

## (2) 調査・事例

---

- 1) 健康食品の医薬品成分分析事例について……………27
- 2) 大分県産鶏卵中の動物用医薬品 (SDM) の検出事例について ……30
- 3) 既知の病原因子を保有しない大腸菌06:H10 (*astA*保有) が検出された  
下痢症集団発生事例について……………33
- 4) 下痢症患者および健康人から分離された*eaeA*および*aggR*遺伝子保有大  
腸菌におけるその他の病原性関連遺伝子の分布、並びに、*afaD*遺伝子  
保有大腸菌調査……………35

## 健康食品の医薬品成分分析事例について

立花敏弘、曾根聡子、荒金真理子、森崎澄江  
二宮孝代、三妙正治、城井堅

### Analytical Results of Medicinal Components in Dietary Supplements

Toshihiro Tachibana, Satoko Sone, Mariko Arakane, Sumie Morisaki  
Takayo Ninomiya, Masaharu Sanmyo, Katashi Kii

Key words : 健康食品 Dietary Supplements、N-ニトロソフェンフルラミン N-nitroso-fenfluramine  
フェンフルラミン fenfluramine、甲状腺ホルモン Thyroid hormone、センノシド Sennosides

#### 要旨

痩身効果を謳う健康食品の摂取が原因と考えられる健康被害が県外で発生し、その被害者が利用していた5商品（いずれも雪茶）の中に、本県の業者が販売した商品が1製品含まれていたことから、この製品と健康被害の関連を調査する目的で医薬品成分の分析を行った。しかし、医薬品成分が検出されなかったこと及びその他の調査結果から、この製品と健康被害との直接の関連はないと考えられた。

また、行政からの要望で実施した市販健康食品5製品の検査でも医薬品成分が検出されたものはなかった。

#### はじめに

人々の健康に対する意識の高まりもあって、様々な種類の健康食品が市販されているが、これらの製品の中には医薬品成分を含有し無承認無許可医薬品として薬事法違反に問われたり、かえって健康被害をもたらすことがあるという事例がしばしば報告されている。<sup>1) 2) 3)</sup>

健康被害との関連が疑われた今回のケースでは、母娘が痩身を目的にインターネットでメーカーの異なる5製品（いずれも雪茶）を購入し、5~10g 若しくは1包を約3Lの水で煎じ、朝夕一人当たり約1Lを3ヶ月にわたって飲用していた。このうち一人は急性肝障害と診断され、もう一人も肝機能障害の疑いで精密検査を予定しており、医師は飲用した健康食品（雪茶）の関与を疑っているとの連絡及び本県の業者が販売した1製品についての関連調査依頼が薬務担当課に寄せられた。

当所では、健康食品の無承認無許可医薬品成分として肝機能障害との関わりが報告されているN-ニトロソフェンフルラミンを始め、フェンフルラミン、シブトラミン、甲状腺ホルモン（トリヨードチロニン、チロキシン）、センナ成分（センノシドA、B）に

ついて当該製品の検査を行った。

また、薬事監視業務の一環として市販ダイエット用健康食品5製品の買い上げ検査も合わせて実施したのでその概要を報告する。

#### 試料及び検査方法

##### 1 試料

###### 1.1 調査依頼を受けた製品

同一ロットの製品を含め商品は全て出荷済みで入手できなかったため、製造業者が自家消費していた製品の残り（3g ティーバック30包入りで9包を消費済み）の提供を受けた。試料はティーバックをはさみで開封して取り出し、細切粉末としたものを分析に供した。

###### 1.2 市販ダイエット用健康食品

痩身効果を謳う市販ダイエット食品を対象に、錠剤タイプ4製品、液剤タイプ1製品の計5製品を買い上げた。液剤はカプセルの内容物をそのまま、錠剤は乳鉢で粉碎したものを分析に供した。

##### 2 試薬等

###### 2.1 標準物質

シブトラミン、フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン：国立医薬品安全研究所製。3, 4, 3-トリヨード-L-チロニンナトリウム、L-チロキシニンナトリウム5水和物、センノシドA, B：和光純薬工業特級。3, 3, 5-トリヨードチロニン：SIGMA製。PRONASE Pronase：Calbiochem-NovabiochemCorp製。トリス（ヒドロキシメチル）-アミノメタン：ナカライテスク製。乾燥甲状腺末：帝国臓器製薬製。センナ：日本薬局方適合品・中島生薬株式会社製。アセトニトリル、メタノール：和光純薬HPLC用。アセトン、酢酸エチル、エチルエーテル：和光純薬残留農薬分析用。t-MTBE：SIGMA-ALDRICH社。その他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

