

下痢原性大腸菌およびノロウイルス感染症の発生動向

吉野修司

宮崎県衛生環境研究所 微生物部

現在、下痢原性大腸菌は腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAaggEC) などに分類されている。このうち EHEC 感染症は全数把握の三類感染症として医師の届出が義務付けられている。また、EHEC は菌の分離に特化した培地の使用やイムノクロマト法による Stx (行政用語では VT) の検出により、医療機関でも検査は可能であり、毎年全国で 4000 件前後の届出がなされている。

一方、他の下痢原性大腸菌は PCR 法等による遺伝子検査で病原因子を調べないかぎり非病原性大腸菌との区別が困難で、下痢症の起原菌であるかどうかは判断できない。地方衛生研究所では食中毒や集団感染が発生した際、行政検査として起原菌および病原因子の特定を行うが、通常の医療機関等で病原因子の検出まで行える施設は限られており、EHEC を除く下痢原性大腸菌の発生動向は掴めていないのが現状である。また、最近では非典型的な大腸菌との鑑別が難しい *Escherichia albertii* も下痢症起原菌として認知されている。これまで分離された *E. albertii* は *eae* を保有し、菌株によっては *stx* の存在も認められていることから、別菌種である *E. albertii* を下痢原性大腸菌の範疇に含めるのか、行政的な位置づけをどうするかなどが曖昧で、下痢原性大腸菌の発生動向を把握するのはより困難な状況になっている。

ノロウイルス (NoV) は感染性胃腸炎の起原ウイルスの一つであり、現在まで培養細胞を用いた *in vitro* での完全な増殖は報告されていない。このため NoV は遺伝子群 (Genogroup: G I ~ G V) で分類されており、ヒトに感染する NoV が主に G I と G II であることから、現在のところ G I を 9、G II を 22 の遺伝子型 (genotype: G I. 1~9 および G II. 1~22) に細分類している。なお、多くの種類の遺伝子型はその抗原性も多様であることが示唆されており、簡易キットにおける偽陰性の一因となっている。また、通

常の診療では遺伝子型別は不要であるが、行政処分が伴う食中毒発生時などでは遺伝子型別まで求められる場合がある。2010 年~2013 年の各シーズンで報告された NoV の遺伝子型別は G II. 4 が最も多いが、シーズン毎に変動する場合があります (IASR Vol. 35 No. 7)、さらに新たに G II. 17 変異型も報告されていることから、今後の流行状況に注意する必要がある。

なお、これまで地方衛生研究所等で実施していた遺伝子型別は Capsid N/S 領域を標的にしたものであったが、2015/16 シーズンより RdRp/VP1 領域を標的にすることが推奨されており、それに伴い遺伝子型の表記も変更されている。

市中病院の下痢原性大腸菌検査

古谷 明子

国家公務員共済組合連合会 佐世保共済病院

大腸菌はヒトの腸管内における常在菌のひとつであるが、一部腸管内感染を引き起こすものがあり下痢原性大腸菌と総称される。2012年1月に国立感染症研究所および衛生微生物協議会により下痢原性大腸菌の病原因子や発症機序の違いからカテゴリーの見直しが行われ、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (enteroaggregative *Escherichia coli*, EAaggEC) の5つに分類されている。

下痢原性大腸菌の検査は、1944年に Kauffman によって血清型による病原大腸菌の分類が提唱されて以来長年に渡り、培地上に形成された大腸菌様コロニーを数個釣菌し、市販の病原大腸菌免疫血清に凝集するか否かで病原性を推定するという手法が用いられている。しかしこの検査方法では非病原性の大腸菌が病原大腸菌として報告されてしまうだけではなく、多くの下痢原性大腸菌感染症が見落とされるなどの問題点が指摘されている。

EHECは3類感染症で、診断した医師は届け出が義務付けられていることもあり、病原因子である毒素の産生性を確認できる選択培地や検査試薬が製品化され、一般の検査室でも検査方法がある程度確立されているが、それでも O157 や O26、O111 以外の血清型においては見落とされている可能性が高い。病原微生物検出情報によると、地方衛生研究所から報告された2014年のEHECの菌検出数は2289であり、全検出数におけるO血清群の割合は、O157が59%、O26が22%、O111は3.4%とそのほとんどを占めてはいるが、15.6%はそれ以外の型または型別不能のものであった。

下痢原性大腸菌を迅速、正確かつ簡便に検出する

ためには、便から直接もしくは選択培地上のコロニーからDNAを抽出し、PCR法による病原因子を検出する方法が最も優れているが、多くの検査室では未だに釣菌と病原大腸菌免疫血清型に依存した検査法で行っているのが現状である。

