

## 食水系感染症病原体の検査法 - 8

## 腸管出血性大腸菌 (志賀毒素産生性大腸菌)

せ と かず こ  
勢 戸 和 子  
Kazuko SETO

## I. 病原体

## 1. 病原体

1982年にアメリカ合衆国でハンバーガーが原因と推定される2例の食中毒事件が発生し、患者が激しい出血性大腸炎を起こしていたことから、原因菌であったO157:H7は腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) と名付けられた<sup>1)</sup>。主要な病原因子はVero細胞に対する細胞毒 (ベロ毒素、VT) で、VTは志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae* 1) の産生する志賀毒素と同じ、あるいはきわめて類似した生化学的性状をもつことから、志賀毒素様毒素 (Shiga-like toxin) とも呼ばれた<sup>2)</sup>。1996年に毒素名を志賀毒素 (Shiga toxin, Stx)、菌の呼称を志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC) と統一することが提案された<sup>3)</sup>が、厚生労働省ではVTおよびEHECを使用している。

## 2. 疫学

EHEC感染症は、1999年4月に施行された感染症法に基づく3類感染症として診断した医師の全数届出が義務づけられている。毎年3,000～4,000例の届出があり、夏季に流行のピークがみられる。感染者から分離されるEHECの血清群は、約70%がO157、約20%がO26で、残りはO111、O121、O103、O145、O91などさまざまな血清群が報告されている<sup>4)</sup>。EHECの保菌動物はウシ、ヒツジ、ヤギ、シカなどの反芻獣であり、保菌動物の糞便で直接あるいは間接的に汚染された食品の摂取によりヒトに感染する。原因食品の解明は困難な場合が多いが、2009年はチェーン展開しているステーキハウスや焼肉店に関連した広域集団事例が全国各地で3件発生した<sup>4)</sup>。

感染菌量が少ないことから、ヒトからヒトへの二次感染も容易に成立し、井戸水や簡易プールなどの水系感染や動物との接触によると考えられる感染もしばしば発生している。

## 3. 臨床症状

EHECの潜伏期間は平均3～7日と比較的長く、典型的な症例では激しい腹痛と下痢で発症し、第2～3病日に血便を呈する。重症例では溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症など合併症を引き起こし、死に至る場合もある。一方で軽い下痢や無症状ですむ人もあり、感染に気づかないうちに家族などへ二次感染する可能性がある。症状が消失した後も排菌は続き、5歳以下の年少者では発症後17日間排菌したと報告されている<sup>5)</sup>。

## II. 検査法

## 1. 培養法

EHECの分離は、選択分離培地を用いて疑わしいコロニーを釣菌し、確認培地で*E. coli*であることを確かめるとともにVT産生性あるいはVT遺伝子を確認して同定する。

食品からのEHEC分離には増菌培養が必要であり、平成18年に厚生労働省から通知された「食品からの腸管出血性大腸菌O157およびO26の検査法について」(通知法)にしたがって、ノボビオシン加mEC培地を用いて $42 \pm 1$ ℃で $22 \pm 2$ 時間培養することが多い<sup>6)</sup>。海外ではノボビオシン加mTSBやEHEC enrichment brothまたはピルビン酸や選択剤を加えた変法緩衝ペプトン水が使用されている<sup>7)</sup>。食品が冷凍あるいは加熱されている場合は、非選択性の増菌培地が望ましいといわれており、通知法は

## 食水系感染症病原体の検査法-8

mEC 培地で 36℃ 培養を推奨しているが、われわれは Universal preenrichment broth (BD) による 42℃ 培養の有用性を報告している<sup>8)</sup>。

分離培地は、血清群 O157、O26、O111 がそれぞれソルビトール、ラムノース、ソルボース非発酵（または遅発酵）であることから、マッコンキー寒天培地 (MAC) の鑑別糖を置き換え CT 選択剤（セフィキシム 0.05mg/L および亜テルル酸カリウム 2.5mg/L）を加えた CT 加ソルビトール MAC (CT-SMAC)、CT 加ラムノース MAC、CT 加ソルボース MAC が汎用されており、白色（糖分解陰性）のコロニーを鈎菌する（図 1）。また、 $\beta$ -グルクロニダーゼや  $\beta$ -ガラクトシダーゼに特異的な発色基質を利用して、一般の大腸菌から O157 または O26 を区別するクロモアガー O157（関東化学）や Vi RX O26 寒天培地（栄研化学）などの合成基質培地も便利で

