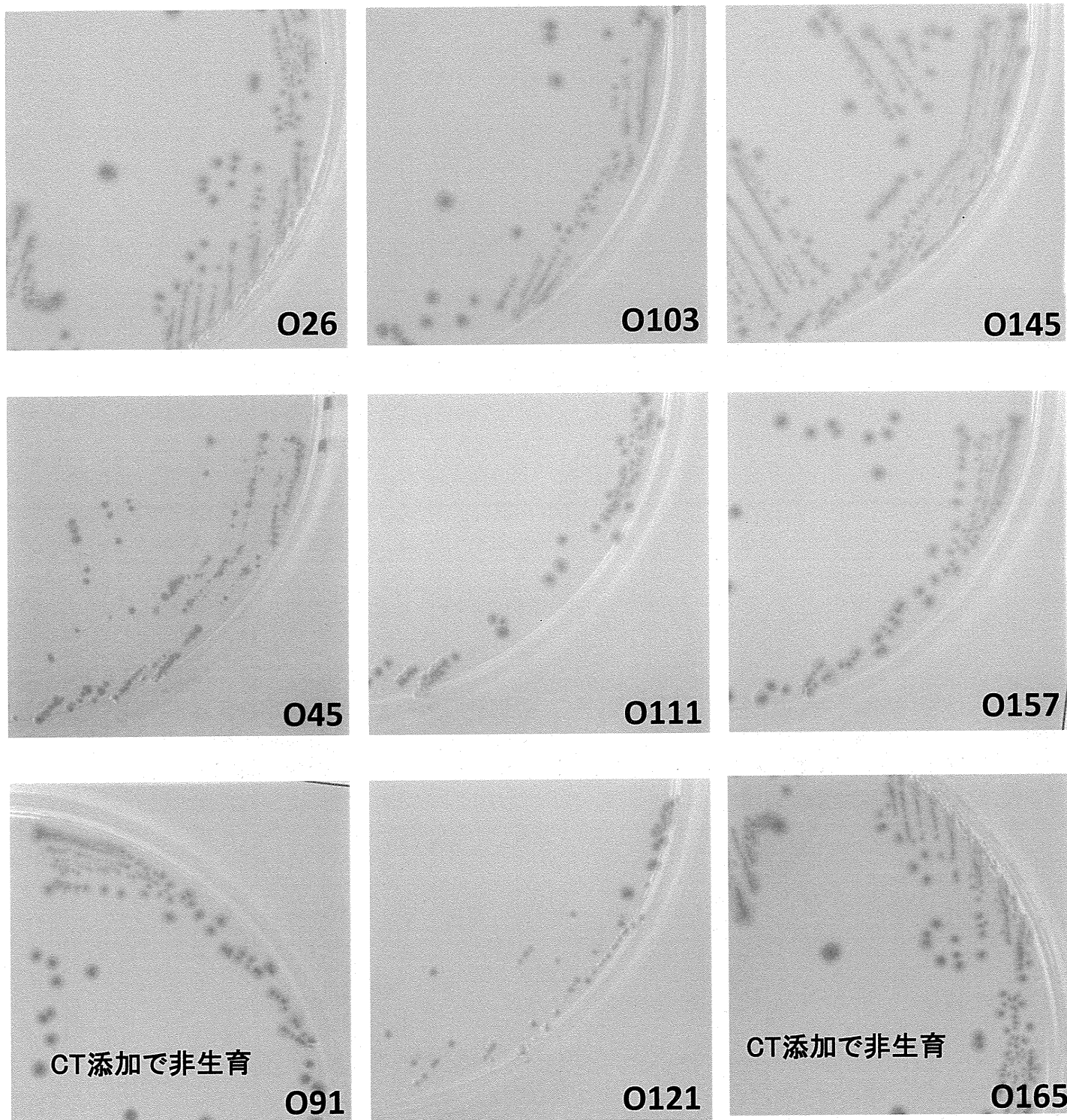


図3 クロモアガー-STECでの各血清群コロニーの発色性および生育性

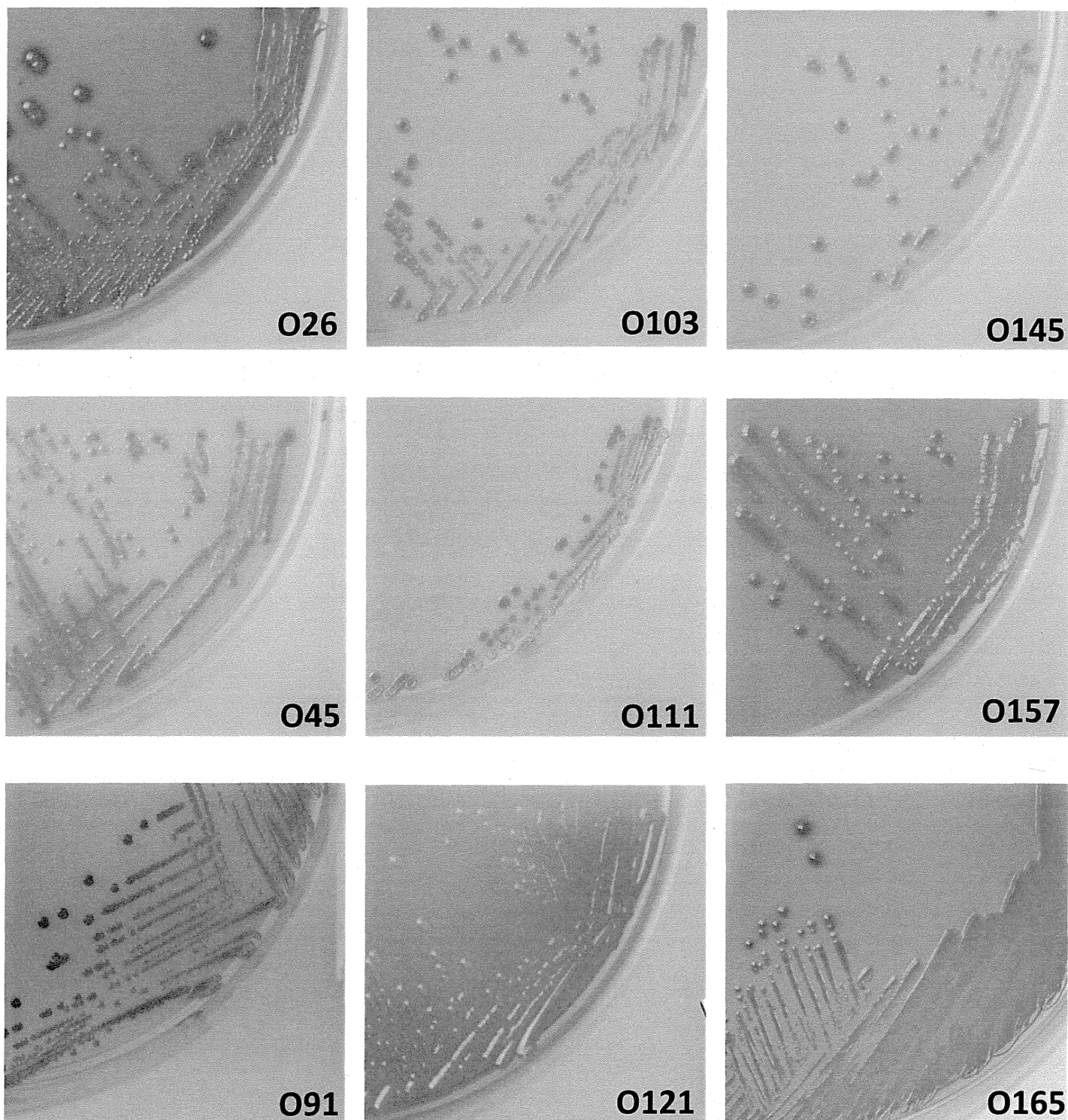


図4 Vi RXO26での各血清群コロニーの発色性および生育性



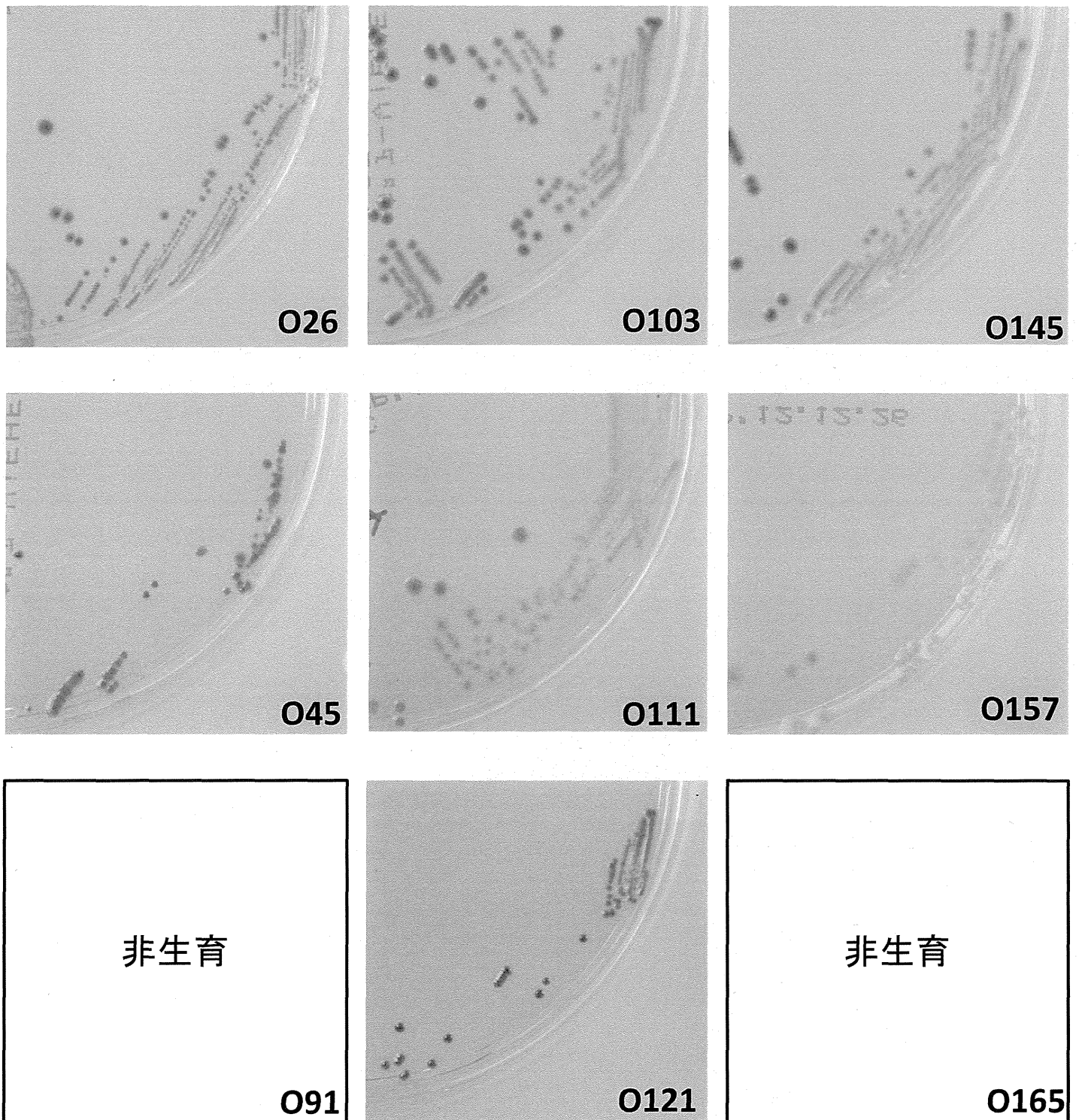


図5 Vi EHECでの各血清群コロニーの発色性および生育性

