

毒素原性大腸菌による食中毒の発生と患者ふん便からの ELISA 法によるエンテロトキシンの検出

大阪府立公衆衛生研究所

塚本 定三 大津 啓二 木下 喜雄

堺市衛生研究所

大 中 隆 史

大阪大学微生物病研究所

本 田 武 司 三輪谷 俊 夫

(昭和61年2月20日受付)

(昭和61年5月6日受理)

Key words : Food poisoning, Enterotoxigenic Escherichia coli, Heat-labile enterotoxin, Enzyme-linked immunosorbent assay

要 旨

1983年に大阪府下で発生した毒素原性大腸菌による食中毒は3事例あった。そのうちの一つは、原因となった仕出し弁当を製造した際の調理に用いた水（井戸水）から原因菌を検出した。そのため、調理用使用水の中の菌が食品に付着、そこで、増殖したものと考えられた。これら3事例の食中毒の原因菌はすべてO6H16で、LTおよびSTを産生した。

そこで、ELISA法を用いて患者ふん便から直接LTの検出を試み、その結果を発症から経日的に比較してみた。LTの検出頻度は発症初期ほど高く、発症から4日目まではふん便22件中18件(81.8%)からLTが検出できたのに対し、5日目から9日目までは27件中7件(25.9%)、11日目および12日目では16件中2件(12.5%)と減少した。また、検出した最高のLT量は40ng/gで、それは発症から4日目までのふん便2件にみられた。今回報告したELISA法によるふん便中のエンテロトキシンを検出する方法は、患者ふん便から菌を分離する以前に、LT産生の毒素原性大腸菌の感染を迅速に診断できる点において、特に発症初期の患者に対しては非常に有効な方法であると思われた。

緒 言

毒素原性大腸菌による食中毒の診断は、一般には患者ふん便から分離した大腸菌のエンテロトキシン産生を確認することでなされている¹⁾。大腸菌の産生するエンテロトキシンには易熱性エンテロトキシン(LT)と耐熱性エンテロトキシン(ST)の2種類が存在するが、LTは種々な免疫学的方法で比較的簡単に検出できる¹⁾。患者ふん便から大腸菌を分離して、それについてLT産生能を検査する従来法では結果を得るまでに2~3日を要

し、臨床診断上問題がある。むしろ、患者ふん便そのものから直接LTを検出するほうが、より迅速な診断が可能であると考えられる²⁾。私達は、1983年に大阪府下で発生した毒素原性大腸菌による食中毒3事例より得た患者ふん便から、ELISA法(enzyme-linked immunosorbent assay)を用いて直接LTの検出を試み、その結果を発症から経日的に比較した。そこで、これらの食中毒の概要、原因菌の分離および患者ふん便からのLTの検出状況について報告する。

材料および方法

食中毒の原因菌検索のための材料は、患者、摂

別刷請求先：(〒537) 大阪市東成区中道1-3-69

大阪府立公衆衛生研究所 塚本 定三

食者、調理従事者のふん便および調理使用水である。ふん便からの原因菌の検索方法は、微生物検査必携³⁾に準じて行った。ただし、毒素原性大腸菌の検索に際しては、ふん便を直接 DHL 寒天培地に塗抹して37°C24時間培養後、疑わしい集落を TSI 培地、LIM 培地へ移植し、大腸菌の性状を示したのについて、エンテロトキシン産生試験を実施した。エンテロトキシン産生試験は、菌株を CAYE 培地⁴⁾へ接種して37°C24時間振盪培養し、遠心後の上清を試料として LT は逆受身ラテックス凝集反応(デンカ生研)、ST は乳のみマウスの胃内投与による方法⁵⁾で検査した。

調理使用水については、11 をメンブランフィルター(0.45 μ m)で濾過し、その後、フィルターを発酵管入り乳糖ブイヨンへ入れ、37°C24時間後にガス発生のみられたものを DHL 寒天培地に塗抹し、以後はふん便からの場合と同様の方法で実施した。さらに、発酵管入り乳糖ブイヨンを用いた5本3段階希釈による MPN 法⁶⁾に従って、100ml 中の菌数を測定した。