## 2.2 使用機器

GC/MS:HP5890GC/日本電子データム AX-505W  
 LC/MS/MS:HP1100/Applied Biochemical API2000  
 HPLC:HP1100 (PDA)

## 3 分析方法及び分析条件

シブトラミン：厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課「シブトラミンの分析法について」<sup>4)</sup>に従い、GC/MSで測定した。

フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、トリヨードチロニン、チロキシニン、センノシドA, B：厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課「いわゆる健康食品と称する無承認無許可医薬品の監視指導について」<sup>5)</sup>に示された方法に準じ、測定は順に LC/MS/MS 及び GC/MS、LC/MS/MS、LC/MS/MS、LC/MS/MS、HPLCで行った。

## 結 果

### 1 調査依頼を受けた製品

健康被害との関連が疑われた雪茶は原材料：雪茶100%、原産地はチベットとの表示があり、3gがティーバックに詰められている。ティーバックを開封して取り出した内容物はきれいな白色で異なる色調の組織や、植物片等は観察されなかった。

検査を実施したフェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミン、トリヨードチロニン、チロキシニン、センノシドA, Bの7成分はいずれも検出されなかった。また、各成分の溶出位置に近接して出現し、測定を妨害する夾雑物のピークも特に認められなかった。図1に雪茶のシブトラミン測定例（GC/MS）を示す。

### 2 市販ダイエット用健康食品

買い上げた5製品についても検査した7成分はいずれも検出されず、測定を妨害する夾雑物のピークも認められなかった。図2にチロキシニン測定（LC/MS/MS）を示す。

### 3 添加回収試験

各成分の添加回収試験の結果はシブトラミン80.0%、フェンフルラミン106%、N-ニトロソフェンフルラミン97.0%、トリヨードチロニン、チロキシニンは添加した甲状腺末に対しそれぞれ59.1%、56.9%、センノシドは添加したセンナに対しセンノシドA81.2%、センノシドB89.4%でトリヨードチロニン及びチロキシニンがやや低いものの良好な結果であった。

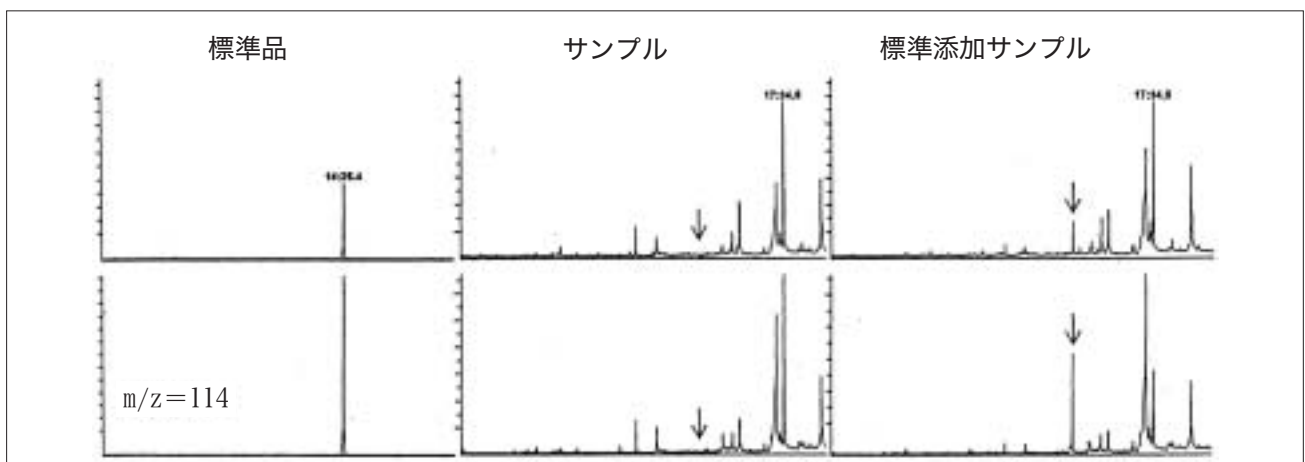


図1 シブトラミンGC/MS測定例 TIC (上)、マスクロマトグラム (下)