不十分な検査方法とわかっていても変更できない要因のひとつに保険点数がある。平成28年度診療報酬改定により、便培養検査は180点となった。20点増加したとはいえそれでも採算が取れない。しかし、病原大腸菌免疫血清型検査は「大腸菌血清型別検査」として180点保険収載されており、「大腸菌ベロトキシン定性」194点と併せて唯一算定できる検査である。また、その他の要因としてマンパワーやハード面なども関係していると思われる。

今回、下痢原性大腸菌の検査方法について県内の細菌検査室を有する市中病院を対象にアンケートによる調査を行った。本シンポジウムではその結果も含めて、検査方法の現状とそれぞれの検査室が抱える問題点について考えてみたい。

～血清型別試験と病原遺伝子の直接検出を目的とした PCR 検査について～

磯崎将博

天草地域医療センター

大腸菌はヒトの腸管の常在菌のひとつであるが、その中にはヒトや動物に対して下痢症を引き起こすものが存在し、これらは下痢原性大腸菌と総称される。下痢原性大腸菌は保有する病原因子や病原機序の違いにより、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)、EAEC (enteroaggregative *E. coli*, EAEC) などに分類される。

下痢原性大腸菌の検査法には、血清型別を前提とした分類法と PCR 法などを用いた直接病原因子を検出する方法がある。臨床検査室における下痢原性大腸菌検査は、古くから病原大腸菌免疫血清を用いた血清型別分類により行われてきた。しかし、血清型は病原性を表しているわけではないということや、大腸菌の O 抗原は約 180 種類存在しているが国内で検査可能な血清型はこのうちの 50 種類のみであり全てを網羅しているわけではないということ、さらには抗原間で交差反応を示すなど、血清型別を前提とした検査法の問題が指摘されてきた。しかしながら、今現在でも血清型別分類が用いられる理由は、例えば EHEC には O157 や O26 を含む 7major O groups など、病原性の種類により特定の血清型が偏って分布していることがわかっているためと考えられる。血清型別試験に対して否定的な意見が多いが、血清型別分類は確かに限界のある検査法ではあるものの、ある程度の精度を有する確立された検査法であることを忘れてはならず、もっと有効に活用されるべきである。

一方、PCR 法を用いた直接病原因子を検出する方法は、血清型に関係なく一度に複数の病原因子を迅速に検出することができるため、血清型別試験と比較しても優れた検査法であると言える。特に 2012

年 1 月の下痢原性大腸菌分類の見直し以降、EPEC、EIEC、EAEC の検出に関しては PCR 法は必須である。ただし、PCR 法にも注意を要する点がある。例えば、*invE* (侵入性因子) 陽性の場合には EIEC と *Shigella* の可能性があるため血清型や生化学性状試験を行い鑑別する必要がある。また、*eae* (細胞付着因子) 陽性の場合にも *E. coli* と *E. albertii* の鑑別が必要となる場合がある。さらに PCR 法では既知の病原因子をターゲットにするため未知の病原因子を検出することが出来ず見落とす可能性があることも理解しておく必要がある。

シンポジウムでは当院の取り組みを紹介し、下痢原性大腸菌検査、特に PCR 検査に対する理解を深めていただきたいと考える。シンポジウムに参加の皆さんとこれからの下痢原性大腸菌検査について活発な意見交換ができれば幸いである。

「ノロウイルス抗原検出キット～正しく検査するために～」

加藤大介

デンカ生研株式会社 研究開発センター

ノロウイルス感染症の検査試薬で体外診断用医薬品として上市されている試薬は ELISA 法を原理とした試薬とイムノクロマト法を原理とした試薬の 2 種類が存在します。ELISA 試薬は多検体処理が可能のためスクリーニング目的での使用、イムノクロマト試薬は外来・ベッドサイド等の迅速性が求められる現場での使用と、状況に応じて使用されています。近年イムノクロマト試薬は保険収載され、臨床の現場で広く使われるようになりました。

今回はイムノクロマト法を原理としたノロウイルス抗原検出キットの開発の経緯や測定原理に加え、キットを用いて検査する上で、より良い検査結果を得るための排泄便や直腸便検体の採取方法及び採取時の注意点、試料調製の際のコツなどを説明します。判定や試薬性能の限界、さらに使用に関する注意点や新生児検体や嚥下補助食品による影響などについても解説させていただきます。

ノロウイルスの流行シーズン前ということで、昨年出現した新しい遺伝子型の GII.P17-GII.17 の情報やこれまでの流行状況なども合わせて解説します。ノロウイルス抗原検出キットをより深く理解して日常の業務に活かして頂けるように、解説させていただきます。本発表を参考にして、ノロウイルス抗原検出キットをより有効活用して頂ければ幸いです。