

IV 事例報告

4種の毒素原性大腸菌が分離された海外旅行者下痢症例

財津 修一¹・椿本 亮¹・池田 嘉子¹
栗原 淑子¹・小田 隆弘²

An Outbreak of Traveller's Diarrhea Infected with Four Types of Enterotoxigenic *Escherichia coli*.

Shuichi ZAITSU, Makoto TSUBAKIMOTO, Yosiko Ikeda
Yoshiko KURIHARA and Takahiro ODA

要 旨

平成8年7月4日から7日にかけて台湾にツアー旅行をした35名のうち15名が帰国後に下痢、腹痛、悪寒、発熱等の食中毒症状を示した。患者15名の共通食は7月4日から7月7日までのツアー全食であり、それ以外の共通食は一切なかった。有症者7名および無症者2名のふん便について細菌検査を実施したところ、有症者6名からSTp産生性O169:H41, STh産生性O25:H-, LTおよびSTh産生性O型別不能株、およびLT産生性O型別不能株の計4種の毒素原性大腸菌が検出された。

Key Words: 毒素原性大腸菌 Enterotoxigenic *Escherichia coli*

旅行者下痢症 Traveller's diarrhea, 混合感染 mixed infection

コロニースイープ法 Colony Sweep, PCR法 PCR

易熱性エンテロトキシン LT, 耐熱性エンテロトキシン ST, STp, STh

I はじめに

毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, 以下 ETEC) は古くから海外旅行者下痢症の原因菌として注目されている菌であり、平成3年の大阪空港検疫所の報告においても ETEC の検出率が 13.97% と他検出菌種に比べて高い割合を示している¹⁾。

本事例は台湾ツアー旅行者が帰国後に症状を起こした ETEC 感染事例であり、当所において有症者7名のふん便 (以下、検体1~7) および無症者2名のふん便 (以下、検体8, 9) の細菌検査を行ったところ、有症者6名から4種の ETEC が分離されたので報告する。このように、複数の ETEC が同一事例において検出されたことは過去にも福岡市²⁾、大阪府³⁾等においてまれにみられたが、本事例のように4種もの ETEC が検出された事例はなかった。

II 発生状況

平成8年7月4日から7日にかけて台湾にツアー旅行した35名のうち15名が帰国後に食中毒症状を示した。患者の共通食は7月4日から7月7日までのツアー全食であり、それ以外の共通食は一切なかった。

患者15名の性別、年齢、症状、初発日時を表1に示した。水様下痢は患者15名全員が発症し、下痢の回数は2回から15回で、平均7回以上であった。また、悪寒は患者6名、腹痛5名、頭痛5名、嘔吐2名、吐気1名であり、5名が37.3℃から39.0℃の発熱をした。初発日時は8日9:00から9日24:00までの間であった。

III 材料および方法

1. PCR法によるスクリーニング

検体1~9をDHL寒天培地(ニッスイ)に塗抹し、37℃で1夜培養した。次に、Karmaliらのコロニースイープ法⁴⁾に準じて、培養後のDHL平板上の密集コロニー部分の菌苔1白金耳分を掻き取った。このコロニー混合物を400μlの1% TritonX-100に浮遊させ、95℃、

1. 福岡市衛生試験所 微生物課

2. 福岡市衛生試験所 微生物課

(現所属: 中央保健所 衛生課)

5分間加熱後、12,000 rpm、3分間遠沈し、その上清を鋳型DNA液とした。各検体につき鋳型DNA液10 μ lをPCRに用いた。プライマーはLT検出用にELT-1、-2 (TaKaRa)を、STh検出用にESH-1、-2 (TaKaRa)を、STp検出用にESP-1、-2 (TaKaRa)をそれぞれ用いた。ポリメラーゼはTaKaRa Taqを用い、10 \times バッファー、dNTP Mixtureはポリメラーゼに添付されているものを用いた。PCR条件は添付説明書に従い、熱変性を94 $^{\circ}$ C、1分間、アニーリングを55 $^{\circ}$ C、1分間、DNA伸長を72 $^{\circ}$ C、1分間で行い、これを35サイクル行った。上記3種プライマーのいずれかで各毒素遺伝子に対応する増幅バンドが認められた場合をスクリーニング陽性とした。

