

転換期を迎えた下痢原性大腸菌感染症の検査方法

Investigation method for diarrheagenic *Escherichia coli* infections is a turning point

いい じま よし お
飯 島 義 雄
Yoshio IJIMA

はじめに

大腸菌は、ヒトの腸管における常在菌のひとつである。この大腸菌の中に下痢を引き起こすものがあると考えられ始めたのは、19世紀後半ではないかといわれている。学問的に、特定の生物型が乳幼児下痢症の原因となるという最初の報告は、1927年のAdamによるものと思われる。1944年には、Kaufmannによって、血清型による病原性大腸菌の分類が提唱された。その後、多くの研究者の努力によって、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、腸管凝集性大腸菌 (enteroaggregative *E. coli*, EAEC)、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) などの存在が明らかになった¹⁾。

しかし、これだけ長い下痢原性大腸菌に関する研究の歴史がありながら、腸管出血性大腸菌 O157 を除く多くの下痢原性大腸菌感染症は、市中の病院では見落とされることが多い。さらには、非病原性の大腸菌が「病原大腸菌」として報告されている。その最大の原因は、釣菌に基づく血清型別検査にある。それ以外にも、保険点数の問題、特許の問題、マンパワーの問題など、多くの問題が関係していると思われる。これら下痢原性大腸菌感染症が適切に検査されない要因をまとめるとともに、下痢原性大腸菌の検査法について考えてみたい。

I. 下痢原性大腸菌の種類と特徴

5種類の下痢原性大腸菌の特徴を簡単に紹介す

る。なお、この5種類以外にも、拡散付着性大腸菌 (diffusely adherent *E. coli*, DAEC) や細胞剥脱性大腸菌 (cell-detaching *E. coli*, CDEC) などの存在が示唆されているが、あまり研究が進んでいないので、ここでは省略する。

1. ETEC

ETECは、耐熱性エンテロトキシン (ST) または易熱性エンテロトキシン (LT)、あるいはその両方を産生する。STには、18アミノ酸からなるブタ由来のSTIp、19アミノ酸からなるヒト由来のSTIh、48アミノ酸からなるSTIIがある。STIpとSTIhは、構造も良く似ており、100℃で30分処理しても不活化されない。

一方、LTはコレラ毒素に類似した毒素で、60℃、10分で失活する。LTにもLTp-I、LTh-I、LT-IIといったvariantが知られている。ETECは、colony forming antigen (CFA) と呼ばれる線毛を介して腸管上皮に定着し、これらの毒素を放出し、下痢を引き起こす。ETECは、開発途上国で蔓延しており、ほとんどが途上国での感染例である。

2. EPEC

EPECは、腸管上皮に bundle-forming pili と呼ばれる線毛を介して付着後、上皮細胞の微絨毛を破壊し、インチミン (*eae* 遺伝子産物) を介して、上皮細胞に密に結合する (これを、attaching and effacing 傷害と呼ぶ)。これにより、吸収不全が起こり、下痢が起こると考えられている。イオン輸送に障害が起こり、下痢が起こるといふ説もある。EPECは、途上国に限らず、日本国内でも感染が起こる。

3. EIEC

EIECは、赤痢菌と同じように、粘膜上皮細胞に侵入・増殖し、隣接する細胞へと拡散し、上皮細胞の壊死や潰瘍を引き起こす。通常は、食品や水を介して感染するが、ヒト-ヒト感染もあるといわれている。発展途上国での感染が主で、国内での感染は稀である。

4. EAEC

EAECは、aggregative adherence fimbriae (AAF) と呼ばれる線毛を介して、腸管上皮細胞に接着し、増殖する。EAEC耐熱性毒素 (EAST1) を産生し、下痢を引き起こす。慢性的な下痢症状が特徴である。途上国で蔓延しており、著者らの調査では健康人保菌者も少なくない²⁾。国内での感染と途上国での感染が同程度と思われる。

5. EHEC

EHECは、STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*) あるいはVTEC (Vero toxin-producing *E. coli*) とも呼ばれる。インチミンを介して腸管上皮細胞へ付着し、志賀毒素を産生する。EPECが志賀毒素産生能を持ったものと考えられる。溶血性尿毒症症候群 (HUS) 等を引き起こし、死に至ることもある。他の下痢原性大腸菌と異なり、国内での感染がほとんどである。主な血清型はO157、O26、O111であるが、ほとんどの血清型においてEHECが見つかっている。