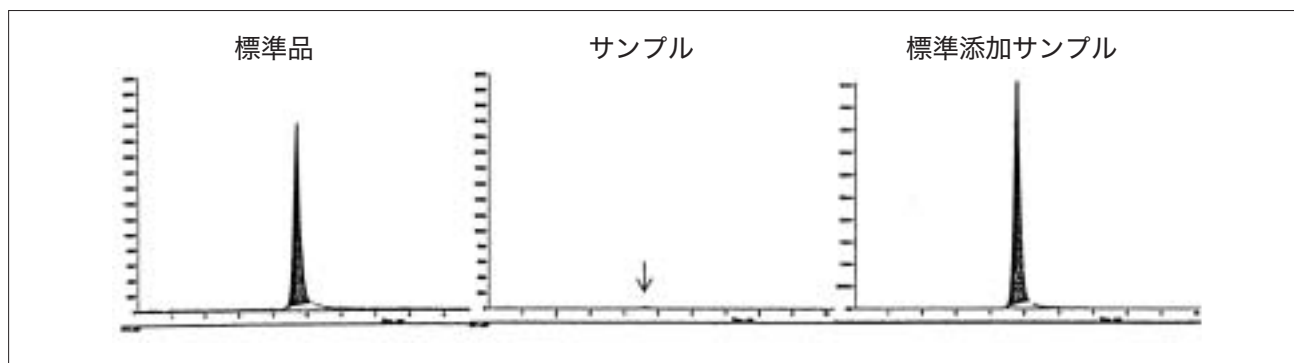


図2 チロキシシンLC/MS/MS測定例 MRM ( $Q_1/Q_3=777.5/731.1$ )

## 考 察

県内の業者が販売した健康食品で健康被害との関係が疑われた製品の医薬品成分分析を行ったが、フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミン、トリヨードチロニン、チロキシシン、センノシドA、Bはいずれも検出されなかった。また、管轄保健所等の関連調査によれば当該製品について同様の苦情が他にないことから、今回のケースの健康被害と直接の関連はないと考えられた。

また、合わせて行った買い上げ検査でも医薬品成分が検出された製品はなかったが、健康食品の市場規模が拡大し、インターネットや通信販売等様々な経路で、様々な国の健康食品の入手が容易になっている現状を考えると、被害発生の予防及び被害拡大の防止という観点から、今後とも定期的且つ継続的な監視が必要と考えられる。

## 謝 辞

今回の分析に当たり、フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミンを分与頂いた宮崎県衛生環境研究所衛生化学部及びシブトラミンを提供頂いた国立医薬品安全研究所に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 浜野明子、瀬戸隆子、塩田寛子他：瘦身を標榜する健康茶から検出された医薬品成分について、東京都衛生研究所年報, 52, 43-47, 2001
- 2) 箕輪佳子、守安貴子、中島順一他：健康被害を起こした中国製ダイエット健康食品における検査結果、東京都健康安全センター年報, 54, 69-73, 2003
- 3) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課：中国製ダイエット用健康食品による健康被害事例等, 2003年5月30日
- 4) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課：シブトラミンの分析方法について, 平成15年4月11日
- 5) 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課：いわゆる健康食品と称する無承認無許可医薬品の監視指導について, 平成14年7月29日
- 6) 小坂妙子、浜田洋山本雄三彦：高速液体クロマトグラフィー質量分析計による甲状腺ホルモンの分析, 宮崎県衛生環境研究所年報, 12, 89-93
- 7) 井上雅成：陰イオンカートリッジを用いたダイオウ・センナ中のセンノサイドA、BのHPLCによる定量, 奈良県薬事指導所報告, 10, 54-59, 平成2年
- 8) 大住優子、池田憲廣、山本雅世他：医薬品製剤中のセンノシドA及びBの定量, 第30回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 154-155

## 大分県産鶏卵中の動物用医薬品 (SDM) の検出事例について

荒金真理子、曾根聡子、森崎澄江、二宮孝代、立花敏弘、城井 堅

### Detection of Residual sulfadimethoxine in Oita Prefecture Produced Eggs

Mariko Arakane, Sone Satoko, Sumie Morisaki, Takayo Ninomiya,  
Toshihiro Tachibana, Katashi Kii

