

原因不明食中毒の解明に関する調査研究

八柳 潤 齊藤志保子 鈴木 陽子 木内 雄 佐藤 宏康

秋田県では原因不明食中毒事例の割合が全国と比較して高く、且つ、下痢原性大腸菌を病因物質とした食中毒事例が確認されていなかったことから、原因細菌が検出されなかった食中毒事例を対象として Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により毒素原性大腸菌 (ETEC)、組織侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC)、接着絨毛破壊性大腸菌 (AEEC) の検索を実施した。また、原因と考えられる細菌が全く検出されなかった事例については Small Round Structured Virus (SRSV) の検索を実施した。検討した食中毒11事例のうち、7月、8月、3月に発生した事例では患者便から ETEC (O169 : H41とO6群)、EPEC (O1 : H7とO1 : NM)、EAggEC (O111 : NM) がそれぞれ分離され、秋田県においても下痢原性大腸菌による食中毒事例が発生していることが確認された。8月に発生した事例では、同一事例から複数の血清型の EPEC (O1 : H7とO1 : NM) が分離され、且つそれらの株からいずれも既知病原因子が検出されなかった。分離株のパルスフィールド電気泳動パターンを比較した結果、O1 : NM が当該事例の原因菌である可能性が分子疫学的に示唆されたが、当該株の下痢原性の有無、病原因子の詳細については今後の検討が必要であった。一方、12月から2月に発生した8事例のうち、7事例から SRSV が分離され、秋田県においても冬季に SRSV による食中毒様事例が発生していることが初めて確認された。

下痢原性大腸菌のうち、EPEC の一部を除く、病原因子が解明されている菌種はその病原因子をコードする遺伝子をターゲットとしたPCR法により迅速、且つ確実に分離・同定することが可能であることが明らかとなり、PCR 法は食中毒発生時に食品衛生行政をサポートする上で有用と考えられた。

キーワード：原因不明食中毒、下痢原性大腸菌、Small Round Structured Virus、Polymerase Chain Reaction

I はじめに

全国食中毒事件録によると、昭和60年から平成6年の10年間に全国で発生した食中毒事例のうち、原因不明となった事例は全体の16.3%であったのに対して、秋田県では21.4%と若干高率であった。同期間に全国では、毒素原性大腸菌や病原血清型大腸菌などの下痢原性大腸菌が病因物質とされた事例が細菌性食中毒の4.3%を占めているが、秋田県では下痢原性大腸菌による食中毒事例は全く報告されていない。

下痢原性大腸菌は病原機構の違いから毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli* : ETEC)、組織侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli* : EIEC)、腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli* : EHEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (Enteraggregative *E. coli* : EAggEC) として接着絨毛破壊性大腸菌 (Attaching and effacing *E. coli* : AEEC) に分類される。また、特定の血清群や血清型に属するが、病原機構は不明である一群が病原血清型大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli* : EPEC) と呼ばれてきた。これらの下痢原性大腸菌を同定する場合、市販の血清キットにより1次スクリーニングを実施した後、エンテロトキシンやベロ毒素などの病原因子を検出する必要があり、EPEC の同定には O : H 血清型の決定が

必要である。病原因子の検出は下痢原性大腸菌の同定に必須であるが、その同定を繁雑にする要因でもあった。しかし、近年、Polymerase chain reaction (PCR) 法の導入により下痢原性大腸菌の同定が容易、且つ確実となった。

我々は平成7年1月に県内で発生した食中毒様事例の原因菌が EAggEC Heat-stable enterotoxin-1 (EAST-1) 遺伝子を保有する EPEC O126 : NM である事を報告した¹⁾。後に、当該株が EAggEC の凝集性付着能発現に関する regulator gene である aggR 遺伝子を保有する EAggEC であることが明らかとなり、秋田県内でも下痢原性大腸菌による集団感染事例が発生していたことが明らかになったと同時に、下痢原性大腸菌の迅速同定法として PCR 法が極めて有用であることが確認された。

このような背景から、県内で全く不明であった下痢原性大腸菌による食中毒事例の発生実態を解明する目的で、PCR 法を使用して食中毒患者便からの下痢原性大腸菌の検出を試みた。さらに、病因物質と考えられる細菌が全く検出されなかった事例については下痢原性ウイルスの検索を実施した。

表1 下痢原性大腸菌とSRVの検索成績

事例番号	発生日	検出病因物質	備考
1	7	EPEC (O169 : H41, O6群)	耐熱性エンテロトキシン陽性
2	8	EPEC (O1 : H7, O1 : NM)	既知病原因子を保有せず
3	12	SRSV	
4	12	不検出	キャリアブレイ入り糞便からSRV検出を実施
5	12	SRSV	EAggEC (O44 : NM) 混合感染
6	12	SRSV	
7	12	SRSV	
8	12	SRSV	
9	12	SRSV	
10	2	SRSV	
11	3	EAggEC (O111 : NM)	EAST-1 ²⁾ 、aggR

