

二種類のカテゴリー（EPEC 及び EAggEC）に属する下痢原性大腸菌の検査法

1 はじめに

ヒトに胃腸炎を起こす大腸菌は、下痢原性大腸菌もしくは行政的には病原大腸菌と呼ばれ、食中毒、散发性下痢症、および輸入下痢症の病因物質として重視されている。下痢原性大腸菌は、病原機序によって、一般的には腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli* : EPEC)、腸管組織侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli*、EIEC)、腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli* : ETEC)、志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli* : STEC)、及び腸管凝集接着性大腸菌 (enteroaggregative *E. coli* : EAggEC または EAEC) のカテゴリーに分類されている。これら5種類のカテゴリーの病原性に関する研究は大いに進歩しているが、検査に関しては、EPEC 及び EAggEC の2種類のカテゴリーは、未だ統一された検査法が示されておらず診断キットも市販されていない。ここでは、一般の検査室では比較的同定の難しいカテゴリーである EPEC と EAggEC の検査の参考に資するために、両カテゴリーの細菌学的知識、疫学情報及び検査法について説明する。

2 EPEC

1) 臨床症状

EPEC の臨床症状は、下痢、腹痛や嘔吐、軽度の発熱などである。時として、粘液便の排泄や大量の水様便による脱水症状を呈する。潜伏期間は多くは12～24時間、治癒期間は一般的に乳幼児では1週間以内、成人は3日以内である。

2) 病原性機序

EPEC は大腸の粘膜よりも小腸粘膜への接着が顕

著であり、その標的器官は小腸であると考えられている。EPEC が小腸粘膜に接着すると微細絨毛が破壊される A/E 障害 (attaching and effacing) を与え下痢が起きる。また、組織培養実験を行なうと、EPEC はヒトの HEp-2 細胞の表面に局在性接着と呼ばれる微小なコロニーを形成する (図1)。

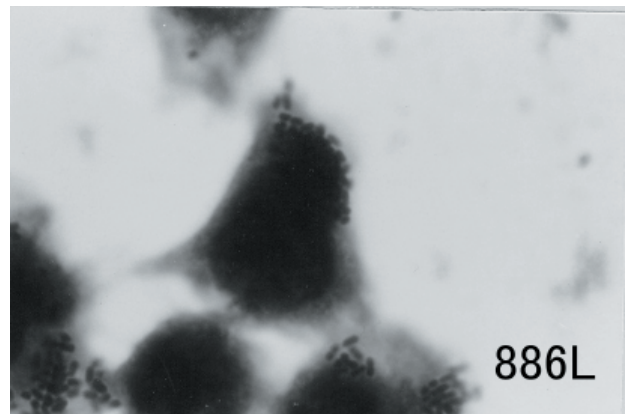


図1 EPEC の局在性接着像 (細胞上に大腸菌が丸く集まって接着している)。拡大倍率 約1,000倍

愛知衛研

小腸での A/E 障害と組織培養での局在性接着は、EPEC の同一の巧みな接着能力により起こる。すなわち、EPEC は菌体表面に接着蛋白である Intimin を保有するが、EPEC 自身が己の接着蛋白である Intimin の受容体蛋白 Tir をⅢ型分泌装置と呼ばれる微細な管を通して細胞側に注入する。Tir が細胞表面に現われると Intimin と結合して EPEC と細胞が橋渡しされる。さらに、Intimin-Tir 結合の刺激から始まる伝達シグナルにより細胞の骨格が変性し細胞表面に台座が現われ、EPEC がその台座に強固に密着する。

また、一部の EPEC の菌体表面には集束形成線毛 (Bundle forming pilus : BFP) と呼ばれる接着線毛

も存在する。BFP には病原性を増強する作用があり、BFP を保有する EPEC を典型的 EPEC、BFP を保有しないものを非典型的 EPEC として区別することがある。

EPEC の接着性に関する病原因子の遺伝子は染色体またはプラスミドに存在する。Intimin、Tir、及びⅢ型分泌装置の遺伝子は染色体の LEE (locus of enterocyte effacement) 領域に、また、BFP の遺伝子は EPEC 接着因子 (EPEC adherence factor : EAF) と呼ばれる大きさ約 60Mda のプラスミド上に存在する。また、赤痢菌と同様に志賀毒素を産生する大腸菌である STEC の大多数にも染色体上に LEE 領域が存在し、A/E 障害が発生する。EPEC 及び STEC の接着因子である Intimin は、動物種由来も含めて $\alpha \sim \kappa$ 型までの 10 種類が見つかっている。

