

資料

感染症発生動向調査事業における下痢原性大腸菌の検出状況

濱田 まどか 石谷 完二 濱田 結花
 上村 晃 秀¹ 御供田 睦代 岩切 忠文

1 はじめに

大腸菌は人や動物の腸管内に存在し、ほとんどは病原性を持たないが、一部に下痢を引き起こすものがあり、下痢原性大腸菌と総称され、病原因子を検査することで非病原性の大腸菌と鑑別することができる。

2012年1月に、感染症サーベイランスシステム (NESID) の病原体検出情報システムにおける下痢原性大腸菌の分類方法が、病原因子に基づくように改訂された¹⁾ (表1)。

今回、当センターで分離された下痢原性大腸菌の検出状況及び臨床症状等について報告する。

2 対象及び方法

2.1 対象

2006年4月から2013年3月までに、感染症発生動向調査事業の病原体定点医療機関で感染性胃腸炎と診断され、当センターに検体が搬入された患者759名を対象とした。

2.2 方法

2.2.1 検査方法

下痢原性大腸菌の検出は、図1のとおり実施した。

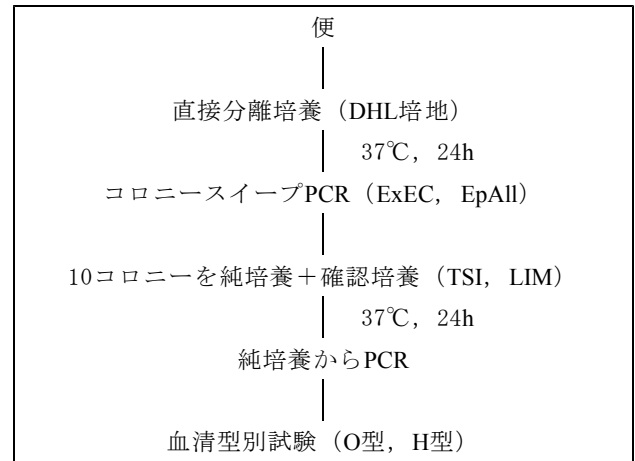


図1 当センターの下痢原性大腸菌検査法

表1 下痢原性大腸菌の分類

分類	発症機序	病原因子 マーカー	定義
腸管出血性大腸菌 (EHEC)	毒素	VT1, VT2	Vero毒素産生性あるいはVT遺伝子が確認されたもの。
腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)	毒素	LT, ST	易熱性エンテロトキシン (LT), 耐熱性エンテロトキシン (ST), あるいはその両者の産生性あるいは毒素遺伝子が確認されたもの。
腸管侵入性大腸菌 (EIEC)	侵入性	<i>invE</i> , <i>ipaH</i>	組織侵入性プラスミドを保有していること。あるいは組織侵入性遺伝子が確認されたもの。
腸管病原性大腸菌 (EPEC)	細胞局在 付着性	<i>eae</i> , <i>bfpA</i> EAF	培養細胞への局在付着性、または、それに関連する遺伝子が確認されたもの。VT, LT, ST, 侵入性が確認されたものを除く。
腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC)	細胞凝集 付着性	<i>aggR</i> CVD432	培養細胞への凝集付着性、または、それに関連する遺伝子が確認されたもの。VT, LT, ST, 侵入性が確認されたものを除く。
他の下痢原性大腸菌 (DAEC, EAST1EC等)	不明	<i>afa</i> , <i>astA</i> CDT, <i>cnf</i>	上記5つに該当しないが胃腸炎の原因菌と考えられるもの。生化学的性状が同じものが多数の患者より検出された場合。

1 鹿児島県始良・伊佐地域振興局保健福祉環境部

〒899-5112 鹿児島県霧島市隼人町松永3320-16

コロニースイープPCRのテンプレートは、DHL寒天培地上の濃厚発育部位から菌を適量掻き取り、5%キレックス液200μLに懸濁、100℃10分後、12000rpmで5分間遠心した上清を用いた。純培養からのPCRのテンプレートは、BHI寒天培地上の菌を適量掻き取り、滅菌蒸留水100μLに懸濁、100℃10分間加熱したものを用いた。