Key words : 残留動物用医薬品 residual veterinary drugs、スルファジメトキシ  
sulfadimethoxine (SDM)、鶏卵 egg、液体クロマトグラフ質量分析計  
Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)

#### 要旨

残留動物用医薬品のうち合成抗菌剤14物質のスクリーニング検査を行ったところ、鶏卵10検体中の2検体から産卵鶏への使用が禁止されているスルファジメトキシ (SDM) が検出された。

このため、スルファジミジン個別分析法に準じる方法で再分析を行い、HPLCを用いてSDMの定性及び定量を行った。

その結果、スルファジミジン個別分析法でも同様の結果が得られたので、LC/MS/MSによる測定を行ったところ、SDMであることが確認同定された。

#### はじめに

今日、養殖漁業や畜産業等においては、生産効率を高める目的で動物用医薬品や飼料添加物を、疾病の予防や肉質の改善のために使用している。一方、生産段階や加工各段階で食品衛生上問題となる事件が取り上げられ、消費者の食の安全、安心への関心はこれまでになく高まっており、食品の流過程における監視や検査の重要性が増している。

また、2003年5月には食品衛生法が改正され、基準が設定されていない動物用医薬品等が残留する食品の流通を原則として禁止するポジティブリスト制が3年以内に導入されることとなった。

当センターにおいては1972年から食品中の動物用医薬品検査を開始し、現在、食肉・鶏卵・魚介類中の合成抗菌剤や抗生物質の残留検査を行っているが、2003年度に県下の食品衛生監視機動班が収去した県産鶏卵から、使用が禁止されているサルファ剤のスルファジメトキシ (SDM) が検出されたのでその概要を報告する。

#### 検査方法

##### 1 検体

5保健所に配置されている食品衛生監視機動班が養鶏場及び小売店で収去し、平成15年7月15日に当センターに搬入した県産鶏卵10検体を用いた。

##### 2 分析方法及び分析項目

平成5年4月1日付け衛乳第79号「蓄水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法」及び平成9年3月厚生省告示第72号「食肉中のスルファジミジン分析法」に準じる方法を用いた。

試料5gに無水硫酸ナトリウム10gを加え、アセトニトリル25mlで抽出後、遠心分離し、アセトニトリルへキサン分配を2回行い精製する。アセトニトリル層に1-プロパノール10mlを加え減圧乾固し、残さをアセトニトリル：水（4：6）1mlで溶解し、そのうち0.2mlをオキソリン酸（OXA）用試験溶液とした。

残りの0.8mlをSep-pak AluminaNでクリーンアップ後、さらに1-プロパノール5mlを加え減圧乾固し

た。以後は、一斉分析法または個別分析法を選択した。

## 2.1 一斉分析法

残さをアセトニトリル：水（4：6）0.8mlに溶解し、氷冷しながら超音波抽出を行った。これにアセトニトリル飽和ヘキサン0.4mlを重層し遠心分離後、アセトニトリル-水層を分取、0.5 $\mu$ mマイクロフィルターでろ過し、これをサルファ剤5種スルファメラジン（SMR）、スルファジミジン（SDD）、スルファモノメトキシシン（SMM）、スルファジメトキシシン（SDM）、スルファキノキサリン（SQX）及びその他9種オルメトプリム（OMP）、トリメトプリム（TMP）、フラゾリドン（FZD）、ピリメタミン（PYR）、スルファキノキサリン（SQX）、チアンフェニコール（TPC）、ジフラゾン（DFZ）、フルベンダゾール（FBZ）、ナイカルバジン（NCZ）用の試験溶液とした。

## 2.2 個別分析法

残さをアセトニトリル：0.025mol/lリン酸一ナトリウム溶液（3：17）1mlに溶解し、これにアセトニトリル飽和ヘキサンを0.5ml重層し遠心分離後、アセトニトリル-リン酸ナトリウム混液層を分取、0.5 $\mu$ mマイクロフィルターでろ過し、これを個別SDM用試験溶液とした。