II. 下痢原性大腸菌感染症が適切に検査されない原因

病原細菌学において、何種類も混在する細菌の中から、感染症の起原菌を単離することは、非常に重要な作業である。したがって、下痢原性大腸菌の検査方法は、MacConkey、BTB、DHLなどの選択培地上に形成したコロニー2~3個を釣菌し、TSIやLIMなどの確認培地で大腸菌であることを確認後、市販の病原大腸菌免疫血清で凝集するか否かという手法が、多くの検査室で採用されている。この検査方法では、多くの下痢原性大腸菌感染症が見落とされているだけでなく、多くの非病原性の大腸菌が

「病原大腸菌」として報告されることになる。

1. 釣菌による単離の問題点

仮に、MacConkeyなどの寒天培地上に形成したコロニーが下痢原性大腸菌であると適切に同定する手段があるとしても、大腸菌というpopulationの中に含まれる下痢原性大腸菌のsubpopulationが小さければ、容易に検出できない。検出できる確率[D]は、subpopulationの値[P]と選択培地からの釣菌数[n]によって決まり、次のように表現できる。

$$D = 1 - (1 - P)^n$$

釣菌数を増やせば、検出確率は上がるが、subpopulationが10%以下だと検出できる確率はかなり低い。特に、subpopulationが5%を下回ると、10コロニー釣菌しても、下痢原性大腸菌を検出できる確率は40%を切る。

著者ら^{3,4)}は、胃腸炎症状の外来患者803名を対象に下痢原性大腸菌感染症の発生状況を調査した。選択培地上に形成されたコロニーの密集した部分を掻き取り(これをコロニー・スweepと呼ぶ)、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCRで5種類の下痢原性大腸菌を検出した。このコロニー・スweepには、数百・数千のコロニーが含まれているので、下痢原性大腸菌のsubpopulationが非常に小さくても検出が可能である。69名が下痢原性大腸菌に罹患しており、12名からは2種類の下痢原性大腸菌遺伝子が検出された。そして、これらの下痢原性大腸菌のsubpopulationを調べてみた。最低10個の大腸菌様コロニーを調べ、それでも釣菌できない場合は、最大100個までコロニーを調べた。その結果、下痢原性大腸菌のsubpopulationは非常に小さく、5%以下の便検体が52%もあった。

さらには、発症直後の第1病日や第2病日に採取した便のsubpopulationは非常に小さく、第3病日にsubpopulationが最も高い傾向にあった(図1)。急性期には病原体の量も多く、回復に伴い病原体の量は少なくなる。したがって、症状が現れたらできるだけ、早くサンプリングしたほうが良い、と信じられてきた⁵⁾。しかし、実際には、発症直後(48時間以内)の便の、下痢原性大腸菌のsubpopulationは小さい。もし、発症直後であれば、翌日、翌々日の便検体も入手したほうがよい。ただし、empiricalな治療を優先するか、検査を優先するかについては、

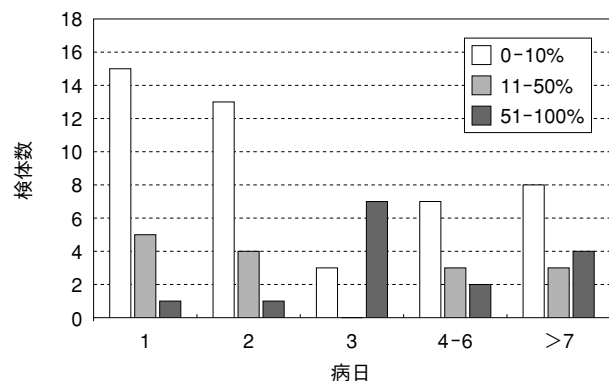


図1 検便のタイミングと下痢原性大腸菌のsubpopulation
(文献4より, 再掲)

医師と検査室で十分協議する必要がある。

ヒトが食品や水を摂取した時、その中に存在する細菌の多くは、胃酸により死滅する。したがって、下痢原性大腸菌感染症においても、胃を通り抜けた微量の菌が腸管で増殖し、下痢や腹痛といった症状を引き起こすと考えられる。それゆえ、初期段階では少量の菌が排出され、その後高濃度で排出されていくという現象は、当然なことといえる。表現を換えれば、下痢原性大腸菌は、その便中の菌量が少ない時期から、腹痛・下痢等の症状を引き起こすと考えることができる。ただし、菌の定着・増殖形式、摂取菌量、胃の酸性度と菌の耐酸性度、腸管免疫、検体の採取時期など、さまざまな要因により、subpopulationには大きな幅があると考えておく必要がある。

