

## 食水系感染症病原体の検査法 - 9

## 下痢原性大腸菌

せ と かず こ  
勢 戸 和 子  
Kazuko SETO

## I. 病原体

## 1. 病原体

ヒトに下痢や腹痛などの腸管感染症を引き起こす大腸菌は下痢原性大腸菌と総称され、保有する病原因子や発症機序によっていくつかに分類される<sup>1)</sup>。このうち日本で食中毒や集団感染事例が報告されているものは下記の5種類であるが、ここでは、腸管出血性大腸菌以外のカテゴリについて概説する。

- ・ 腸管病原性大腸菌  
(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)
- ・ 腸管侵入性大腸菌  
(Enteroinvasive *E. coli*, EIEC)
- ・ 腸管毒素原性大腸菌  
(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)
- ・ 腸管出血性大腸菌  
(Enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC)
- ・ 腸管凝集付着性大腸菌  
(Enteraggregative adherent *E. coli*, EAEC)

EPECは小腸粘膜に接着し、粘膜上皮細胞の微絨毛を破壊して attaching and effacing lesions (A/E障害) と呼ばれる特徴的な病変を引き起こす。EIECは赤痢菌に類似した病原性を持ち、大腸の粘膜上皮細胞へ侵入して上皮細胞の壊死や潰瘍形成、炎症を引き起こす。ETECは、小腸粘膜上皮細胞に付着して微絨毛に傷害を与えることなく増殖し、エンテロトキシンを産生して下痢を引き起こす。エンテロトキシンには60℃ 10分間の加熱で失活する易熱性腸管毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) と100℃ 30分間の加熱によっても失活しない耐熱性腸管毒素 (heat-stable enterotoxin, ST) があり、両方またはいずれか一方を産生する。EAECの発症機序は解明

されていない部分も多いが、小腸や大腸の粘膜に付着して粘液の分泌を促し、炎症を引き起こすと考えられている。

各カテゴリに「分離頻度の高いO抗原とH抗原の組み合わせ」が主な血清型として知られていたが、これまで認識されていなかった血清型や型別できない株が病原因子を保有する一方で、主な血清型の株でも病原因子を欠く場合があり、血清型だけで下痢原性大腸菌と同定することはできない。

## 2. 疫学と臨床症状

EPECは発展途上国では乳幼児下痢症の主要な原因菌で、患者は2歳以下、特に6カ月未満が多い。成人にも食中毒や下痢症を引き起こし、日本でも河川水や施設の食事が感染源と推定される集団事例が報告されている<sup>2)</sup>。潜伏期間は通常12～72時間で、主な症状は水様性下痢だが腹痛、発熱、嘔吐を伴うこともある。

EIECは赤痢菌に類似した病原性を持ち、日本では1970年代までは集団感染事例がみられたが、現在では海外渡航者からの分離が多い。潜伏期間は一定しないが通常12～48時間で、下痢、発熱、腹痛を呈し、重症例では血便または粘血便、しぶり腹がみられる。

ETECの主な症状は水様性下痢で、嘔吐を伴うこともあるが腹痛は軽度でまれである。下水道の整備されていない国では小児のみならず成人でも重症化し、コレラと同様に脱水症状を起こすことがある<sup>3)</sup>。日本では大規模な食中毒や海外渡航者下痢症の原因となることが多い。潜伏期間は同一事例内でも一定せず、13～83時間と報告されている<sup>4)</sup>。

EAECは幼児の慢性および急性下痢症や成人の急性下痢症の原因となり、日本でも散发下痢症患者からの分離だけでなく集団事例も報告されている<sup>5,6)</sup>。

## 食水系感染症病原体の検査法－9

潜伏期間は7～48時間といわれており、一般的な症状は粘液を含む水様性下痢と腹痛で、嘔吐を伴うこともある。

### II. 検査法

#### 1. 培養法

下痢原性大腸菌の同定は、腸管常在菌である非病原性の *E. coli* との鑑別が重要であるが、下痢原性大腸菌だけを選択する分離培地や増菌培地はない。そのため、一般的な大腸菌分離培地である DHL 寒天培地や、合成基質で *E. coli* とその他の腸内細菌科細菌を区別する XM-G 寒天培地（日水製薬）やクロモアガー ECC（関東化学）を使用して、*E. coli* と考えられるコロニーを TSI 寒天培地、LIM 培地、CLIG 寒天培地（極東製薬工業）に釣菌するとともに、病原因子を確認して同定する。場合によっては、多数のコロニーを非選択培地に画線培養し、病原因子陽性株を選別してから *E. coli* であるかどうかを同定する。

食品からの下痢原性大腸菌分離には増菌培養が必要で、mEC 培地や緩衝ペプトン水、GN 培地などを使用する。食中毒や集団感染症では患者由来株の血清群や生化学的性状、薬剤耐性を調べ、特徴的性状を利用するとよい。すなわち、O 抗原免疫血清（デ

ンカ生研）と抗ウサギ IgG 抗体結合ビーズ（Dynal）を用いて増菌培地から集菌し、糖分解に特徴があればマッコンキー寒天基礎培地（BD）や DHL 寒天基礎培地（日本製薬）に鑑別糖を加えた培地を、薬剤耐性菌の場合は薬剤を加えた培地を併用する。