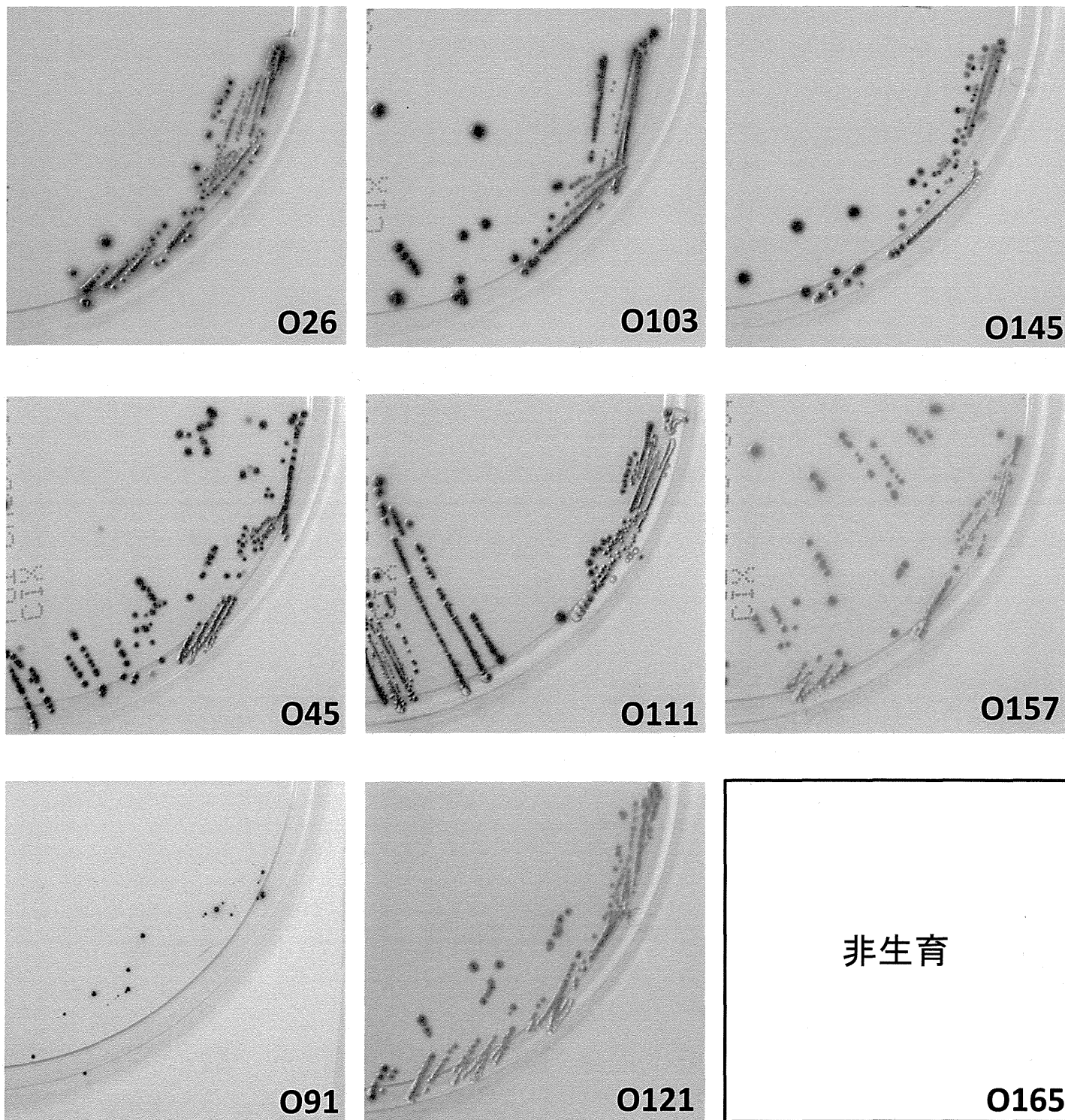


図6 CIXでの各血清群コロニーの発色性および生育性



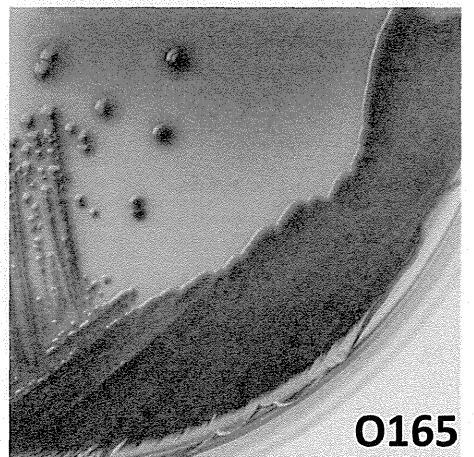
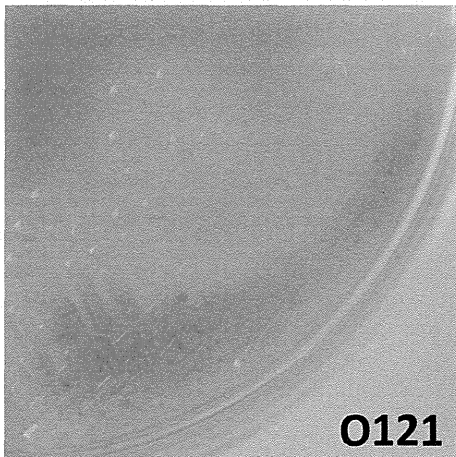
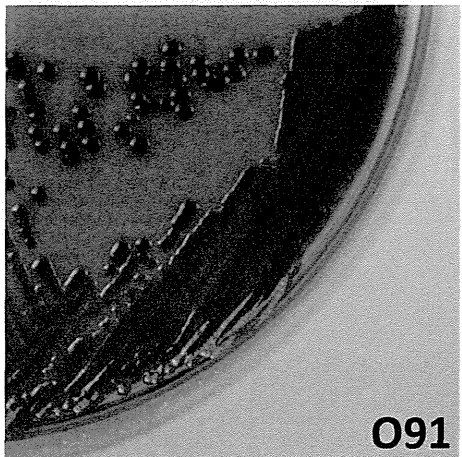
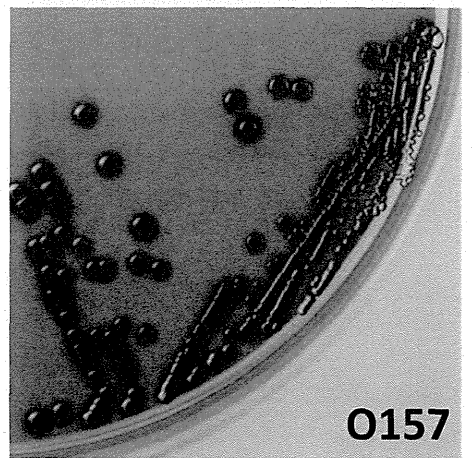