いずれにしても、従来からの釣菌に依存した検査を実施している限り、下痢原性大腸菌感染症に罹患していても、検出できない場合が多い。また、培養できない細菌も多く存在していることがわかってきた現在、単離や培養ができなくても、病原遺伝子の検出だけで、起因菌を特定してもよいのではなからうか。実際、ノロウイルスなど培養できない微生物においては、遺伝子の検出により原因物質としている。ただし、毒素遺伝子を持っていながら、定着因子を欠く大腸菌株も存在する。このような株が腸管で大量に増殖する可能性は低いが、病原遺伝子検出による起因菌の特定には多少の留意が必要である。

2. 血清型別の問題点

170種類余りある大腸菌の血清型のうち、現在50種類の血清型が、「病原大腸菌」とされている。血

清型による病原性の大腸菌の分類をKaufmannが提案したのは、1944年の遺伝子の実体も分っていなかった戦時中の話である。EHECを例にとると、O157、O26、O111などの血清型が多く、これらの血清型の株を調べてみると *stx* 遺伝子を持っていることが多い。また、O119やO126は下痢原性大腸菌であることが多い。しかし、それら以外の血清型と病原性との関係は疑わしい。血清型別が提案されて60年以上が経過し、学問も検査技術も飛躍的に進歩した現在、血清型だけで病原性のある大腸菌だとすることには、大いに疑問がある。Nishikawaら⁶⁾は、下痢症患者便924検体から大腸菌3~5コロニーを単離し、病原大腸菌免疫血清に凝集する菌株の病原性を調べた結果、わずか17% (229株中40株)しか病原性がなかったと報告している。同様な方法で、Tamakiら⁷⁾は23% (1,130株中263株)が、Yangら⁸⁾は11% (137株中15株)が病原因子を保有していたと報告している。以上のように、この血清型別に基づいて検査を行うと、実際の3~8倍の非病原性の大腸菌が「病原大腸菌」として同定されている計算になる。

さらには、病原大腸菌血清型に属さない下痢原性大腸菌が多く存在する。筆者ら³⁾が、下痢症患者から単離した下痢原性大腸菌を調べたところ、38% (102株中39株)しか、病原大腸菌免疫血清で凝集しなかった。つまり、62%もの下痢原性大腸菌は、これらの血清型に属していなかった。ミャンマーでの最近の調査でも、43% (47株中20株)しか、病原大腸菌免疫血清で凝集しなかった⁹⁾。以上のように、病原大腸菌免疫血清は下痢原性大腸菌の半分も認識しない。

3. その他の問題点

大腸菌、ウエルシュ菌、黄色ブドウ球菌は、腸内の常在菌であるため、これらが検出されても病原性が簡単に証明できない。そのため、これらの菌の検査が、実施されていない、あるいはおざなりな検査になっている検査室もあると思われる。EHECを除く下痢原性大腸菌感染症で死に至ることは、日本国内ではほとんどなく、輸液と抗菌剤の投与で快癒するケースが多いので、起因菌の特定に力が注がれていない可能性がある。

保険点数も無視できない要因である。便からの細

菌培養同定は、130点である。これでは採算が取れず、入念な細菌検査が実施できない。しかし、前述した病原大腸菌免疫血清に属する大腸菌の単離は、「大腸菌抗原同定検査」として保険点数190点である。微生物検査のほとんどが、採算が取れない現在の保険点数制度にあって、病原性が疑わしい(11~23%程度しか病原性がない)大腸菌抗原同定検査だけが採算が取れるというから、不可解である¹⁰⁾。

PCRの普及と特許の問題も関係している。病原因子を検出する手段として、現時点でPCRが最も優れている。下痢原性大腸菌を網羅的に検査しようとするると8種類以上の遺伝子を検出しなくてはならない。多検体から、多くの遺伝子を検出しようすると、従来のPCRでは電気泳動などに手がかかり過ぎて対応できない。そうすると、96穴を持つリアルタイムPCRが威力を発揮する。PCRそのものの特許の期限は切れてしまっているが、リアルタイムPCRで使うTaqManプローブや酵素など、次々と新しい特許の縛りがかけられているために、診断への応用が難しい現状がある。

検査室のマンパワーの問題、ブランチャ化、外注といった要因も無視できない。臨床症状、途上国への渡航歴、潜伏時間の情報など、臨床医と検査室の密接な連携があつてこそ、途上国で罹患することの多いETEC、EIEC、EAECなどが検出できるのではなかろうか。