PCRは、表2のプライマーを用い、表3-1,2のとおり反

応液を調整後、表4の反応条件で行った。

2. 2. 2 調査方法

医療機関から当センターに提出された五類感染症検査票の情報をもとに、発症月別、性別、年齢別及び臨床症状を解析した。

表2 プライマーの塩基配列

EHEC (VT1) 234bp		EHEC (VT2) 234bp	
mMK1_1	GAA TTT ACC TTA GAC TTC TCG AC	mMK2_1	GAG TTT ACG ATA GAC TTT TCG AC
mMK1_2	TGT CAC ATA TAA ATT ATT TCG TTC	mMK2_2	GGC CAC ATA TAA ATT ATT TTG CTC
ETEC (ST1a) 179bp		ETEC (ST1b) 179bp	
ST1a_s	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	ST1b_s	TTT ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT TT
ST1a_as	GGA TTA CAA CAA AGT TCA CAG	ST1b_as	GGA TTA CAA CAC AAT TCA CAG
ETEC (LT) 123bp		EIEC (<i>invE</i>) 379bp	
LT-11	CCC ACC GGA TCA CCA	I-1	ATA TCT CTA TTT CCA ATC GCG T
LT-2	GTG CTC AGA TTC TGG GTC TC	I-51	GGC GAG AAA TTA TAT CCC G
EPEC (<i>eae</i>) 310bp		EAggEC (<i>aggR</i>) 280bp	
mSK1	CCG GCA CAA GCA TAA GC	aggRk_multi_S2	AGC AGC GAT ACA TTA AGA CG
eaekas_a	TGG CAA AAT GAT CTG CTG	aggRk_multi_AS2	GAC CTT ATC GGA AAA GAA GC
DAEC (<i>afaD</i>) 207bp		EAST1EC (<i>astA</i>) 109bp	
afaDks1	GGG AGT ATA AGG AAG ATG ATG C	EASTOS1	GCC ATC AAC ACA GTA TAT CCG
afaDkas1	GTC CAC CTG ACG CTC A	EASTOAS2	CGC GAG TGA CGG CTT TGT AG

表3-1 ExEC反応液の調整

試薬	濃度	1test (μL)	最終濃度
Go Taq Green Buffer	×5	5.0	×1
MgCl ₂	25mM	1.5	1.5mM
dNTP	2.5mM	1.0	0.1mM
Primer混液VT1	10μM	0.25	0.1μM
Primer混液VT2	10μM	0.25	0.1μM
Primer混液ST1a	10μM	0.25	0.1μM
Primer混液ST1b	10μM	0.5	0.2μM
Primer混液LT	10μM	0.25	0.1μM
Primer混液 <i>invE</i>	10μM	0.25	0.1μM
Taq DNA ホ ^レ リメラーゼ ^ホ	5u/μL	0.1	0.5unit
DW		12.65	
テンプレート		3.0	
合計		25.0	

表3-2 EpAll反応液の調整

試薬	濃度	1test (μL)	最終濃度
Go Taq Green Buffer	×5	5.0	×1
MgCl ₂	25mM	1.5	1.5mM
dNTP	2.5mM	1.0	0.1mM
Primer混液 <i>eae</i>	10μM	0.25	0.1μM
Primer混液 <i>aggR</i>	10μM	0.25	0.1μM
Primer混液 <i>afaD</i>	10μM	0.25	0.1μM
Primer混液 <i>astA</i>	10μM	0.25	0.1μM
Taq DNA ホ ^レ リメラーゼ ^ホ	5u/μL	0.1	0.5unit
DW		13.4	
テンプレート		3.0	
合計		25.0	

表4 PCR反応条件

反応	前熱変性	熱変性→アニーリング→伸長：30サイクル		最終伸長	保存
ExEC	94℃, 5min	94℃, 30sec	50℃, 60sec	72℃, 10min	4℃
EpAll			55℃, 60sec		

3 結果

3.1 検出状況

下痢原性大腸菌の検出状況を表5に示す。759名のうち66名(8.7%)の患者便から、腸管病原性大腸菌(EPEC)が17件、腸管凝集付着性大腸菌(EAggEC)が19件、他の下痢原性大腸菌のうち、*afaD*陽性の分散付着性大腸菌(DAEC)が11件、*astA*陽性のEAST1単独保有大腸菌(EAST1EC)が26件、計73件(2種類検出が7名)検出された。ExECの下痢原性大腸菌(EHEC, ETEC, EIEC)は検出されなかった。73件のうち49件(67.1%)は、他の細菌・ウイルスも同時に検出された。最も多く検出されたのはノロウイルスで31件であった。

血清型別では、O不明(市販の血清型に凝集しない)が39件で最も多く、53.4%を占めた。

発症月別の検出率は、8月が最も高く21.9%(8月の検体数32件中7件)であった(図2)。

性別では、男女共に検出率が8.7%(男性:415名中36名、女性:344名中30名)で差はみられなかった。

年齢別では、0~2歳が35名で最も多く、男女共に5歳以下が80%を占めた(図3)。

3.2 臨床症状

検出病原体別の臨床症状を表6に示す。EPECのみ検出された患者は、発熱が83.3%で最も多く、嘔吐が33.3%で最も少なかった。EAggECと他の下痢原性大腸菌は、嘔吐が最も多く、下痢は50~66.7%であった。