3) 疫学

2 歳以下 (特に 6 ヶ月以下) の子供に感染者が多く、発展途上国では乳幼児下痢症の原因の 30 ~ 40 % もが EPEC であるとの報告がある。わが国でも、乳幼児の下痢症から散発的に分離されている。その他に EPEC は集団例を起こし、近年では次の 2 事例が報告されている。事例 1 : 2001 年 5 月に石川県の老人ホームで入所者等 184 名中 47 名 (26%) が発症、原因食品は 'わらびの酢の物'。EPEC (0119:H21、Intimin 陽性、BFP 陰性) が検査を実施した患者 23 名中 22 名 (96%) から検出された。事例 2 : 2004 年 8 月に宮城県の高校生の合宿で参加者 148 名中 103 名 (70%) が発症。感染源は不明。EPEC (0115:H19、Intimin 陽性、BFP 陽性) が検査を実施した 64 名 (患者 59 名、調理従事者 5 名) 中 20 名 (31%) から検出された。なお、上記 2 事例の患者からは、EPEC 以外の腸管病原菌ならびにウイルスは検出されなかった。

4) 検査法

従来の EPEC の検査では、供試株の血清型が 055 群、0128 群等の既知の EPEC の血清型に一致し、かつ、細胞侵入性及び腸管毒産生性を持たないものを EPEC (もしくは EPEC 血清型) と同定していた (古典的 EPEC)。現在は、1995 年にブラジルで開催された第 2 回 EPEC 国際シンポジウムにおいて合意された定義 (A/E 障害を起こす大腸菌のうち STEC 以外の大腸菌を EPEC とする) に基づき同定するのが一般的な検査法となりつつある。

EPEC の A/E 障害を調べる生物学的検査法としては、細胞培養法による局在性接着の確認試験、及び蛍光アクチン染色 (Fluorescence actin staining : FAS) 試験がある。局在性接着の確認試験は、人由来の HEp-2 細胞に試験菌を投与し、3 時間、CO₂ フラン器で培養後、未接着の菌を洗い流した後固定し、ギムザ染色して判定する。FAS 試験は、細胞に接着した試験菌の周囲の細胞内部に生ずる重合したアクチン繊維を FITC-phalloidin で染色し蛍光顕微鏡で判定する。

ただし、上記の方法は煩雑で判定も難しいことから、病原因子の遺伝子を標的とした簡便な検査法が開発されている。Intimin の遺伝子である *eaeA*、及び BFP の遺伝子である *bfpA* をそれぞれ PCR 法で検出する方法が最も容易であり、他に EAF に由来する標識した 1kb の遺伝子を用いる EAF プローブ法もある。

3 EAggEC

1) 臨床症状

EAggEC の臨床症状は粘液を含む水様性の下痢および腹痛を主徴とし、便はときには血液が混ったり緑色になったりする。38°C 台の発熱や嘔吐が起こることもある。潜伏期間は一般的に 7 時間 ~ 2 日。治療期間は 3 ~ 7 日であるが、乳幼児や免疫力が低下している場合は 2 週間以上の持続性下痢を起こすことがある。

2) 病原性機序

EAggEC は、実験的に培養したヒトの細胞表面ばかりでなく培養容器にも接着し、その接着像は積み重ねた 'レンガ' 状や '蜂の巣' 状の凝集性接着像を呈する (図 2)。EAggEC は小腸や大腸の粘膜層に