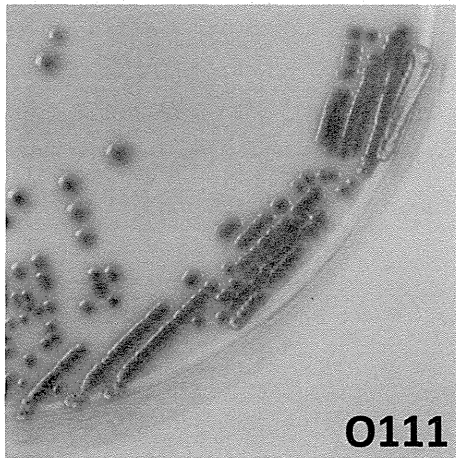
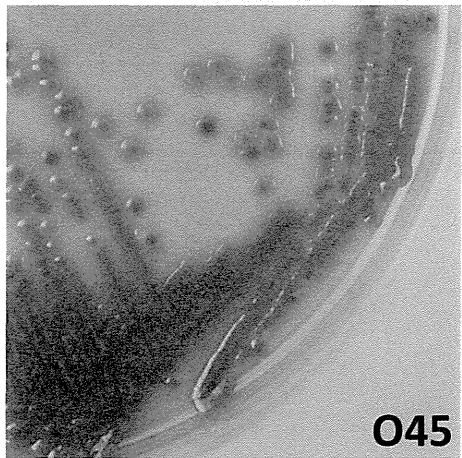
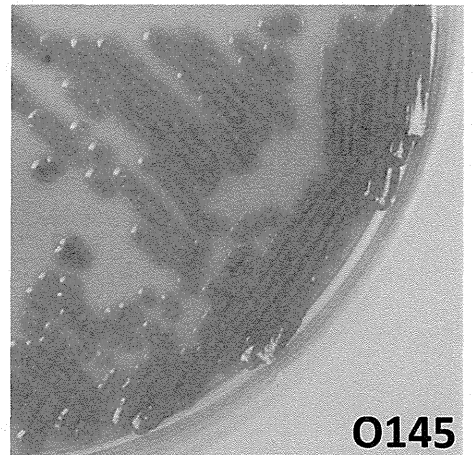
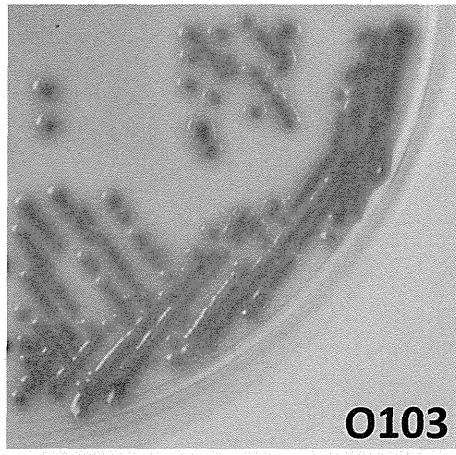
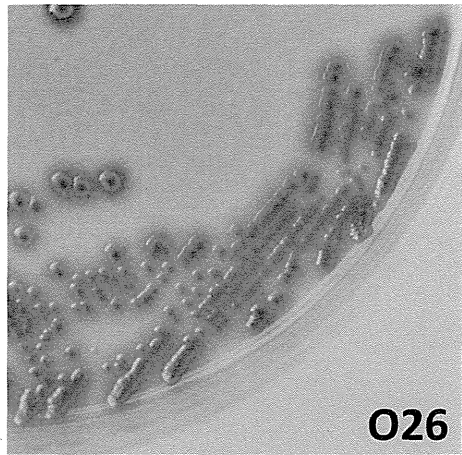