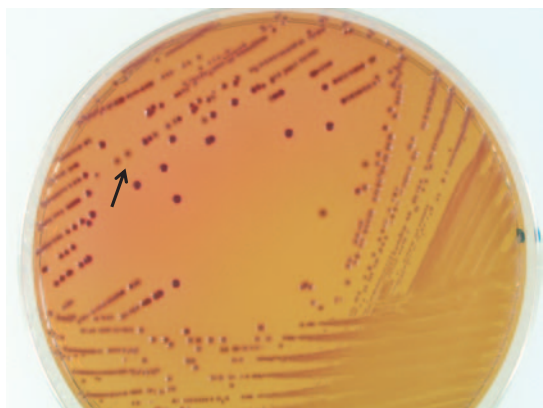


図 1 CT-SMAC 寒天上の EHEC O157 のコロニー  
EHEC O157（矢印）は中心がやや褐色の白色コロニーを形成する

ある。これ以外の血清群の EHEC は、O103、O121 など CT 加 MAC に発育する株と O165 など発育しない株がある<sup>9)</sup>。そのため、CT-SMAC と DHL 寒天培地などの一般的な大腸菌分離培地を併用し、多数のコロニーを非選択性の培地に画線培養して、VT 産生性または VT 遺伝子をスクリーニングする方法が効率的である。

目的とする EHEC の血清群が明らかな場合は、免疫磁気ビーズを用いて増菌培養液から集菌し、分離培地に塗抹する。免疫磁気ビーズは O157、O26、O111 (Dynal、デンカ生研、日本ハム) に加えて O103、O145 (Dynal) が市販されており、これ以外の血清群については各種抗体結合用磁気ビーズ（例えば抗ウサギ IgG 抗体結合磁気ビーズ、Dynal）と目的とする血清群の免疫血清（ウサギ血清）を用いて自家調整できる。このほか、EHEC の酸耐性を利用して、試料懸濁液や増菌培養液を等量の 0.125N 塩酸加 0.5% 食塩水と 30 秒間混合してから分離培地に接種する方法や、pH3 に調整した TSB に試料を加えて 30 分間静置し、酵母エキスなどを加えた TSB を加えて 42℃ で増菌する方法が報告されており、血清群にかかわらず EHEC の分離に有用である<sup>10,11)</sup>。

### 2. VT 検出法

免疫学的に VT を検出する方法は、逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA) 法、イムノクロマト (IC) 法（図 2）、酵素抗体 (ELISA) 法があり、それぞれ VTEC-RPLA（デンカ生研）、Duopath<sup>®</sup> Verotoxins（Merck 図 2-a）、キャピリア<sup>®</sup> VT（タウンズ 図 2-b）、NH イムノクロマト VT1/VT2（日本ハム 図 2-c）、

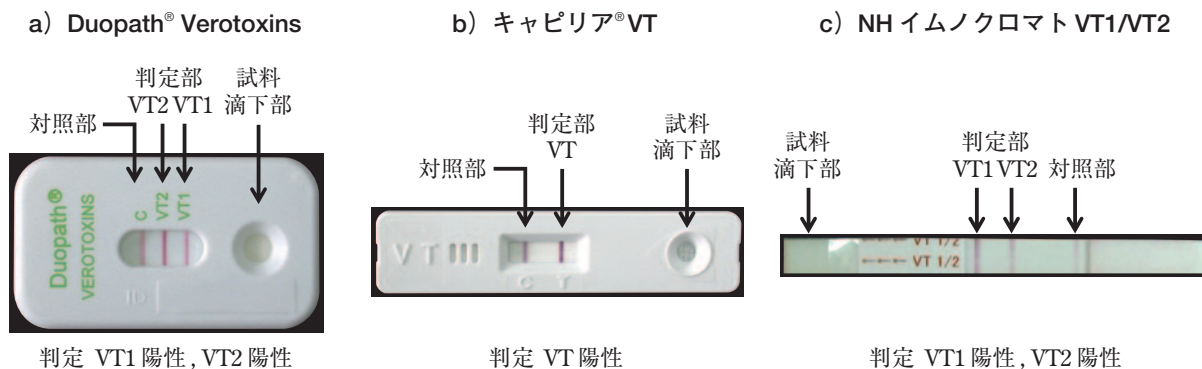


図 2 イムノクロマト法による VT の検出例

表1 主なプライマーの配列

プライマー	配列 (5' → 3')	アニーリング温度	検出遺伝子	増幅サイズ	文献
up down	GAACGAAATAATTTATATGT TTTGATTGTTACAGTCAT	43°C	<i>stx</i>	約 900 bp	14
LP30 LP31	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	64°C	<i>stx1</i>	348 bp	15
LP43 LP44	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	64°C	<i>stx2</i>	587 bp	15