分離した毒素原性大腸菌の血清型別は、自家作製した抗 O および抗 H 血清を用いて実施した。

ふん便からの LT の検出は、Honda ら⁷⁾の報告した Fig. 1 に示す方法で行った。試料としては、ふん便に3倍量の0.85% NaCl を加えて遠心し、その上清を用いた。アルカリホスファターゼを酵素として用い、抗 LT 免疫グロブリンと1段階グルタルアルデヒド法により結合させたものを酵素標識抗体とした。

結 果

1983年に大阪府下で発生した毒素原性大腸菌による食中毒3事例の概要は Table 1 に示すとおり

である。事例 I はカメラ工場の従業員のあいだで発生した給食会社の仕出し弁当が原因であったもの、事例 II はバス会社の運転手が飲食店の朝定食を摂取したため発生したもの、事例 III は大学祭準備のための学生が購入したホカホカ弁当による食中毒である。いずれの事例も主要症状は下痢、腹痛であり、その他の症状はあまりみられない。

食中毒検査材料からの毒素原性大腸菌の検出状

Fig. 1 Procedure of ELISA for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin

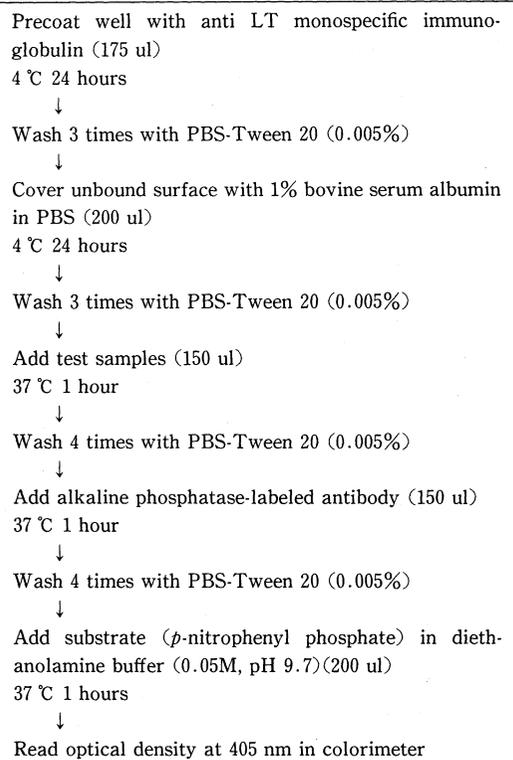


Table 1 Outbreaks of food poisoning caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in Osaka in 1983

Case	Date of outbreak	Place of outbreak	Incriminated food	No. of persons exposed	No. of persons ill (%)	Mean incubation period	Main clinical symptoms (%)
I	10~22 Sep.	Factory (Camera)	Catered lunch (Caterer)	1,227	448(36.5)	Unknown	Diarrhea (90.8) Abdominal pain (70.0)
II	1~3 Oct.	Company (Bus)	Lunch (Restaurant)	38	26(68.4)	28.2 hr.	Diarrhea (100.0) Abdominal pain (73.1)
III	28, Oct. ~3, Nov.	University	Packed lunch (Take out shop)	112	83(74.1)	Unknown	Diarrhea (96.3) Abdominal pain (69.5)

況を Table 2に示す。事例 I, IIおよびIIIともに検査した患者ふん便の60%以上から毒素原性大腸菌を検出した。事例 Iにおいては、原因となった仕出し弁当を調理した従事者のふん便や、調理のための使用水2件からも菌を検出した。使用水からの菌数はMPN法で100ml当りそれぞれ5個、2個であった。また、事例IIIでは、原因食品を摂取

したにもかかわらず発症しなかった者のふん便の20%から菌を検出した。事例 I, IIおよびIIIのそれぞれの検体から分離した毒素原性大腸菌の血清型はすべてO6:H16で、LTおよびSTを産生するものであった。