図7 BCMO157での各血清群コロニーの発色性および生育性

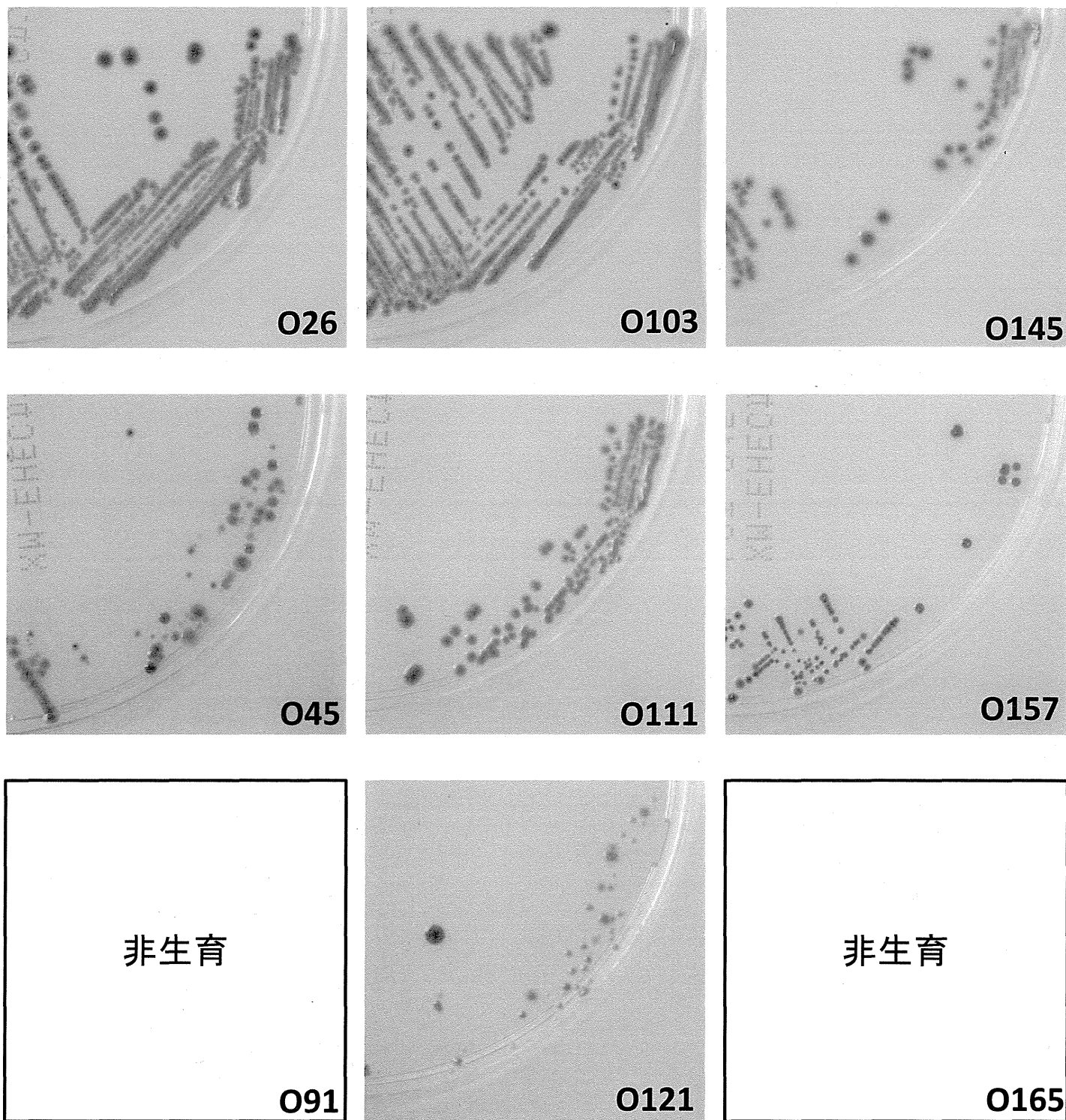


図8 XM-EHECでの各血清群コロニーの発色性および生育性



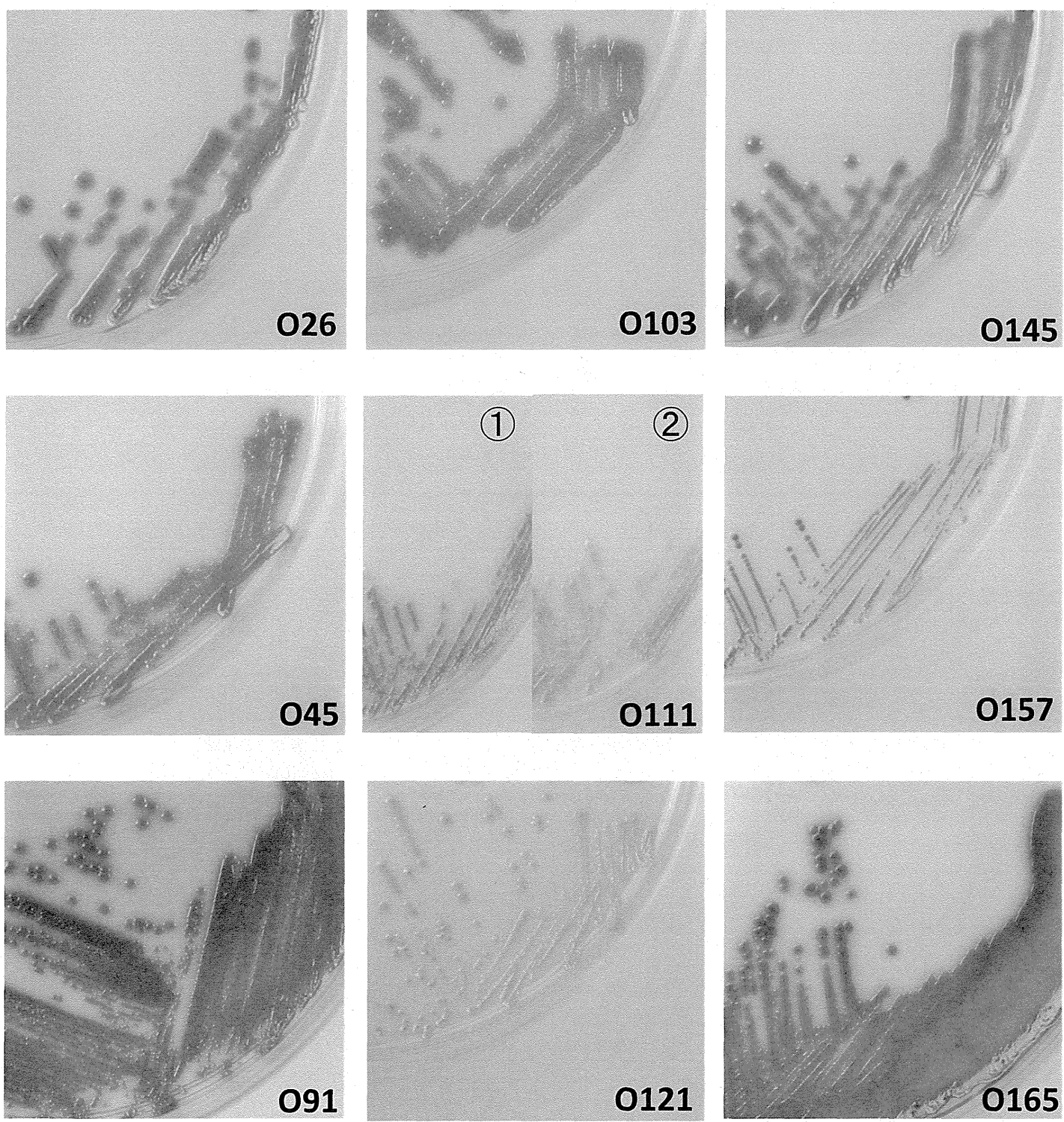


図9 レインボーアガーでの各血清群コロニーの発色性および生育性

表1 供試した酵素基質培地

培地名	製造者 (国)	製品対象血清群の発色その他の細菌の発色など	製品
クロモアガー0157培地	クロモアガー社 (フランス)	0157 (藤)	他の大腸菌 (青)
クロモアガー026/0157培地	クロモアガー社 (フランス)	026 (緑) 0157 (赤)	他の大腸菌 (赤紫～紫)
クロモアガーSTEC培地	クロモアガー社 (フランス)	0111 (藤)	026、0157、0121などの一部血清群の大腸菌も藤色
Vi RX026寒天培地	栄研化学 (国内)	026 (青紫～黒)	他の大腸菌 (黄緑～青緑) 大腸菌以外の腸内細菌 (緑、黄、赤) 腸内細菌以外の菌 (非発育)
Vi EHEC寒天培地	栄研化学 (国内)	0111 (えんじ) 026 (緑) 0157 (無色透明で中心部 褐色)	生培地
CIX寒天培地	極東製薬 (国内)	0111 (群青～濃紫) 026 (群青～濃紫) 0157 (青～青緑)	生培地
BCM0157寒天培地	栄研化学 (国内)	0157 (黒～濃緑)	粉末、生培地
XM-EHEC寒天培地	日水製薬 (国内)	0111 (白濁した赤紫～紫) 026 (青紫) 0157 (赤紫～紫)	生培地
レインボーアガー0157	バイオログ社 (米国)	0157 (黒～灰)	粉末



表2 各血清群の酵素基質培地状でのコロニーの発色性と生育性の概要

培地	血 清 群											
	0157	026	0111	0103	0121	0145	045	0165	091	063	08*	0151*
クロモアガー-0157	藤	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	藤
クロモアガー-026/0157	赤	緑	赤紫	赤紫	紫	赤紫	紫	紫	赤紫	赤紫	紫	濃ピンク
クロモアガー-STEC	藤	藤	藤	藤	藤	藤	藤	藤	藤	藤	藤	藤
Vi RX 026	緑	紺	緑	緑	白	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑
Vi EHEC	無色	緑	えんじ	緑か紫	緑	紫	紫	非生育	非生育	非生育	非生育	えんじ
CIX	青緑	濃紫	濃紫	濃紫	ピンク	濃紫	濃紫	非生育	濃紫	濃紫か緑 か非生育	非生育	緑
BCM	紺	緑	緑	緑	白	緑	緑	緑	紺	緑	緑	緑
XM-EHEC	赤紫	青紫	赤紫	青紫	青	青	複数色	非生育	非生育	非生育	非生育	赤紫