## 2.3 HPLC測定条件

測定装置：HP-1100 ヒューレット・パッカード社製  
カラム：Mightysil RP-18GP（4.6mm×15cm）

関東化学製

ODS-80Tm（4.6mm×15cm）東ソー社製

オーブン：40℃

溶離液：アセトニトリル：水：酢酸＝  
22：78：0.3 0.8ml/min

測定波長：270nm

注入量：10 $\mu$ l

## 2.4 LC/MS/MS測定条件

測定装置：API 2000 アプライド・バイオシステムズ社製  
カラム：Inertasil ODS-3（5 $\mu$ m 2.1×75mm）

ジーエルサイエンス社製

カラム温度：40℃

移動相：0.3%酢酸水：アセトニトリル（1：1）

流速：200 $\mu$ l/min

注入量：10 $\mu$ l

イオン化法：ESI

測定モード：Positive MRM

プレカーサーイオン Q1：SDM 311 PYR 249

プロダクトイオン Q3：SDM 156、92、65

PYR 177

## 結 果

### 1 一斉分析及び個別分析の結果

一斉分析の結果、10検体中2検体のリテンションタイム及びUVスペクトル（マッチ度96%、91%、図1、図2）がSDM標準品とほぼ一致したことから、それぞれ0.09ppm、0.05ppmのSDMが検出されると推定された。また、別の検体からスペクトルマッチ度91%で0.03ppmのPYRが検出されると推定された。

SDMの検出が推定された検体について、個別分析法で再分析したところ、やはりそれぞれ0.07ppm及び0.05ppmのSDMが検出された。

### 2 LC/MS/MS測定結果

一斉分析法及び個別分析法の試験液をLC/MS/MS測定で測定したところ、i) MSクロマトグラムによるリテンションタイム、ii) Q3イオン156、92、65の強度比が標準とよく一致したことから、SDMの検出が推定された2検体共に、SDMが検出されるものと確定した。（図3）

なお、PYRの検出が推定された検体については、MRMモードで測定したところPYRは全く検出されなかった。

## ま と め

一斉分析法による検査では、HPLCで測定するとマトリックスによる干渉が度々みられる。このような干渉を少なくするために、溶離液の組成比を変える、カラムを変えるなどの方法を行うが、十分な効果が得られない場合もあり、最終的な同定が難しい。また、結果を出すまでに時間がかかるとの問題点もある。

一方、LC/MS/MSを用いた測定は、Q1、Q3の組み合わせやMSのパターン比較などを用いると、短時間で信頼性の高い結果が得られるが、マトリックスによるイオン化の阻害などから定量性の精度に問題がある事例も多く報告されている。今回のケースでも、HPLCでの定量結果とLC/MS/MSの定量結果の違いからマトリックスの影響が推察されたが、定性的には十

分なデータが得られた。

このことから、定期的に行う動物用医薬品の収去検査では、LC/MS/MSを用いたスクリーニングを行い、検出が確認された検体についてHPLCを用いた定量を行うことがより有効であろうと考えられ、その手法の確立が急務であると思われる。

### 参 考 文 献

1) 厚生労働省監修:「食品衛生検査指針、動物用医

薬品・飼料添加物編」, p.26-48,  
p.127-130 (2003), 社団法人 日本食品衛生協会

2) 塩見哲生、辻由起、谷口哲彦、福本智也、新美達也、森田恵一、川上雅弘、井崎やゑ子、森田正和:LC/MS/MSによる鶏肉の残留スルファキノキサリン検出, 京都市衛公研年報, 67, 111-116 (2001)