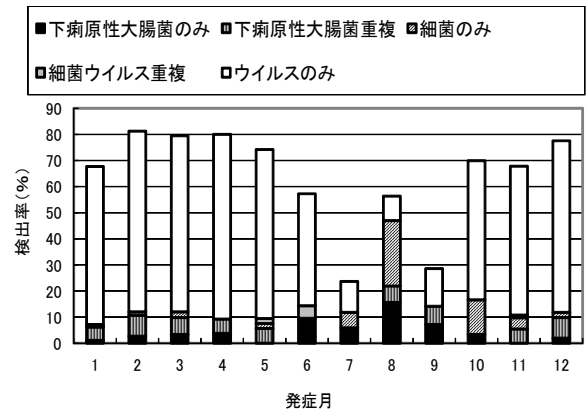


図2 発症月別検出率

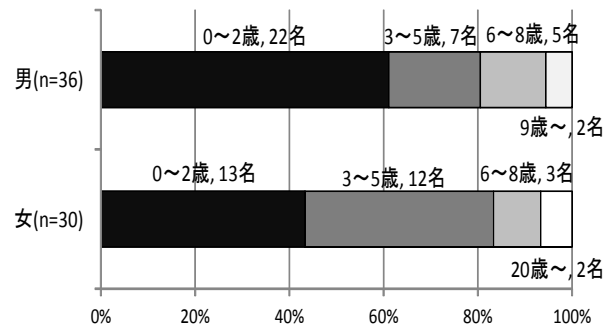


図3 性・年齢別検出数

表5 下痢原性大腸菌検出状況

下痢原性大腸菌	腸管病原性 (EPEC)	腸管凝集付着性 (EAggEC)	他の下痢原性 (DAEC)	他の下痢原性 (EAST1EC)	合計
血清型別検出数	OUT:HUT : 5	O111:H21 : 2	OUT:H- : 5	OUT:H- : 9	OUT : 39
	OUT:H- : 4	O111:HUT : 2	OUT:HUT : 2	OUT:HUT : 5	O111 : 5
	OUT:H6 : 1	O111:H- : 1	OUT:H6 : 1	OUT:H4/5/6/18 : 4	O126 : 5
	O103:H- : 2	O126:H27 : 4	O25:H- : 1	O1:H45 : 1	O127 : 4
	O6:H- : 1	O126:HUT : 1	O86:H18 : 1	O1:H12 : 1	O25 : 4
	O55:H6 : 1	O127:H21 : 4	O25:H4 : 1	O6:H- : 1	O103 : 2
	O119:HUT : 1	O25:HUT : 1		O8:H7 : 1	O6 : 2
	O145:HUT : 1	O25:H- : 1		O74:H6 : 1	O86 : 2
	O153:H7 : 1	OUT:HUT : 2		O86:H18 : 1	O1 : 2
		OUT:H- : 1		O111:HUT : 1	その他 : 8
			O112:HUT : 1		
	小計 : 17	小計 : 19	小計 : 11	小計 : 26	73
ノロウイルス重複数	8	6	7	10	31
ロタウイルス重複数	2	5	2	7	16
重複感染合計	11 (64.7%)	11 (57.9%)	9 (81.8%)	18 (69.2%)	49 (67.1%)

表6 検出病原体別臨床症状

症状	下痢原性大腸菌 全体 (n=66)	EPEC単独 (n=6)	EAggEC単独 (n=8)	他の下痢原性大 腸菌単独 (n=9)	細菌単独 (n=24)	ウイルス単独 (n=453)	陰性 (n=213)
嘔吐	56 (84.8%)	2 (33.3%)	7 (87.5%)	8 (88.9%)	4 (16.7%)	398 (87.9%)	142 (66.7%)
下痢	46 (69.7%)	3 (50.0%)	4 (50.0%)	6 (66.7%)	18 (75.0%)	398 (87.9%)	171 (80.3%)
発熱	34 (51.5%)	5 (83.3%)	5 (62.5%)	6 (66.7%)	15 (62.5%)	263 (58.1%)	138 (64.8%)

4 考察及びまとめ

2006年4月から2013年3月までの7年間に提出された感染症発生动向調査事業における感染性胃腸炎の患者便から、下痢原性大腸菌73件が検出された。しかし、そのうち49件は他の病原微生物も検出されており、下痢原性大腸菌が胃腸炎の原因菌であると判定することは難しいと思われた。特に、下痢原性がまだ明らかになっていない他の下痢原性大腸菌のDAECは、80%以上が重複感染であった。

また、O抗原が不明のものが半数以上あり、血清型別試験よりも病原因子の検査を先に実施しなければ、見落とされてしまう下痢原性大腸菌が多数あることが改めて確認できた。

発症月別では、11月から2月はノロウイルスと、3月から5月はロタウイルスとの重複感染が多くみられたが、6月から8月は単独感染が多かったことから、夏季の感染

性胃腸炎においては、下痢原性大腸菌が原因である可能性が高いと思われた。

下痢原性大腸菌の臨床症状は、下痢が主症状であるといわれているが、今回の調査では、EPEC以外は嘔吐が主症状であった。これは、指標としている病原因子と下痢原性の関係が、未だ明らかになっていないためと思われた。

下痢原性大腸菌はまだ不明な点が多いが、集団発生事例や食中毒事例も発生していることから、今後も検査を実施し情報の集積に努めたい。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター；病原微生物検出情報，33 (1)，1～7 (2012)