レインボーアガー	灰	赤紫	灰	赤紫	藤	赤紫	赤紫	赤紫	赤紫	赤紫	白	白
CTクロモアガー-STEC	藤	藤	藤	藤	藤	藤	藤	非生育	非生育	非生育	非生育	藤
選択剤に比較的感受性の高い株数	0/10	1/10	0/10	1/9	0/2	0/8	1/2	2/2	4/4	1/1	2/2	0/1

\* VT陰性株

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌の分布および病原性解析

西川 禎一



平成24年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究  
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

### 分担研究報告書

#### 病原大腸菌の分布および病原性解析

研究分担者 西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

#### 研究要旨

マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニングと、スクリーニングで陽性と判定された検体から DEC を的確に釣菌分離する HGMF-CH 法の併用が、ヒト、家畜、食肉等から各種 DEC を網羅的に検出する上で実用に耐えうるか否か、由来の異なる 1148 検体を用いて検証を試みた。その結果、PCR 陽性となった検体の 66~44% から DEC の分離に成功し、DEC を網羅的に検出するうえで両手法の有用性が実証された。ウシが腸管出血性大腸菌や腸管病原性大腸菌を保菌する率は極めて高く、これらの汚染源として重要な役割を果たしていることが示唆された。家畜が腸管病原性大腸菌(EPEC)の汚染源となっている可能性を検証するため、由来の異なる 159 株について、系統発生群別、病原性プロファイル、インチミン型別および付着性試験を実施した。その結果、患者株の 50%、ウシ由来株の 79% が系統発生 B1 群に分類されたのに対し健康者とブタ由来株では各々 16% と 23% であった。B1 群にはインチミン  $\beta$ 1 型が多く、ウシと患者由来株の 26% および 25% を占めた。A<sub>1</sub>set の病原性プロファイルを適用した場合も、Ia 型がウシと患者由来株に多く、これら分子疫学的解析は、患者由来株がウシに由来することを支持している。腸管毒素原性大腸菌についてはブタが比較的高い保菌率を示したが、これらがヒトの汚染源となり得るのか否か現時点では不明である。腸管侵入性大腸菌は全く検出されず、そのリスクは極めて低いと考える。しかし、腸管凝集接着性大腸菌は低率ながら健康者から検出されており、これらの菌が人から人へ循環していることが示唆される。