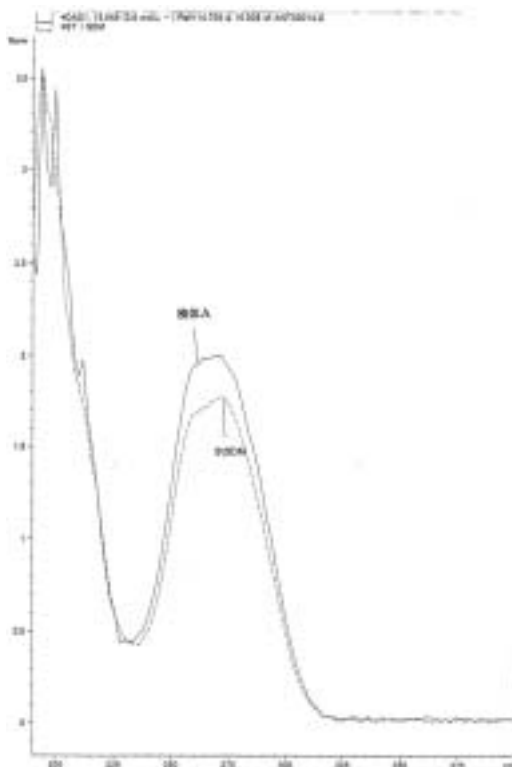


図1 SDM検出が推定された検体AとSDM標準品とのUVスペクトルの比較

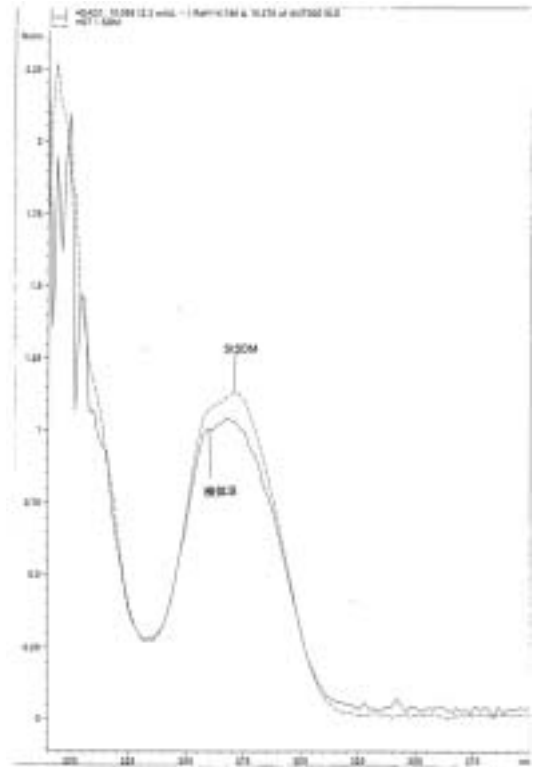


図2 SDM検出が推定された検体BとSDM標準品とのUVスペクトルの比較

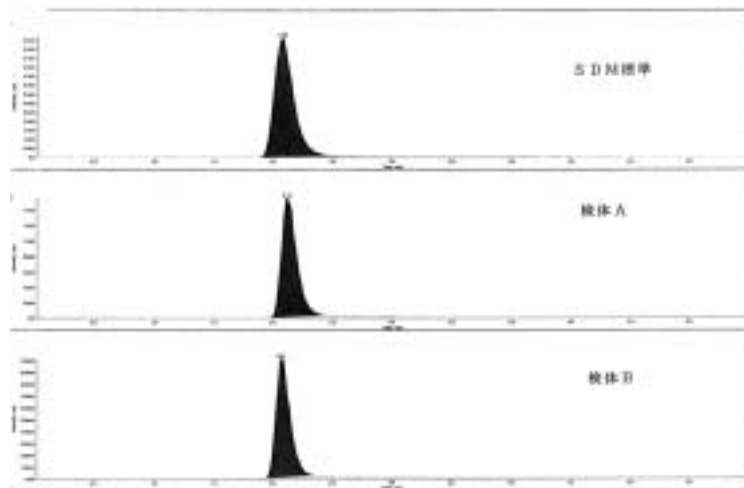


図3 SDM標準品とSDMが検出された2検体(検体A、B)のLC/MS/MSクロマトグラム

## 既知の病原因子を保有しない大腸菌06:H10 (*astA* 保有) が検出された 下痢症集団発生事例について

緒方喜久代、成松浩志、鷺見悦子、内山静夫

### Studies on Mass Outbreak of Diarrhea Caused by *invE* gene, *VT* gene, *ST* gene and *LT* gene Negative *E. coli* (*astA* positive) 06:H10