#### 2. 遺伝子検出法

EIEC や EPEC および EAEC の同定にはそれぞれ細胞侵入性や細胞附着性の確認を必要とするが、実験動物や培養細胞を必要とするため、PCR 法による病原性関連遺伝子の検出が多用されている（表1）。EPEC は A/E 障害にかかわる外膜タンパク質インチミンの遺伝子 (*eae*) や EAF (EPEC adhering factor) プラスミド、EIEC は細胞侵入性にかかわる IpaH (invasive plasmid antigen) 遺伝子や細胞侵入性遺伝子群の発現調節遺伝子である *invE*、EAEC は凝集性附着プラスミドマーカー CVD432 や凝集性絨毛遺伝子群の発現調節遺伝子である *aggR* が標的遺伝子とされることが多い<sup>7-10)</sup>。ETEC の LT 遺伝子や ST 遺伝子を検出するプライマーもいくつか報告されているが、ST には塩基配列の異なる STh と STp があり、プライマーによっては STp が検出されないことがある<sup>11,12)</sup>。これらに EHEC の VT 遺伝子を加えたマルチプレックス PCR で、網羅的に下痢原性大腸菌を検査する方法も報告されているが、増菌培養液や分離培地の濃厚発育部位からテンプレート

表1 主なプライマーの配列

検出遺伝子	プライマー	配列 (5'→3')	アニーリング温度	増幅サイズ (bp)	文献
<i>eae</i>	eaek1 EA2	GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT CTCTGCAGATTAACCTCTGC	55°C	591 bp	7
EAF	EAF1 EAF25	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA	60°C	397 bp	8
<i>invE</i>	I-1 I-5	ATATCTCTATTTCCAATCGCGT GATGGCGAGAAATTATATCCCG	55°C	382 bp	9
<i>aggR</i>	aggRKs1 aggRKas2	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	55°C	254 bp	7
CVD432	start stop	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	53°C	630 bp	10
LT	TW20 JW11	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATAITCCCTGTT	55°C	450 bp	11
STh	STIb 1 STIb 2	CCCTCAGGATGCTAAACCAG TTAATAGCACCCGGTACAAGC	55°C	166 bp	12
STp	STIa 1 STIa 2	TCTGTATTATCTTTCCCTC ATAACATCCAGCACAGGC	55°C	186 bp	12

を作製して実施する場合には、非特異バンドに注意する<sup>13,14)</sup>。EIEC、ETECについては上記標的遺伝子検出用のプライマーセットおよびプライマーを含む反応液が分注された One Shot PCR Kit (タカラバイオ) が市販されている。

従来からの PCR 法に代わり、電気泳動を必要とせず、より迅速性に優れたリアルタイム PCR 法が注目されている。リアルタイム PCR 法は、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もので、専用の装置を必要とする。蛍光検出方法にはインターカレーター法と蛍光標識プローブ法があり、前者は SYBR Green I のような二本鎖 DNA に結合する蛍光物質を使用して増幅産物を検出するもので、福島らは糞便から DNA を抽出し、下痢原性大腸菌を含む主要な食中毒菌 8 菌種を 2 時間以内に検出できる迅速スクリーニング法を報告している<sup>15)</sup>。後者には TaqMan プローブ、Molecular Beacon、サイクリングプローブなど多くの種類があり、蛍光色素の種類を組み合わせることによりマルチプレックス PCR も可能である。下痢原性大腸菌を検出する報告も散見されるが、今後優れた検出系が確立し普及することが期待される。

### 3. 毒素検出法

ETEC の産生する LT および ST は、それぞれ逆受

身ラテックス凝集反応 (RPLA) 法を用いた VET-RPLA (デンカ生研)、競合的酵素抗体 (ELISA) 法を用いたコリスト EIA (デンカ生研) で免疫学的に検出することができる。取扱説明書に記載されている被検液調整法はやや異なるが、同時に検査する場合は被検株を CAYE 培地で一夜振盪培養し、培養液にポリミキシン B を 5000 単位/mL になるよう加えて 30 分反応させた後、遠心上清を使用する。RPLA 法は被検液と試薬を混合後一夜静置して判定するが、ELISA 法は約 3 時間で判定可能であり陽性対照および陰性対照の色調と比較して肉眼で判定する。