#### 研究協力者

王 麗麗

大阪市立大学大学院

生活科学研究科後期博士課程

長谷 篤、小笠原準、中村寛海

大阪市立環境科学研究所

前原智史  
木太雅俊  
藤原佐美

大阪市中心卸売市場食品衛生検査所  
大阪市食肉衛生検査所  
(独) 国立病院機構 大阪南医療センター

## A. 目的

大腸菌(*Escherichia coli*) は、恒温動物の腸内に広く分布しており、ヒトにおいても出生と同時に腸管内へと急速に広がり常在菌として定着する(1)。しかしながら、大腸菌の一部には特殊な病原因子によって人に下痢症を起こすものがあり、行政的には病原大腸菌、学術的には下痢原性大腸菌 (Diarrheagenic *E. coli*, 以後 DEC と略す) と呼ばれる。

DEC は、その病原機構に基づいて①腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC), ②腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), ③志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC), ④腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 以上4群に長らく大別されてきたが、2012年1月からは⑤腸管凝集接着性大腸菌 (Enteroadgregative *E. coli*, EAEC), も DEC に認定された。他にも分散接着性大腸菌 (Diffusely adherent *E. coli*, DAEC), 細胞膨化致死毒素産生性大腸菌 (CTEC), 腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素 (EAST1) 遺伝子保有大腸菌 (EAST1EC), 細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) など、新たな DEC の候補とされるサブグループが複数存在する。

食中毒事件の調査に際しては、これら

すべてを調査対象に含めることが望ましいとされるが、DEC と常在大腸菌を識別することは極めて難しく、培養法を中心とする日常的な検査業務では看過されがちである。我々は、これら DEC の多くを網羅的に検出する方法として、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニング手法(2)と、スクリーニングで陽性と判定された検体から DEC を的確に釣菌分離する手法として疎水性格子膜 (HGMP) を用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法 (HGMP-CH 法) を開発した(3)。

本研究は、上記の手法を用いてヒト、家畜、食肉等から各種病原大腸菌の網羅的検出を試み、高効率に病原大腸菌を検出分離できるか否か実際の検体を用いて検証すること、および調査結果に基づいて DEC の汚染源を推定することを目的とする。

## B. 方法

### 1. 供試検体

本調査研究に先立って大阪市内の食品店から購入、あるいは大阪市中心卸売市場食品衛生検査所から提供されていた各種食品検体 333 件、大阪市食肉衛生検査所から提供された家畜糞便 227 検体 (ウシ 109 頭、ブタ 118 匹)、および大阪市立



環境科学研究所から提供された健康者便 119 検体, さらに本調査研究に伴って平成 24 年度に国立病院機構大阪南医療センターから搬入された下痢症患者便 256 検体, 大阪市立環境科学研究所から提出された健康者便 213 検体, 総計 1148 検体を検査に供した.

## 2. 増菌培養法

BGLB ブイヨンあるいは EC ブイヨンで増菌された後に提供された検体も調査の対象として加えたが, 食品の増菌培養には基本的に FDA の二段培養法を用い, 以下の手順で実施した.

滅菌ストマフィルター(GSIクレオス, 東京)に検体を無菌的に約 10 g とり, システム・ダイリユーター (GSIクレオス)を用いて BHI を 10 倍希釈量加えた. マスティケーター (GSIクレオス)を用いて 90 秒間よく混和させ, 37°C 3 時間静置した. 培養後, フィルターを通して残渣を除きながら別の滅菌ストマフィルター (GSIクレオス)に移し, 再びシステム・ダイリユーターを用いて等量のトリプトン・フォスフェート・ブイヨンを加え, 混和させてから 44°C の水浴で 20 時間培養した. 培養後のサンプル液は, トリコロール寒天平板に画線塗抹し, 37°C 一晚培養して大腸菌および大腸菌群の有無を調べた.

糞便検体はブレインハートインヒュージョン・ブイヨンに接種して 42°C で 20 時間増菌培養したものを試料とした.

## 3. DNA 抽出

増菌済みの培養液から菌体を回収, PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation kit (Gentra Systems, Minnesota, USA)を用いて以下の手順で DNA を抽出した.

1) 500 $\mu$ l の菌懸濁液 (TSB, 37°C 18 時間培養, 約 109cfu/ml) を 1.5ml マイクロチューブにとり, 15,000 $\times$ g で 5 分間遠心し, 上清を取り除いた.

2) 300 $\mu$ l の Cell Lysis Solution を加え, ピペッティングして沈殿とよく混合し 80°C 5 分インキュベートした.

3) さらに, ときどき転倒混和しながら 37°C で 30 分インキュベートした. 1 分間氷上に置き室温に戻し, 軽く遠心して壁に付着した試薬等を落とす.

4) 100 $\mu$ l の Protein Precipitation Solution を加え, ボルテックスでハイスピード 20 秒間激しく混和した.

5) タンパク質の沈殿を強固なペレットにするため, 15,000 $\times$ g で 4 分間遠心した.

6) 上清を 300 $\mu$ l の 100%イソプロパノール(2-Propanol; 和光純薬工業)が入った新しい 1.5ml チューブに移し, 穏やかに 50 回転倒混和した.

7) 15,000 $\times$ g で 1 分間遠心し, ペーパーの上に上清を捨て, 300 $\mu$ l の 70%エタノール(v/v)を加えて数回転倒させ DNA を洗浄した.

8) さらに 15,000 $\times$ g で 1 分間遠心し, エタノールを注意深く捨て, ペーパーの上にチューブを伏せてペレットを乾燥し

た。

9) 50 $\mu$ l の DNA Hydration Solution を加え、65°C 1 分間インキュベートまたは室温で一晩静置し、途中数回タッピングを行った。DNA は -20°C で保存した。

10 target enterovirulence genes (eae, stx1, stx2, elt, est for STh, est for STp, virB, aggR, astA, and afaB) using our multiplex real-time PCR method (2)

#### 4. リアルタイム PCR によるスクリーニング

リアルタイム PCR は stx (Stx1・Stx2)・eae トリプレックス、stx1・stx2 デュプレックス、est (STp・STh)・elt トリプレックス、est (STp)・est (STh) デュプレックス、aggR・astA デュプレックス、virB・afaB デュプレックスの組み合わせで行なった。リアルタイム PCR で使用した afaB プライマーおよびプローブは、Afa/Dr+ の DAEC が持つ afaB のみを標的とする。

単一のプライマーを使用する際は Realtime PCR Master Mix (東洋紡) を、マルチプレックスの場合は QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を使用した。用いたプライマーやプローブの詳細は先に報告したとおりである(2)。