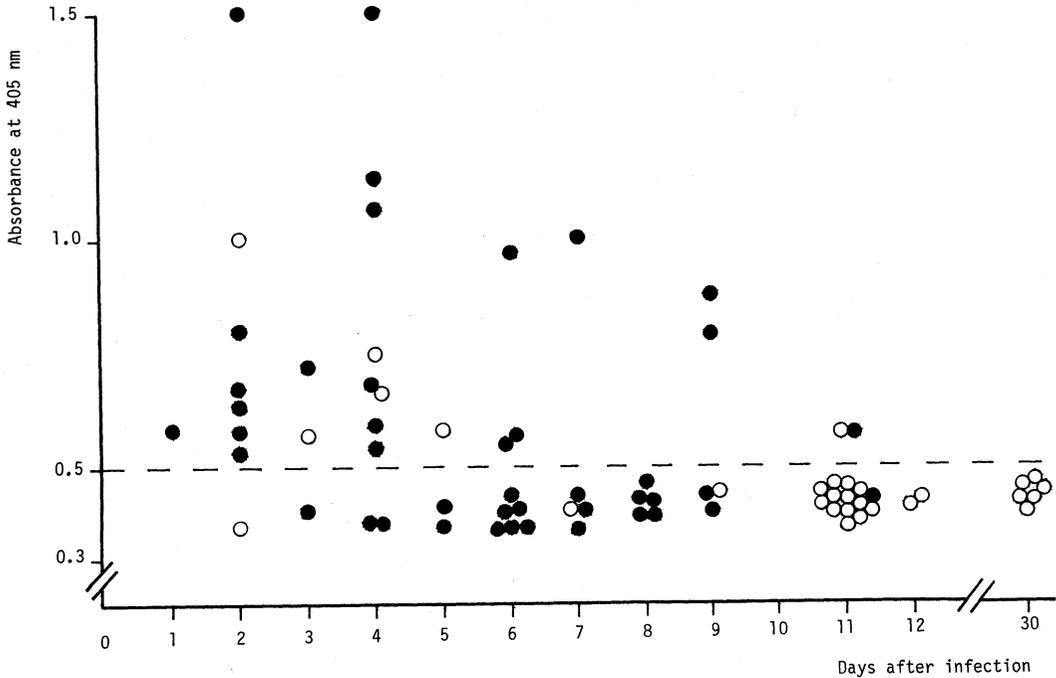
ふん便中のLTをELISA法により検出するに当って、予備実験で精製LTを正常ふん便中に混

Table 2 Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* from food poisoning samples

Case	Sample	No. of examined	No. of ETEC* positive (%)	Serovar of ETEC	Enterotoxin type
I	Patient's stool	35	29(82.9)	O6:H16	LT-ST
	Exposed person's stool	1	0(0.0)		
	Food handler's stool	22	7(31.8)	O6:H16	LT-ST
	Water	12	2**(16.7)	O6:H16	LT-ST
II	Patient's stool	10	6(60.0)	O6:H16	LT-ST
III	Patient's stool	78	53(67.9)	O6:H16	LT-ST
	Exposed person's stool	24	5(20.8)	O6:H16	LT-ST
	Food handler's stool	4	0(0.0)		

*enterotoxigenic *Escherichia coli* **2 and 5 per 100 ml of ETEC were detected

Fig. 2 Detection of LT in stool specimens by ELISA



● : enterotoxigenic *Escherichia coli* positive by culture
○ : enterotoxigenic *Escherichia coli* negative by culture

入して標準曲線を求めたところ、検出感度は4.0 ng/gであり、その時のOD405の値は0.5であった(図示略)。そこで、毒素原性大腸菌に感染した患者ふん便からのLTの検出状況を調べ、Fig. 2に示した。発症から4日目までは患者ふん便22件中18件(81.8%)からLTが検出できたのに対し、発症5日目から9日目までは27件中7件(25.9%)、発症11日目および12日目では16件中2件(12.5%)と減少していき、それ以後はまったく検出できなかった。また、患者ふん便中のLT量を標準曲線から算出したところ、発症から4日目まではLTの検出できた18件のうち40ng/gを示したものは2件あったが、発症11日目ではLTの検出できた2件はともに4ng/gしかなかった。毒素原性大腸菌の分離とLTの検出状況の関係を調べてみると、発症から4日目までは菌が分離されたふん便17件中14件からLTが検出されたのに、発症5日目から9日目になると24件中6件となった。一方、菌が分離されなかったふん便では、発症から4日目までは5件中4件からLTが検出されたが、5日目から9日目では3件中1件、11日目および12日目になると16件中1件から検出されたにすぎなかった。