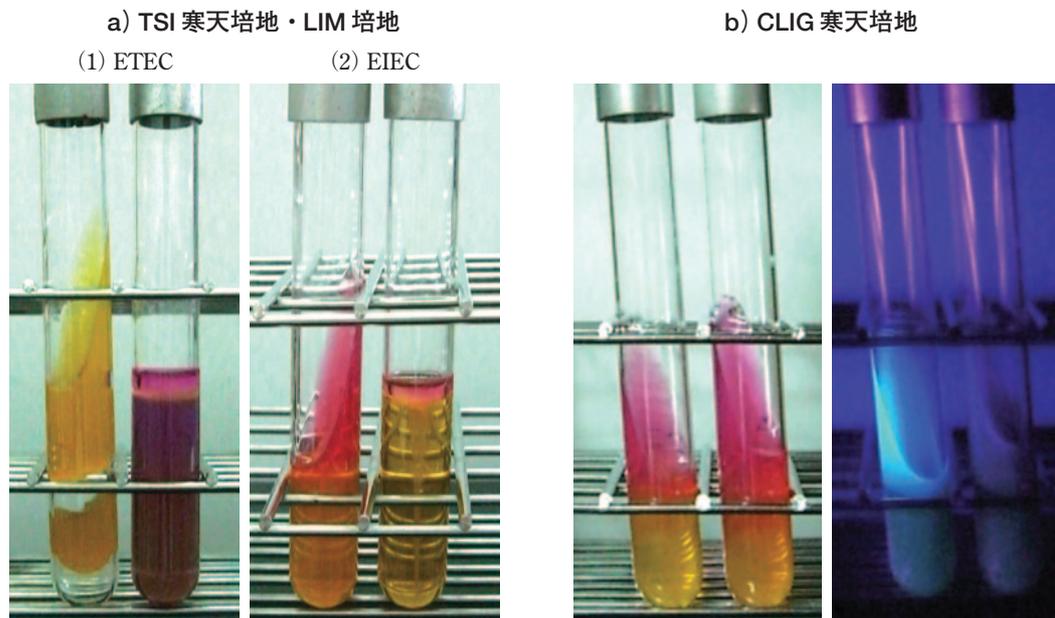
### 4. EIEC 同定の問題点

EIEC の病原性関連遺伝子は赤痢菌と同じで、PCR 法だけでは両者は区別できない。また、生化学的性状もよく似ており、一般的な大腸菌のほとんどが陽性となるブドウ糖からのガス産生や乳糖分解性、リジン脱炭酸酵素、運動性で陰性を示す株が多い (図 1, 2)。O 抗原も赤痢菌と同一あるいは交差反応を示す場合があり、同定にはマンニット分解性や酢酸ナトリウム利用能など生化学的性状試験の追加を必要とする<sup>16)</sup>。両者は DNA 相同性も高く、分類学的に区別することは困難だが、感染症法では細菌性赤痢は 3 類感染症であり、迅速で正確な鑑別方法の開発が待たれる。



図 1 DHL 寒天平板上の ETEC と EIEC のコロニー

EIEC (矢印) は白色コロニーを、ETEC は赤色コロニーを形成する



*E. coli* は TSI で斜面部高層部ともに陽性 (黄色) でガス産生、LIM でリジン脱炭酸陽性、インドール陽性、運動性陽性を示すことが多いが、EIEC は陰性のことが多い。一部の赤痢菌はインドール陽性を示すことから、EIEC は赤痢菌との鑑別が重要である。

CLIG は斜面部でセロビオース分解能 (*E. coli* は陰性、他の *Escherichia* 属菌は陽性) を、紫外線照射により  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性 (*E. coli* の 95% は陽性) を判定する。

図 2 確認培地の判定例

## 文 献

- Nataro JP, *et al.*: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., **11** : 142-201, 1998.
- 伊藤健一郎: EPEC (腸管病原性大腸菌). 食品由来感染症と食品微生物 (仲西寿男, 丸山務監修), 中央法規出版, 252-262, 2009.
- Qadri F, *et al.*: Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries : epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin. Microbiol. Rev., **18** : 465-483, 2005.
- 久高潤ら: 食中毒及び感染性胃腸炎の病原体と臨床症状. 感染症誌, **79** : 864-870, 2005.
- 加藤玲ら: 散発下痢症患者由来大腸菌の腸管病原性大腸菌 (EPEC) *eaeA* 遺伝子および腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) *aggR* 遺伝子保有状況とその病原性の評価. 感染症誌, **76** : 721-729, 2002.
- Yatsuyanagi J, *et al.*: Characterization of Enteropathogenic and Enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. J. Clin. Microbiol., **40** : 294-297, 2002.
- 小林一寛ら: 下痢病原性大腸菌における付着性因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察. 感染症誌, **76** : 911-920, 2002.
- Franke J, *et al.*: Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. J. Clin. Microbiol., **32** : 2460-2463, 1994.
- 伊藤文明ら: 混合プライマーを用いた PCR 法による下痢病原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法. 日本臨牀, **50** : 343-347, 1992.
- Shimids H, *et al.*: Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., **33** : 701-703, 1995.
- Stacy-Phipps S, *et al.*: Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. J. Clin. Microbiol., **33** : 1054-1059, 1995.
- Schultsz C, *et al.*: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probe and PCR. J. Clin. Microbiol., **32** : 2393-2397, 1994.
- Fujioka M, *et al.*: Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Jpn. J. Infect. Dis., **62** : 476-480, 2009.
- Toma C, *et al.*: Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., **41** : 2669-2671, 2003.
- 福島博ら: リアルタイム PCR 法による食中毒菌の迅速スクリーニングの検討. 感染症誌, **79** : 644-655, 2005.
- 松下秀: 赤痢菌同定における留意点. 病原微生物検出情報, **24** : 212-213, 2003.