PCR 反応液は 96 ウェルプレート (B-96-AB-RT; イナ・オプティカ, 大阪) に分注し、テンプレート DNA 2 $\mu$ l を添加した。プレートは ThermalSeal RT film

(50 $\mu$ m - thick ; EXCEL Scientific, California, USA) でシールし、Optical Adhesive Cover (ABI) で覆った。PCR 条件は、Realtime PCR Master Mix (東洋紡) の場合は、95°C 1 分の熱変性ステップの後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 40 サイクル行い、QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen GmbH) の場合は、始めの熱変性を 95°C 15 分行い、95°C 1 分、60°C 1 分を 40 サイクル行った。

リアルタイム PCR 装置は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (ABI) を使用し、添付のプロトコールに従い PCR およびデータ解析を行なった。

#### 5. HGMF-CH 法

リアルタイム PCR によるスクリーニングによって DEC 陽性と判定された増菌培養液には先に報告済みの HGMF-CH 法 (3) を適用し DEC の分離を試みた。

1) HGMF Spreadfilter (Filtaflex Ltd., Almonte, Canada) にセットした Iso-Grid HGMF (QA Lifesciences Inc., San Diego, CA, USA) 上に PCR で陽性と判定された増菌培養液 1 ml を載せ、全面に広げ、その後 HGMF Spreadfilter を用いてろ過した。HGMF をマッコンキー寒天培地もしくはトリプトソーヤ寒天培地上に置き 37°C で一夜培養した。

2) 培養後の HGMF を原本とし、生じたコロニーを Microbial Colony Replicator (Filtaflex Ltd.) を用いて新しい HGMF に必要枚数転写し培養することでコピーを作製した。

3) 前処理液 (5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 [pH 6.0], 100 mM 重炭酸ナトリウム, 0.0066% ポリエチレンイミン) を含ませたワットマン 3MM ろ紙(GEヘルスケア, 東京) の上に複製培養した HGMF を置き, 室温で 30 分反応させた.

4) 余剰の液を除き 10 分間乾燥させてから, 溶菌液(70% エタノール水溶液に水酸化ナトリウムを 150 mM 溶解)を HGMF 1 枚あたり 3 ml 含ませたワットマンろ紙上に置き, 電子レンジで 30 秒間加熱した.

5) 加熱処理後の HGMF を Proteinase-K (和光純薬) を 0.01% , SDS を 0.1% 加えた 20 ml の 2×SSC に浸し最低 1 時間 37°C の温浴中で反応させた. その後, 0.1% SDS 加 2×SSC で 5 分間洗浄, さらに 2×SSC (50 ml/HGMF) で 5 分間洗浄した. キムワイプで HGMF を拭い, 分解された菌体の残渣を除去した.

6) HGMF をペーパータオル上に置き 30 分間自然乾燥させた. その後, クロスリンカーを用いて 120 mJ の UV 照射により DNA を HGMF に固定した.

7) 非特異的な反応を抑えるためにハイブリダイゼーション・バッグ(Roche Diagnostics)に HGMF と 6 ml DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) を入れ, 39°C で 1 時間 振盪してから, 10  $\mu$ l の DIG-probe を加えた新しい DIG Easy Hyb 6 ml に置換した. その後, 39°C で 24 時間振盪した.

8) DIG-probe の結合を可視化するた

めに DIG Wash and Block Buffer Set で HGMF を処理した. その後, 抗 DIG 抗体溶液と, BCIP (375  $\mu$ g/ml) および NBT (188  $\mu$ g/ml) を溶かした検出液(Roche Diagnostics) を用いて酵素抗体法の原理に基づき発色させた.

9) HGMF 上の 1600 の升目の中で, 抗 DIG 抗体に反応して発色した枡を調べ, これに該当する HGMF 原本上の枡のコロニーをマッコンキーに画線培養し, 生じたコロニーを釣菌して純培養を得た. これを再度 PCR して目的の遺伝子を保有しているかどうか確認した.

## 6. 分子疫学

分離された EPEC について, 以下の 3 種の手法を用いて分子疫学的指標とした.

1) 系統発生群: Clermont らの方法(4)に従って, 供試菌株は A, B1, B2, D の 4 系統群に分類された.

2) 病原性プロフィール: Afset らの方法(5)に準じ, OI-122 の遺伝子 (*efa1* [*lifA*], *set* [*ent*], *nleB*, and *nleE*) とその他 (*lpfA*, *ehxA*, *ureD*, *paa*, *yjaA*, *ibeA*, *b1121*, *astA*), 計 12 の病原遺伝子あるいはマーカーについてその有無を PCR 法により調べた.

3) インチミン遺伝子の型別: Blanco らの方法(6)に基づいて, 供試菌株のインチミン遺伝子(*eae*)を 17 組のプライマーを用いて遺伝子増幅し型別した( $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\beta$  1,  $\xi$  R/ $\beta$  2B,  $\delta$ / $\kappa$ / $\beta$  2O,  $\gamma$  1,  $\theta$ / $\gamma$  2,  $\epsilon$  1,  $\nu$  R/ $\epsilon$  2,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$  1,  $\mu$  R/ $\iota$  2,  $\lambda$ ,  $\mu$  B,  $\nu$  B and  $\xi$  B).



## 7. 統計

カイ二乗検定またはフィッシャーの直接格率計算法とイエーツの補正により検定した。

## C. 結果

### 1. DEC 遺伝子の検出率

食品 333 検体, 家畜便 227 検体, 健康者便 119 検体についてマルチプレックス・リアルタイム PCR 法による DEC のための網羅的スクリーニングを実施した (表 1)。その結果, EPEC のインチミン遺伝子 (*eae*) 陽性検体がもっとも多く, 特に家畜においては 67% の陽性率であった。次いで志賀毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*) 陽性検体が多く, ウシでは 46% に達した。ETEC のエンテロトキシン遺伝子 (*elt*, *est*) が検出される率は高くなかったが, ブタにおいては他の検体に比べて高い傾向があった。EAEC の指標とされる *aggR* は検出率の最も低い遺伝子であったが, その中ではヒトの陽性率が他の検体に比べて高い傾向を示した。

### 2. HGMF-CH 法による DEC の分離

リアルタイム PCR で DEC の遺伝子が検出された増菌サンプル 300 検体について, 従来法と HGMF-CH 法による菌の分離を試みた。その結果, 従来法では陽性検体の 11% から菌が分離されるにとどまったのに対し, HGMF-CH 法では 5 倍以上の 56% から分離に成功した (表 2)。先に報告したように, リアルタイム PCR によるスクリーニング時に, 増菌培養液中

の DEC 菌数が低いと判明している検体については従来法による分離の成功率は著しく低下する (3)。しかしながら, HGMF-CH 法では STEC や ETEC などによる低濃度汚染検体についても比較的高い分離成功率を示した。