考 察

我国における毒素原性大腸菌に起因する食中毒、集団下痢症の原因食品あるいは感染源として、飲料水などの水系に関するものが多くみられる¹⁾。私達が今回経験した食中毒のうちの一つは、原因食品である仕出し弁当の調理に用いた使用水から毒素原性大腸菌が検出された事例であった。この使用水は給食会社所有の井戸から消毒されることなく、自家用水道により施設内の各所へ配水されていたものである。しかし、使用水のなかの毒素原性大腸菌の菌数は、食中毒発症から数日経過して検査したにしても、非常に少なく100ml当り数個であった。これは、井戸水中に生息していた毒素原性大腸菌が使用水を通して直接、仕出し弁当に移行し、その摂取により感染が成立したとしては、菌量あまりにも少なすぎる。それゆえ、使用水のなかに生存していた毒素原性大腸菌は一度、施設内の器具、器材に付着して増殖した

後、調理に用いる材料を汚染し、さらに材料中の菌は調理から盛付、配送、摂食までの間に増殖したものと推測される。

以上のほか、残りの2事例も含めたこれら毒素原性大腸菌による食中毒の原因となった菌型は、すべてO6:H16であった。この菌型によるものは我国の病原大腸菌食中毒のうちで最も頻度が高く²⁾、かつ、この菌型のほとんどはLTおよびSTの両毒素を産生し、CFA IIを持っていることが知られている³⁾。私達の分離した菌株もすべてLTおよびST産生であったことから、患者ふん便そのものから直接LTの検出を試みた。

発症から4日目までの患者ふん便からはLTは高率(81.8%)に検出され、その量も40ng/gを示したのも存在したが、以後は日が経過するに従ってLTの検出およびその量が減少しているのは、症状(下痢など)が軽減していくのと相まって当然の結果と思われる。一方、患者ふん便からの毒素原性大腸菌は発症から9日目まではかなり高率に検出できたことから、一度腸管内で定着、増殖した毒素原性大腸菌は下痢回復後もしばらくは生体内に留まるものと考えられる。

患者ふん便中の毒素原性大腸菌の分離状況とLTの検出を経日的に比較してみると、発症の初期においては菌が分離されないにもかかわらず、LTが検出されているのが数例みられる。これは本来、ふん便中に菌が存在していたにもかかわらず、技術上検出できなかったためなのか、あるいは患者はすでに抗生物質などの治療を受けていたために、菌が消失してしまったためなのか定かではない。また、逆に発症から5日目以後は菌が分離されてもLTが検出されないものが多数みられるのは、おそらく患者にLTに対する抗体が産生され、その結果、菌によって産生されたLTは抗体によって中和されたのではないと思われる。

毒素原性大腸菌による感染症の診断は、一般には患者ふん便中に毒素原性大腸菌の存在を証明すればよいとされている。そのため、患者ふん便から分離した大腸菌のエンテロトキシン産生能を調べるための種々な生物学的、免疫学的検査法が報告されている⁴⁾。しかし、患者ふん便から直接エン

テロトキンを証明する迅速診断法の報告は多くない²⁾⁹⁾¹⁰⁾。以前、私達は逆受身ラテックス凝集反応でふん便中の LT の検出を試みたが満足できる成績が得られなかった。今回、ELISA 法により、実際の発症初期の食中毒患者のふん便から直接、高率に LT を検出することができた。ELISA 法はふん便から菌を分離することなしに、LT 産生の毒素原性大腸菌の感染の有無を迅速に診断できるため、非常に有効な手段であると考えられる。また、ふん便中から LT 産生の毒素原性大腸菌を分離できない患者についても、ELISA 法を用いることにより診断が可能となる利点もある。さらに、最近では LT とコレラ毒素を分別検出する ELISA 法も開発されており¹¹⁾、コレラと毒素原性大腸菌感染症の迅速鑑別法としても、今後、ふん便中のエンテロトキンを検出する ELISA 法は有用な方法になると思われる。