2. 釣菌およびスクリーニング

PCRによるスクリーニングで陽性となったものについては、DHL平板上の分離しているコロニーを100個程度釣菌し、シモンズクエン酸ナトリウム培地(栄研)およびトリプトソイ寒天(TRIPTIC SOY BROTH (Difco), BACTO AGAR (Difco). 1%)に接種した。37 $^{\circ}$ C、1夜培養後、シモンズクエン酸ナトリウム培地に生育しなかった株を推定大腸菌と見なした。

3. ETEC株の検索および同定、血清型別

推定大腸菌について個別にPCR法を用い、毒素産生性を調べた。但し、対象である株が各検体につき100株程度と非常に多かったため、10株程度を1グループとしてPCRを行い、陽性であるグループに関してのみ、

グループ内の個別の株に対してPCRを行う方法を採用した。試薬および条件は1.と同様にした。PCR陽性の株はTSI寒天培地(ニッスイ)、LIM培地(ニッスイ)に接種し、生化学的性状より大腸菌であることを確認し、病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて血清型別を行った。

IV 結 果

PCR法によるスクリーニングの結果と単独の分離菌株として得られたETECとの関係を表2に示した。検体1はLT、STp陽性で、STp産生性O169:H41(以下O169)が分離された。検体2はLT、STh、STp陽性であり、O169、LT産生性O型別不能株(以下OUT(LT+))、LTおよびSTh産生性O型別不能株(以下OUT(LT+, STh+))の3種のETECが分離された。O型別不能株のH型は共にH6であった。検体3はSTh、STp陽性であり、O169とSTh産生性O25:H- (以下O25)が分離された。検体4はSTp陽性であり、O169が分離された。検体5はLT、STh、STp陽性であったが、O169のみ分離された。検体6はSTh陽性であり、O25が分離された。検体7、8、9はPCR法によるスクリーニングで全てETEC陰性であった。最終的に患者7名中6人からO169、O25、OUT(LT+, STh+)およびOUT(LT+)の計4種のETECが検出された。

4種ETECの分離率を表3に示した。検体1においては85株の*E. coli*中、20株がO169であった。検体2では*E. coli*106株中O169が1株、OUT(LT+,

表1 患者の症状と初発日時

| 検体名 | 性別 | 年齢 | 初発日時 | 下痢 | 腹痛 | 悪寒 | 頭痛 | 発熱 | その他 |
|-----|----|-----|---------|-------|----|----|----|-------------------|------|
| 検体1 | 女 | 72才 | 9日5:00 | 5回 | ○ | | | | |
| 検体2 | 男 | 30才 | 8日15:00 | 10回以上 | | ○ | | | |
| 検体3 | 男 | 39才 | 8日18:00 | 7回 | | ○ | | | |
| 検体4 | 女 | 50才 | 9日20:00 | 3回 | | | | | |
| 検体5 | 女 | 66才 | 8日15:00 | 10回 | ○ | | | | |
| 検体6 | 女 | 60才 | 9日8:00 | 3回 | | | | | |
| 検体7 | 女 | 64才 | 8日不明 | 5回 | | | | | |
| | 女 | 44才 | 8日9:00 | 2回 | | | | | |
| | 男 | 53才 | 8日17:00 | 15回 | ○ | ○ | ○ | 38.7 $^{\circ}$ C | |
| | 女 | 66才 | 8日18:30 | 8回 | ○ | | ○ | 36.6 $^{\circ}$ C | 吐気3回 |
| | 男 | 22才 | 8日20:00 | 10回以上 | | ○ | ○ | 39.0 $^{\circ}$ C | 嘔吐2回 |
| | 女 | 54才 | 8日22:00 | 10回 | | ○ | | 37.4 $^{\circ}$ C | |
| | 女 | 61才 | 9日5:30 | 4回 | | | | | 嘔吐1回 |
| | 男 | 49才 | 9日6:00 | 9回 | ○ | ○ | ○ | 37.3 $^{\circ}$ C | |
| | 女 | 49才 | 9日24:00 | 4回 | | | ○ | | |