Ⅲ. 遺伝子増幅による下痢原性大腸菌検査法

現時点では、下痢原性大腸菌の持つ病原遺伝子をターゲットとしたPCR等の遺伝子増幅法が最も優れていると考えられる。しかも、上述したように、大腸菌の中に数%程度しか存在しないことが多いので、釣菌していたのでは検出できないことが多い^{3, 11)}。したがって、便から直接DNAを抽出するか、MacConkeyなどの選択培地上のコロニー・スweepからDNAを抽出して、それをPCRまたはリアルタイムPCRにかけるのが良い。便から直接DNAを抽出する場合、その日のうちに結果が出るというメリットもある。下痢原性大腸菌を検出するプライマーやプローブに関する報告はたくさんあるので^{3, 4, 6~9, 12~16)}、それぞれの施設の設備等に合わせれば良い。最近、PCRチューブの中にプライ

マーや酵素などの試薬が分注されており、水とサンプルを入れるだけの製品も発売開始になった。

各自治体にある地方衛生研究所で、病原遺伝子をターゲットとした下痢原性大腸菌の検査体制を構築しているところも少なくない。検査依頼を受けてくれる保証はないが、病院検査室で困った時は相談してみるのも良いかもしれない。なお、EHECについては、国立感染症研究所がリファレンスセンターとして機能してくれているが、その他の下痢原性大腸菌についてもリファレンスセンターを準備する必要があるかもしれない。

おわりに

開発途上国を旅行して、下痢を経験する人は多い。いわゆる旅行者下痢症である。その多くは、下痢原性大腸菌が原因だと推察されるが、その原因が分からないままに推移することが少なくない。その大きな要因に、現在の下痢原性大腸菌の検査体制がある。Kaufmannの血清型別提唱から60年以上経た今、そろそろ血清型から病原性を推定する時代に終わりを告げ、病原因子を直接検出する時代に入ったのではなかろうか。

文 献

- 1) Nataro JP, Kaper JB : Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11 : 142-201, 1998.
- 2) Oundo JO, Kariuki SM, Boga HI, Muli FW, Iijima Y : High incidence of enteroaggregative *Escherichia coli* among food handlers in three areas of Kenya : a possible transmission route of travelers' diarrhea. J Travel Med 15 : 31-38, 2008.
- 3) Iijima Y, Tanaka S, Miki K, Kanamori S, Toyokawa M, Asari S : Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens : low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis. Diagn Microbiol Infect Dis 58 : 303-308, 2007.
- 4) 飯島義雄 : 開発途上国で罹患することの多い下痢原性大腸菌の検査. 検査と技術 37 : 50-53, 2009.
- 5) Centers for Disease Control and Prevention : Recommendations for collection of laboratory specimens associated with outbreaks of gastroenteritis. MMWR 39 : 1-13, 1990.
- 6) Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Kitase T, Abe N, Nakamura H, Wada T, Ishii E, Haruki K, Surveillance Team : Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City,

- Japan between 1997 and 2000 : prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. Jpn J Infect Dis **55** : 183-190, 2002.
- 7) Tamaki Y, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Toma C, Iwanaga M : The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. Jpn J Infect Dis **58** : 65-69, 2005.
- 8) Yang JR, Wu FT, Tsai JL, Mu JJ, Lin LF, Chen KL, Kuo SH, Chiang CS, Wu HS : Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. J Clin Microbiol **45** : 3620-3625, 2007.
- 9) Takahashi E, Sultan Z, Shimada S, Aung WW, Nyein MM, Oo KN, Nair GB, Takeda Y, Okamoto K : Studies on diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Myanmar. Microbiol Immunol **52** : 2-8, 2008.
- 10) 瀬戸山友一, 山内一由, 勝山努 : コスト面から見た細菌検査室－細菌検査室のコスト分析－. モダンメディア **53** : 341-346, 2007.
- 11) Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS : Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. J Clin Microbiol **22** : 614-619, 1985.
- 12) Bellin T, Pulz M, Matussek A, Hempen HG, Gunzer F : Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. J Clin Microbiol **39** : 370-374, 2001.
- 13) Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M: Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol **41** : 2669-2671, 2003.
- 14) Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R : Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. J Clin Microbiol **41** : 5134-5146, 2003.
- 15) Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R : Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. J Clin Microbiol **43** : 5362-5365, 2005.
- 16) Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG : Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. J Clin Microbiol **46** : 1752-1757, 2008.