オーソ VT1/VT2 (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス) が市販されている。VT は志賀毒素と同一の抗原性をもつ VT1 と免疫学的に異なる VT2 があり、それぞれ塩基配列がわずかに異なる多数のバリエーションが存在する。感染症法では VT を産生する大腸菌を EHEC としており、毒素型の決定までは求めていないが、上記製品のうち VTEC-RPLA、Duopath® Verotoxins、NH イムノクロマト VT1/VT2 は VT1、VT2 の型別が可能である。RPLA 法は安価で、検出感度は約 1ng/mL と高いが、被検液と試薬を混合後判定までに 16 時間以上静置する必要がある。ELISA 法は RPLA 法と同程度かやや高い感度を有し約 3 時間で判定できるが、測定波長 (450nm) と対照波長 (630nm) で測定可能なマイクロプレートリーダーが必要である。IC 法は最も簡便で 15 ~ 20 分で判定可能であるが、検出感度は RPLA 法に比べ 4 倍程度低く、被検液の菌濃度が高い場合は非特異反応が起きやすい<sup>12)</sup>。VT2 バリエーションのうち、O157 に多い VT2c は VT2 に比べ RPLA 法の検出感度が低く、IC 法でも検出されないことがあるので注意を要する<sup>12)</sup>。また、VT2f 遺伝子 (*stx2f*) 陽性株 8 株について CAYE 培地 (Merck) で調整した被検液を用いて検討したところ、RPLA 法と ELISA 法では 8 株、NH イムノクロマト VT1/VT2 では 7 株が VT2 陽性と判定されたが、Duopath® Verotoxins では全株陰性であった (未発表データ)。

### 3. VT 遺伝子検出法

VT 遺伝子 (*stx*) を検出する方法は、免疫学的に VT を検出する方法に比べて検出感度、迅速性および特異性に優れている。従来からの PCR 法は数多くのプライマーが報告されており、*stx1* と *stx2* を型別するもの、共通部分を増幅するもの、バリエーション

を特異的に検出するものなどがある<sup>13~16)</sup>。このうち Lin らのプライマーセットは、型別できないものの *stx1*、*stx2*、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f* を検出できる。Cebula らのプライマーセットは *stx1*、*stx2* の型別が可能で、アニーリング温度が 64°C と高く設定できるため特異性に優れているが、*stx2f* は検出できない (表 1)。また、タカラバイオから VT 遺伝子検出用および型別用プライマーセットのほか、テンプレート以外の反応液が分注された O-157 (ペロ毒素遺伝子) One Shot PCR Screening Kit Ver.2 など各種のキットが販売されている。

新しい遺伝子検出法として、鎖置換型 DNA 合成酵素を使って一定温度で遺伝子を増幅する LAMP 法や、1 サイクルごとに指数関数的に増加する増幅産物を蛍光強度によってリアルタイムにモニタリングするリアルタイム PCR 法がある。検出感度が高く、電気泳動を必要としないため迅速性に優れているが、増幅産物を濁度や蛍光強度で測定する専用の装置を必要とする。どちらも専用ソフトを使ってプライマーやプローブを設計することができるが、Loopamp® 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学) や CycleavePCR® O-157 (VT gene) Screening Kit (タカラバイオ) を利用すると便利である。

### 4. 血清学的診断法

感染症法では、HUS 発症例に限って血清中の O 抗原凝集抗体または抗ペロ毒素抗体の検出によって診断が可能である。O157 チェック「LPS 抗体」(三菱化学メディエンス) が市販されており、ラテックス・スライド凝集法により O157LPS 抗体を検出できる。当所では、自家調整した加熱死菌液を抗原に用いた定量菌体凝集反応で O 抗原凝集抗体価を測定している。これまでに 245 人の 438 サンプルにつ



いて検討し、EHEC 感染では下痢発現後 5～6 病日で抗体価が 160 倍以上に上昇すること、抗体価は約 1 カ月間持続することを確認した<sup>12)</sup>。

## 文 献

- 1) Riley LW *et al.*: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, **308** : 681-685, 1983.
- 2) Konowalchuk J *et al.*: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18** : 775-779, 1977.
- 3) Calderwood SB *et al.*: Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News*, **62** : 118-119, 1996.
- 4) 感染症情報センター, 国立感染症研究所: 腸管出血性大腸菌感染症 2010 年 5 月現在. 病原微生物検出情報, **31** : 152-154, 2010.
- 5) Mead PS *et al.*: *Escherichia coli* O157 : H7. *Lancet*, **352** : 1207-1212, 1998.
- 6) 工藤由起子ら: 食品における腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法. 食品衛生研究, **57** : 21-27, 2007.
- 7) 勢戸和子: 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 5 下痢原性大腸菌. 防菌防黴, **38** : 339-350, 2010.
- 8) Kanki M *et al.*: Simultaneous enrichment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 and *Salmonella* in food samples using universal pre-enrichment broth. *J. Food Prot.*, **72** : 2065-2070, 2009.
- 9) Seto K *et al.*: Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.*, **69** : 1215-1222, 2007.
- 10) Fukushima H *et al.*: High number of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.*, **238** : 189-197, 2004.
- 11) Hu J, *et al.*: Preliminary evaluation of a procedure for improved detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **65** : 21-26, 2009.
- 12) 小林一寛, 堀川和美編集: すぐに役立つ腸管出血性大腸菌の検査法, 文教出版, 2008.
- 13) Karch H *et al.*: Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **27** : 2751-2757, 1989.
- 14) Lin Z *et al.*: Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **37** : 543-548, 1993.
- 15) Cebula T *et al.*: Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157 : H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33** : 248-250, 1995.
- 16) Wang G *et al.*: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157 : H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40** : 3613-3619, 2002.