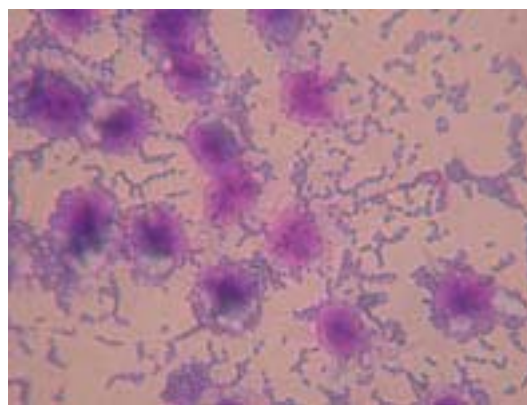


図 2 EAggEC の接着像 (大腸菌が細胞及びその周囲に凝集して接着している)。拡大倍率 約 400 倍 愛知衛研

凝集線毛 (AAF : aggregative adherence fimbriae) により接着し粘液の分泌を促す。腸の表面には粘液を含む厚いバイオフィームが形成される。多数接着した EAggEC が何らかの毒素を産生して粘膜に障害を与え下痢を起こすと考えられている。

AAF には、太さ 2 ~ 3 nm の柔軟性がある AAF I や 5 nm の比較的硬い AAF II などの 3 種類が知られているが未知の AAF を持つ株も多いと推定されている。AAF I 及び AAF II の遺伝子は 60 ~ 65MDa のプラスミド (pAA) 上にあり、隣接する制御遺伝子 *aggR* によって転写が活性化される。また、pAA 上には、EAST1 や Pet 等の腸管毒が見出されているが、下痢症との関連性は現在のところ明確ではない。

3) 疫学

EAggEC は、発展途上国の乳幼児下痢症から多く検出されているが、日本などの先進国でも散发例及び集団例 (輸入例を含む) から検出されている。以下に最近の集団例 3 事例を示す。事例 1 (混合感染例) : 1998 年 4 月、中国に修学旅行した秋田市内の高校生等 420 名中 208 名 (50%) が発症。感染源不明。検査可能であった 206 名中 27 名 (13%) から EAggEC (0 群別不能、*aggR* 陽性) が検出されたが、これらの検査対象者からは他にも EHEC (6 名)、EPEC (12 名) 等が検出された。事例 2 : 2000 年 12 月、大阪市内の保育園で園児等 274 名中 104 名 (38%) が発症。感染源不明。EAggEC (0126:H27、プラスミド pAA の遺伝子断片 pCVD432 陽性) が検査を実施した 194 名のうち 47 名 (24%) から検出された。事例 3 (混合感染例) : 2003 年 11 ~ 12 月、愛知県を含む国内 15 都道府県からカンボジアへ渡航した団体旅行者 78 名中 24 名 (31%) が発症。感染源不明。患者在住の都道府県で総数 20 名の患者を検査した結果、カンピロバクター、サルモネラ等が 5 ~ 15% の割合で検出されたが、岡山県及び愛知県において実施した EAggEC の検索では患者の 38% (8 名中 3 名) から EAggEC (0 群別不能、*aggR* 陽性) を検出した。

4) 検査法

生物学的試験法としては、細胞培養法による凝集性接着の確認試験、及び回転培養による凝集試験 (Clump 試験) がある。凝集性接着の確認試験は、局在性接着試験と同様に細胞と菌を混合培養後、細胞及び培養器表面に対する菌の接着性の有無により

判定する。アルコール等で固定化した細胞を用いる方法もある。Clump 試験は、Mueller-Hinton ブロス培地で 115rpm、37°C、20 時間培養後、管壁への凝集塊の付着の有無により判定する (図 3)。

また、遺伝子検査法としては、pAA の遺伝子断片 pCVD432 をプローブとして用いる方法 (pCVD432 プローブ法) がある。また、pCVD432 ないし *aggR* を標的とした PCR 法も開発されている。ただし著者らの経験では、遺伝子を保有していても凝集性接着を示さない大腸菌もあるので、実際の検査では PCR 法でスクリーニング後、Clump 試験により凝集性接着を推定する方法が比較的簡易で精度が高いと思われる。なお注意しなければならない点は、



図 3 Clump 試験 (培地表層付近の管壁に EAggEC の凝集塊が帯状に付着している)。愛知衛研

1) 集団事例や散发例から 0 型別不能の EAggEC が分離されており、市販の“病原大腸菌免疫血清 1 号セット”によるスクリーニングが有効でない場合があること、2) EAggEC は健常者からも検出される場合があること、さらに、3) 全ての EAggEC が下痢を引き起こすのか未解明な点があることから、EAggEC を病因物質として特定するには疫学調査結果を踏まえて慎重に判断する必要があることの 3 点である。