文 献

- 1) 三輪谷俊夫, 竹田美文, 本田武司, 竹田多恵, 山本耕一郎, 工藤泰雄: 毒素原性大腸菌が産生するエンテロトキシンの検査法。日本細菌学会教育委員会編, コレラ菌と毒素原性大腸菌の検査法, p. 45-90, 菜根出版, 東京, 1981.
- 2) Morgan, D.R., DuPont, H.L., Wood, L.V. & Ericsson, C.D.: Comparison of methods to detect *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in stool and cell-free culture supernatants. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 798-802, 1983.
- 3) 厚生省監修: 微生物検査必携。細菌・真菌検査, 第2版, 財団法人日本公衆衛生協会, 東京, 1982.
- 4) Mundell, D.H., Anselmo, C.R. & Wishnow, R.M.: Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.*, 14: 383-388, 1976.
- 5) Dean, A.G., Ching, Y.-C., Williams, R.G. & Harden, L.B.: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125: 407-411, 1972.
- 6) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針。1, p. 107-119, 社団法人日本食品衛生協会, 東京, 1973.
- 7) Honda, T., Sato, M., Kongmuang, U. & Miwatani, T.: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*-producing heat-labile enterotoxin by an enzyme-linked immunosorbent assay on single colonies grown on MacConkey agar plates. *J. Diar. Dis. Res.*, 2: 223-227, 1984.
- 8) Evans, D.G. & Evans, D.J. Jr.: New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect. Immun.*, 21: 638-647, 1978.
- 9) Echeverria, P., Verheart, L., Ulyanco, C.V. & Santiago, L.T.: Detection of heat-labile enterotoxin-like activity in stools of patients with cholera and *Escherichia coli* diarrhea. *Infect. Immun.*, 19: 343-344, 1978.
- 10) Merson, M.H., Yolken, R.H., Sack, R.B., Froehlich, J.L., Greenberg, H.B., Hug, I. & Black, R.W.: Detection of *Escherichia coli* enterotoxins in stools. *Infect. Immun.*, 29: 108-113, 1980.
- 11) Honda, T., Sato, M. & Miwatani, T.: Differential detection of cholera enterotoxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assays with antibodies specific to the two toxins. *J. Clin. Microbiol.*, 20: 664-667, 1984.

Outbreaks of Food Poisoning Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* and
Detection of Heat-Labile Enterotoxin in Stools by an
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Teizo TSUKAMOTO, Keiji OTSU & Yoshio KINOSHITA

Osaka Prefectural Institute of Public Health

Takashi ONAKA

Sakai City Health Research Institute

Takeshi HONDA & Toshio MIWATANI

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

In 1983, 3 outbreaks of food poisoning caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) occurred in Osaka. The causative agent of all the outbreaks was ETEC O6:H16 that produced both LT and ST. In 1 of the outbreaks, ETEC was isolated from the water (well water) in caterer where incriminated food was made. The outbreak may be occurred because ETEC in water transmitted the food.

ELISA was utilized to detect LT directly in stool specimens obtained from patients. LT was detected 18 of the 22 (81.8%), 7 of the 27 (25.9%), 2 of the 16 (12.5%) stool specimens obtained from patients within 4 days, 5 to 9 days, 11 and 12 days after infection, respectively. The detection rate of LT in stool specimens was high in early stage of disease. The highest amount of LT was 40 ng/g in stool specimens obtained from 2 patients within 4 days after infection. These results suggest that ELISA can be used to detect LT in stool without or before bacterial isolation, and it is a useful method to diagnose the infection caused by LT-producing ETEC rapidly.