表2 PCRによるスクリーニングの結果と分離された菌株の血清型及び毒素産生性

| 検体名 | LT | STh | STp | 分離された菌株 (毒素産生性) |
|-----|----|-----|-----|---|
| 検体1 | + | - | + | O169 (STp+) |
| 検体2 | + | + | + | O169 (STp+), OUT (LT+), OUT (LT+, STh+) |
| 検体3 | - | + | + | O169 (STp+), O25 (STh+) |
| 検体4 | - | - | + | O169 (STp+) |
| 検体5 | + | + | + | O169 (STp+) |
| 検体6 | - | + | - | O25 (STh+) |
| 検体7 | - | - | - | なし |
| 検体8 | - | - | - | なし |
| 検体9 | - | - | - | なし |

表3 4種EPECの分離率

| 検体名 | 釣菌した <i>E. coli</i> 数 | O169 | O25 | OUT (LT+, STh+) | OUT (LT+) |
|-----|-----------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| 検体1 | 85 | 20 (24%) | 0 | 0 | 0 |
| 検体2 | 106 | 1 (0.94%) | 0 | 4 (3.8%) | 1 (0.94%) |
| 検体3 | 117 | 1 (0.85%) | 108 (92%) | 0 | 0 |
| 検体4 | 10 | 1 (10%) | 0 | 0 | 0 |
| 検体5 | 117 | 101 (86%) | 0 | 0 | 0 |
| 検体6 | 55 | 0 | 5 (9.1%) | 0 | 0 |

STh+) が4株, OUT (LT+) が1株であった。検体3では *E. coli* 117株中1株がO169であり, 108株がO25であった。検体4では *E. coli* 10株中1株がO169であった。検体5では *E. coli* 117株中101株がO169であった。検体6では *E. coli* 55株中5株がO25であった。

なお, EPEC以外の食中毒菌は検体1~9において検出されなかった。

V 考 察

PCR法によるスクリーニングによって検出したEPECの毒素遺伝子と単独の分離菌株から得られた毒素遺伝子は, 検体2, 3, 4および6では一致した。検体1および5では, PCR法によるスクリーニングで多種類の毒素遺伝子が検出されたが, それらの毒素遺伝子を持つ菌を単独の分離菌株として検出できなかった。これはPCR法の感度が高いために, 検体1においては85分の1以下, 検体5においては117分の1以下の非常に少ない割合で存在するEPECがスクリーニングで検出されたことによるものと考えられた。

また, 検体3では全 *E. coli* 中の92%をO25が占めたのに対し, 検体5では全 *E. coli* 中の86%がO169であったように, 検出された4種EPECの分離率は, 検体ごとに大きな差が見られ, 同一感染事例でありながら, 患

者ごとに分離されたEPECの種類と優性株が異なっていた。患者によって, 検出されたEPECの4種血清型の分離率が大きく異なったり, 無症者が多数いたことは, EPEC感染に対する抵抗力に大きな個人差があることを示しているものと考えられた。

本事例において, このように多種類の, しかも, 血清型不明のEPECまでが検出できた理由は, 多数のコロニーを混合して採取するコロニースイープ法と, 毒素遺伝子の検出感度が高いPCR法を組み合わせたスクリーニング法を用いたことにより, 表3に示したように, 全 *E. coli* 中0.85%しか存在しなかったEPECでも検出されたためであった。

同一事例から複数の病原菌が検出された報告は福岡市²⁾, 大阪府³⁾での事例にみられるよう, まれに見られたが, このように4種類ものEPECが検出された事例は今までに報告されていない。また, 検出された4種のEPECのうち2種は市販の病原大腸菌型別用血清にはない型であり, 病原大腸菌としては検出頻度が低いEPECであった。本事例は, ツアーの団体旅行でツアーの全食が共通食であったため, 感染源は明らかではないが, 患者15名の発症日時にばらつきがあることから, 検出された4種EPECは, ツアー食の単一の食事から摂取されたものかどうか不明であった。

文 献

- 1) 川瀬英嗣ら：大阪空港検疫所で検出された毒素原大腸菌について，臨床検査，35，405～408，1991
- 2) 小田隆弘ら：毒素原性大腸菌2種血清型が同時に検出された海外旅行者集団下痢症例，感染症学雑誌，57，180～185，1983
- 3) 塚本定三ら：毒素原性大腸菌O25：H42およびO169：H41の混合感染による食中毒とその感染経路について，日本食品微生物学会雑誌，12，129～134，1995
- 4) Karmari et al：J. Clin. Microbiol.，22，614～619，1985