ETEC は, これまでも多くの集団発生を起こしてきた重要な食中毒原因菌であるが, 今回の検出数は EPEC や STEC に比べて分離数が少なかった。そこで, 健康者便 213 検体, 患者便 256 検体を追加し, ETEC の検索を試みたが, 健康者の PCR スクリーニングで ETEC 陽性が疑われた検体は皆無であった。しかしながら, 患者については ST 遺伝子と LT 遺伝子両方陽性が 2 検体, LT のみ陽性が 1 検体検出され, それぞれから菌を分離できた。

### 3. EPEC の分子疫学

系統発生群別を実施した結果, 患者由来株と健康者由来株間で有意な差を認めた (表 3,  $p=0.013$ )。B1 群は健康者よりも患者に由来する株で有意に多かった (50%,  $p=0.01$ )。また, ウシ由来株では B1 群が 79% に達し, ブタ由来株で 23%, 健康者由来株で 16%, 食品由来株で 15% であったのに比べ, いずれに対しても有意に高かった ( $p<0.001$ )。一方, A 群はブタ由来株の 54% を占め, ウシ由来株で 14% ( $p<0.001$ ), 患者由来株で 6% ( $p<0.001$ ), 健康者由来株で 19% ( $p<0.0015$ ) であったのと比べて有意に高かった。B2 群は健康者由来株の 54% に達し, 患者 (19%,  $p<0.05$ ), 食品 (15%,

$p < 0.01$ ), 家畜(9%,  $p < 0.001$ )と比べて有意に高い率を占めた. ウシ由来株に B2 群は検出されず, 家畜の中ではブタ由来株のみに見られた(19%,  $p < 0.01$ ).

Afset らの病原性プロフィールに準じて型別した結果, Ia と Ib 型はブタよりもウシ由来株で有意に多く検出された(表 4). 同様に Ia 型は健康者よりも患者由来株で有意に多かった. II 型と型別不定株はブタ由来株で有意に多く, 25 株がいずれの型にも該当しなかった. I 型の 18 株のうち 11 株(61%) は系統発生 B1 群であり, Ib 型の 67 株中 52 株(78%)も B1 群であった.

インチミン型別によりウシ, ブタ, 食品, 健康者, そして患者由来株はそれぞれが 8, 9, 7, 14, 7 種類の型に分けられた. ヒト由来株は家畜や食品由来株よりもインチミン型が多様性に富み,  $\alpha 2$ ,  $\eta$ ,  $\mu B$  はヒト由来株でのみ検出された. 24 株(15.1%)は, 今回の型別に用いた PCR のいずれとも反応せず, 型別不能であった(表 5).

以上の結果を組み合わせたところ, B1-B1 がウシ由来株の中で最も主要なタイプであり(26%;  $p = 0.0017$ ), 同様に患者由来株でも 25%を占めて健康者由来株に比べてその比率が有意に高かった( $p = 0.025$ ).

#### D. 考察

我々が開発したマルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液

のスクリーニング手法(2)と, スクリーニングで陽性と判定された検体から DEC を的確に釣菌分離する HGMF-CH 法(3)の併用が, ヒト, 家畜, 食肉等から各種 DEC を網羅的に検出する上で実用に耐えうるか否か, 実際の検体を用いて検証を試みた. その結果, PCR 陽性となった検体の 66~44%から DEC の分離に成功した. 両手法の組み合わせによる DEC の網羅的な検出が実際の調査においても有用であることを実証できた.

今回の結果は, マルチプレックス・リアルタイム PCR によるスクリーニングの結果が偽陽性ではなく実態を反映していることを HGMF-CH 法が証明したのもとも理解できる. そこで, PCR 調査結果に基づいて DEC の汚染源の推定を試みた.

従来, DEC は人から人へ感染すると考えられていた(7). しかしながら, ウシなどの反芻獣が STEC を高率に保菌することが腸管出血性大腸菌 O157 などの調査を通じて明らかにされてきた(8,9). 本調査結果は, EPEC についても家畜が高率に保菌することを示している. さらに, ETEC についてもブタからときどき検出された. EPEC と ETEC に関しても家畜が汚染源として重要な役割を果たしている可能性がありそうだ(図 1).

インチミン遺伝子を保有する大腸菌は, EPEC として分類されるが, 近年分離される EPEC は集束線毛

(BFP) や付着に関わる EAF プラスミドを保有しない非定型 EPEC がほとんどである(10). 我々が先に行った調査では, これらの EPEC については患者と健康者の間で分離率に有意な差が出ず, 下痢原性の確証を得られなかった(11). これら非定型 EPEC については全てを病原体扱いする必要はなく, 患者から分離される菌株と同様のグループに分類されるものについて注意して行けばよいと考えられる.

そこで, 食品, 家畜, 健康者, 下痢患者から多数分離された EPEC 株について分子疫学手法による解析を試みた. その結果, 系統発生群 B1, 病原性プロフィール Ia 型, インチミン型  $\beta 1$  と  $\gamma 1$  型の株が患者由来株に多く, ウシ由来株と一致する傾向が示された. 一方, 健康者やブタ由来株は病原性が低いとされる病原性プロフィール II 型に多く見られたが, その系統発生群はブタ由来株が A 群を主としたのに対し, 健康者由来株は B2 群であり異なっていた. また, 健康者由来株のインチミン型は多様性が高く特定の型に偏っていなかった. すなわち, 患者由来株は健康者やブタ由来株とは異なるクラスターに属しており, ウシ由来株と同じクラスターに属していた. 以上の結果は, ヒトに病原性を示す EPEC がウシに由来することを示唆している(12). 一方, 健康者に見られる EPEC 株の多くは, ヒトに下痢原

性を示さない常在菌の一種である可能性もあると考えられる.

本研究で得られた系統発生群分類と病原性プロフィールの結果を中心に推測すると, EPEC の病原性を判定するには先ず PCR 法を用いて遺伝子 *chuA* と *yjaA* および TspE4.C2 配列の有無を調べて系統発生群別し, B1 もしくは D 型と判定された場合は *efa/lifA* 遺伝子の有無を調べて病原性プロフィールが Ia 型に属するかどうかを判定するのが簡略な方法である. すなわち, 3 種の遺伝子と 1 配列の PCR 検索で EPEC の下痢原性判定の確度を改善できるであろうし, これにインチミン遺伝子の型別も追加すれば更に確かな推定が可能になると考えられる.

系統発生分類の D 群に属し, 病原性プロフィール Ia 型の EPEC (志賀毒素遺伝子陰性の血清型 O55 や O157) も患者由来株では高い割合を占めており, これらもウシ由来株から検出されたが, ウシ由来株において占める割合は低い. これらの汚染源がウシとブタ以外にあるのか不明だが, 志賀毒素遺伝子を運ぶファージが脱落した腸管出血性大腸菌 (EHEC that had lost Stx-encoding phages, EHEC-LST) は EPEC と同定されることになるため, これらを混同している可能性もあり, EHEC と共通の O 抗原を有する EPEC については EHEC の病原性マーカーについても今後は合わせて検討する必要があるようだ(13).

EPEC はヒトのみならずブタや