4 EPEC 及び EAggEC の同時検出用の Multiplex-PCR 法

当所も参加した平成 11, 12 年度の厚生科学研究補助金事業「細胞付着性大腸菌の実態把握とその検査法の確立に関する共同研究」において EPEC、EAggEC、及び STEC を同時に検出する PCR 法が開発されている。本法は 2 系統の PCR により表 1 の 4 種類の病原因子の遺伝子を検索するシステムがとられているが、EPEC と EAggEC をスクリーニングするためには、他のカテゴリーの可能性が否定された大腸菌を対象にして次の 1 種類の PCR を行なえばよい。

PCR 用のプライマーは、EPEC 用の混合プライマー

表1 PCR用プライマー

標的遺伝子	増幅サイズ(bp)	プライマーの名称 (濃度)		塩基配列
		単体	混合	
<i>eaeA</i>	591	eaek1	Pr-eae (0.2 μM)	5'-gct tag tgc tgg ttt agg at
		EA2		5'-ctc tgc aga tta acc tct gc
<i>aggR</i>	254	aggRKs1	Pr-agg (0.2 μM)	5'-gta tac aca aaa gaa gga agc
		aggRKas2		5'-aca gaa tcg tca gca tca gc
<i>bfpA</i>	326	EP-1	Pr-bfp (0.2 μM)	5'-aat ggt gct tgc gct tgc tgc
		EP-2		5'-gcc gct tta tcc aac ctg gta
<i>astA</i>	106	EAST-1S	Pr-ast (0.2 μM)	5'-gcc atc aac aca gta tat cc
		EAST-1AS		5'-gag tga cgg ctt tgt agt c

(小林一寛ら、2002年 一部改変)

(Pr-eae) と EAggEC 用の混合プライマー (Pr-agg) の 2 種類を混合したマルチプライマーを用い、PCR 反応は、94℃、2 分間加熱後、熱変性 (94℃、45 秒) →アニーリング (55℃、2 分) →伸張 (72℃、1 分) の 25 サイクル後、最終伸張反応 72℃、5 分の条件で行なう。

最後に、EPEC 及び EAggEC の検査は現時点では下痢原性大腸菌の他の 3 種類のカテゴリーに比べて容易ではない。しかし、一方では多種類の下痢起病菌を対象とした一斉検査法の研究が加速的に進んでいるので、近い将来、EPEC 及び EAggEC を含めた病因物質の探索が多く検査室で実施可能になると思われる。

参考文献

- 1) 坂崎利一編:新訂食水系感染症と細菌性食中毒、中央法規、2000
- 2) 八柳 潤、斉藤志保子ら、中国へ修学旅行した高校生が EHEC O157:H7 など複数の下痢原性細菌に集団感染した事例の概要—秋田県、病原微生物検出情報 21(5):94-95, 2000
- 3) 長谷 篤、小笠原 準ら、病原大腸菌 O126 の集団事例について—大阪市、病原微生物検出情報 22(4):88, 2001
- 4) 北西陽一、倉本早苗ら、軽費老人ホームで発生した腸管病原性大腸菌 O119:H21 の食中毒事例—石川県、病原微生物検出情報 22(8):195-196, 2001
- 5) 渡邊 節、川野みちら、大腸菌 O115 が原因と考えられた食中毒事例—宮城県、病原微生物検出情報 25(12):339-340, 2004
- 6) 小林一寛、勢戸和子ら、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、感染症誌 76:911-920, 2002

7) 中嶋 洋、山崎 貢ら、腸管凝集性大腸菌 (enteroaggregative Escherichia coli: EAggEC) の海外旅行者集団下痢症からの分離、感染症誌 79:314-321, 2005

8) Torres AG, Zhou X, and Kaper JB: Minireview, Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells. Infect. Immun. 73:18-29, 2005