1) : 被験者5名中SRV陽性5名、EAggEC陽性1名

2) : EAggEC heat-stable enterotoxin-1

II 材料と方法

1. 検体

平成8年度に県内で発生した食中毒事例のうち、食中毒原因細菌が検出されなかった11事例の便を供試した。

2. 下痢原性大腸菌の検索

既報²⁾に従い検索を実施したが、Non-O157 EHECの検索にはEC培地とDHL、O157の検索にはノボビオン加mEC培地とCT-SMACを使用した。

3. SRSVの検索

食中毒患者便について、Utagawa、35/38、Yuriプライマーを使用したRT-PCR法(本誌別稿)、および電顕によりSRSVを検索した。

III 結果および考察

表1に下痢原性大腸菌およびSRSVの検索成績を示した。検討した11事例のうち、7月、8月、および3月に発生した3事例から下痢原性大腸菌が分離された。7月に発生した事例1は耐熱性エンテロトキシン陽性のEPEC(血清型O169 : H41とO6群が混合感染)が病因物質であった。なお、事例1は台湾旅行者が発症した事例であり、同時期に横浜市、広島県、高知県でも台湾旅行者が発症して患者から耐熱性エンテロトキシン陽性のEPEC(O169 : H41)が分離された。そこで、横浜市、広島県、高知県の衛生研究所と情報、及び分離株を交換し、患者が台湾で利用した飲食店、および分離株のパルスフィールド電気泳動(PFGE)パターンを比較検討した結果、本県を含めた3県1市で発生した患者は台湾旅行中に共通の飲食店でEPECに感染したものと推

定された³⁾。

事例2では患者が受診した医療機関の検査室で分離されたE. coli O1群5株について性状、病原因子の保有状況を調査したところ、5株の血清型はすべて同一ではなく、O1 : H7が2株、O1 : NMが3株であった。これらはいずれもEPECとして報告のある血清型であったが、5株はすべて既知病原因子のいずれをも保有しなかった。このように同一事例から複数の血清型のEPECが分離されたこと、および分離株が既知病原因子を全く保有していなかったことから、分離された5株については下痢原性を証明すること、および今回の事例の病因物質であると断定することができなかった。そこで、5株の分子疫学的性状を比較する目的でNotI PFGEパターンを比較したところ、データは示さないがO1 : NM3株のパターンが同一であること、およびO1 : H72株のパターンはお互いに異なり、O1 : NMのパターンとも異なることが明らかとなった。以上の成績はO1 : NMが今回の事例の病因物質である可能性を示唆していたが、その下痢原性を証明するためには今後さらに検討が必要であると考えられた。

事例11で分離されたO111 : NMは既知EPECの血清型であるが、当該株はEAST-1とaggRを保有していることからEAggECであることが明らかとなった。なお、AEEC、EHEC、EIECはいずれの事例からも検出されなかった。

一方、12月から2月にかけて発生した8事例では原因と考えられる細菌が全く分離されなかった。これらについてSRSVの検索を実施したところ、7事例からSRSV

が検出された。SRSV が検出されなかった1事例についてはキャリアブレイク培地に採取された糞便を検体としており、アガロース中の成分により PCR が妨害されたものと推定された。なお、SRSV の検出などについては別稿に詳述してある。今回の検討により、冬季間、秋田県においても SRSV による食中毒様事例が発生していることが初めて確認された。

平成7年1月の事例¹⁾、および今回の事例11の検討結果から、血清型から EPEC と同定された菌の中に、保有する病原因子から EAggEC と同定されるものがあることを明らかにした。一方、EPEC の病原因子としては以前から eaeA が同定されており²⁾、eaeA を保有する大腸菌は AEEC とも呼ばれている。これらのことから、EPEC には病原機構が異なる複数の菌種が含まれているといえよう。また、EPEC の中には未だに病原機構が解明されていない菌種が存在する可能性も否定できない。実際、今回、事例2で分離された EPEC O1 : NM は疫学的に下痢原性が推定されるにもかかわらず、既知病原因子が検出されなかった。この EPEC O1 : NM のような菌が実際に下痢原性を有するかどうかについて、また、その病原機構、病原因子については今後解明される必要がある。下痢原性大腸菌のうち、EPEC の一部を除く、ETEC、EAggEC など病原因子が解明されている

菌種はその病原因子をコードする遺伝子をターゲットとした PCR 法により迅速、且つ確実に分離・同定することが可能である。実際、今回、最短では糞便を受領した翌日に原因菌の分離・同定、血清群の決定が可能であった。今後、この技術を導入することにより食品衛生行政をサポートすることが可能と考えられる。

IV 文 献

- 1) 八柳 潤, 他. 腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン-1 (EAST-1) 遺伝子を保有する食中毒様事例由来病原血清型大腸菌. 感染症学雑誌, 1996 ; 70 : 73-79.
- 2) 八柳 潤, 他. 水系感染集団事例から分離された毒素原性大腸菌および腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン-1 (EAST-1) 遺伝子保有大腸菌の性状. 感染症学雑誌, 1996 ; 70 : 215-223.
- 3) 八柳 潤, 他. 国内多地域で同時期に発生した毒素原性大腸菌 O169 : H41による海外旅行者下痢症-秋田県, 横浜市, 広島県, 高知県. 病原微生物検出情報, 1997 ; 18 : 157-158.
- 4) Donnenberg, S. and Kaper, J. B., Enteropathogenic *Escherichia coli*., *Infect. Immun.*, 1992 ; 60 : 3953-3961.