新規に定義された大腸菌の O 血清群 (O 174 ~ O 181) について

国立感染症研究所発行の病原微生物検出情報の 3 月号 (平成 17 年 3 月) に掲載された新規の大腸菌 O 血清群に関する記事¹⁾を紹介する。

大腸菌の O 血清群はこれまで 173 番目 (但し、O 31, O47, O67, O72, O93, O94, O122 は欠番) まで定義されていたが、2004 年、デンマークのコペンハーゲンにある血清学研究所 (Statens Serum Institute) から新たに 8 種類 (O174 ~ O181) の O 血清群の追加論文が発表された²⁾。表 2 の標準株の病原性遺伝子 (もしくは病原性マーカー) の項に示されているように、O176 ~ O181 の 6 種類は志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) と関連する O 血清群であり、うち O176 及び O177 の STEC は日本国内に分布していることが確認されている。また、O177 群の STEC は、我が国においても 2 例の溶血性尿毒症症候群 (HUS) 患者から分離されており、国内での動向に注意を要するとされている。一方、STEC と関連していなか

表2 新しいO血清群標準株の由来および病原性の概要(文献1より抜粋)

新規O群	O174	O175	O176	O177	O178	O179	O180	O181
菌株番号	2531-54	2533-54	E29518-83	E40874-85	E54071-88	E43478	86-381	92-1250
血清型	O174:H27	O175:H28	O176:NM	O177:H25	O178:H7	O179:H8	O180:NM	O181:H49
病原性遺伝子		<i>astA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
または病原性		CVD432	<i>ehxA</i>	<i>eae</i>	<i>stx2</i>	<i>ehxA</i>	<i>astA</i>	
マーカー		<i>daaC</i>						
由来	ヒト下痢便	ヒト下痢便	小牛糞便	小牛	生肉	ヒト血便	豚	牛肉

astA:腸管凝集性大腸菌産生性耐熱性毒素(EAST1); CVD432:腸管凝集性大腸菌プラスミドマーカー; *daaC*:分散接着性大腸菌(非線毛性接着関連遺伝子); *stx1*:志賀毒素1遺伝子; *ehxA*:エンテロヘモリジン遺伝子; *stx2*:志賀毒素2遺伝子; *eae*:インチミン

った残り2種類のO血清群のうち、O175の標準株はEAggECに関連する病原遺伝子等を保有し、O174の標準株については病原遺伝子は示されていない。以上の新規O血清群の型別判定は、国立感染症研究所において実施できる。

文 献

- 1) 伊豫田 淳、田村和満、渡辺治雄、大腸菌の新規O血清群(O174～O181)に関する情報、病原微生物検出情報26(3):70-71, 2005
- 2) Scheutz F, Cheasty T, Woodward D and Smith HR. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new E. coli O groups that include Verocytotoxin-producing E. coli (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica). 112(9):569-84, 2004

新しく追加された市販病原大腸菌免疫血清(混合9及び単味血清)について

市販のO群別試験用の“病原大腸菌免疫血清1号セット”は、8種類の混合血清(混合1～8)、及び各混合血清の中身である単味血清で構成されていたが、新たな混合血清‘混合9’及びその中身である7種類の単味血清(O74, O91, O103, O121, O145, O161, O165)が厚生労働省から認可され2005年8月に市販された。これらのO血清群はいずれもSTECと関連する血清型である。従来、市販の血清キットで血清型別分類ができなかったSTEC株は、地方衛生研究所に配備されている4種類の血清(国立感染症研究所からの分与血清O74, O103, O161, O165)を用いて型別検査を行ってきた。今回、追加血清の市販により型別分類可能なO血清群が増えただけでなく、保健所等の検査機関においても検査が可能となったことから、STEC感染症発生時には今まで以上に迅速にかつ精密な検査成績が得られることが期待される。

(文責 微生物部 山崎 貢)

愛知衛研技術情報 第29巻第4号 平成17(2005)年12月1日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のホームページ【<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>】

平成13年5月よりダイヤルインとなりました。

所 長	室 : 052-910-5604	毒性部・毒性病理科	: 052-910-5654
次 長	: 052-910-5683	毒性部・毒性化学科	: 052-910-5664
研 究 監	: 052-910-5684	化学部・生活化学科	: 052-910-5638
総 務 課	: 052-910-5618	化学部・環境化学科	: 052-910-5639
企画情報部	: 052-910-5619	化学部・薬品化学科	: 052-910-5629
微生物部・細菌	: 052-910-5669	生活科学部・水質科	: 052-910-5643
微生物部・ウイルス	: 052-910-5674	生活科学部・環境物理科	: 052-910-5644

FAX : 052-913-3641(変更ありません)