Kikuyo Ogata, Hiroshi Narimatsu, Etsuko Washimi, Sizuo Utiyama

Key words : 大腸菌 *E. coli*、*astA*、下痢症集団発生 mass outbreak of Diarrhea

#### 事件の概要

2003年5月12日18時20分に、大分県A市内のB医療機関よりC学寮の寮生が下痢症状を呈している旨の届け出が保健所にあった。調査の結果、151名中67名が食中毒様症状を呈していることが判明した。患者の発生は、5月10日を中心に9日から12日までの4日間であった。その主な症状は、下痢61名(91.0%)、腹痛49名(73.1%)で、他の症状はほとんどなく、医療機関を受診した者は2名(入院なし)と比較的軽症であった。共通食品は寮の昼食及び夕食(いずれもK仕出し屋の弁当)で、K仕出し屋はこの寮以外にも弁当やそうざい類を約250食提供していたが、他からの苦情はなかった。飲料水は湧水を利用しており、調査の時点では残留塩素が確認されたが、休寮期間中(5月3日-5日)の滞留水の水質は不明であり、飲料水が本事件に関与している可能性も否定できなかった。

#### 材料及び方法

保健所より搬入された患者便13検体について、下痢起因細菌及びウイルスの検索を常法に従い行った。なお、病原大腸菌のうちVTEC、ETEC、EIECについては、DHL寒天平板からコロニーSweep法にてPCRで病原遺伝子のスクリーニング検査を行った。さらに、DHL寒天平板より赤痢菌や大腸菌が疑われるコロニーを3-5個ずつ釣菌し、生化学的性状の確認試験、血清型別(デンカ生研)及びPCR法による病原遺伝子の検索を行った<sup>1)</sup>。さらに、これらの分離菌株に

ついて、パルスフィールド電気泳動法(PFGE法)を用いた制限酵素Xba IによるDNA切断パターンの比較を行った<sup>2)</sup>。

#### 結 果

いずれの患者便からも既知の下痢起因細菌及びウイルスは検出されなかった。しかし、すべての検体においてDHL寒天平板に無色半透明のコロニーの発育が優勢に認められ、それらの菌を精査した結果、IDテストEB20(日水)プロファイル0111033の同一性状を示す白糖非分解の大腸菌と同定され、血清型は06:H10であった。PCR法にて病原遺伝子の有無の確認をした結果、*invE*遺伝子、*VT*遺伝子、*ST*遺伝子、*LT*遺伝子、付着関連遺伝子の*eaeA*、*bfpA*、*aggR*、*afaD*は保有していないが、EAST 1の遺伝子*astA*を保有していた。また、全ての分離菌株においてエンテロヘモリシン陽性であった。さらに、これらの分離菌株について行ったPFGE法による遺伝子解析においても同じパターンを示した(図1)。

他の既知の下痢原性細菌及びウイルスが検出されなかったこと。すべての患者便から純培養状に分離されたこと。PFGE法による遺伝子解析においても同じパターンを示したこと。以上のことから、本事例は大腸菌06:H10(*astA* 保有)の関与が強く疑われた。

#### 考 察

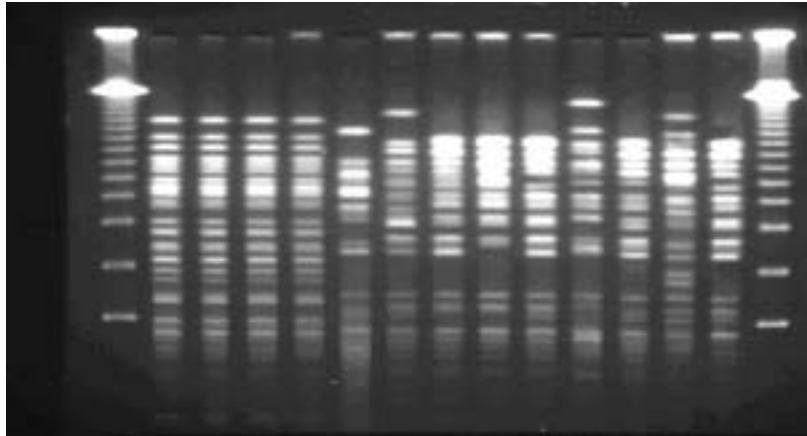
下痢原性大腸菌のうち、VTECやETEC、EIECについては病原性の解明やその毒素の免疫学的検査法も確立されているが、これら以外の細胞附着性大腸菌の



確認試験である培養細胞に菌を付着させ観察する方法は非常に煩雑で、判定にも熟練を要することから日常検査には適さない。そこで簡便な検査法の一つとして付着や毒素に関連した遺伝子を標的としたPCR法が検討され<sup>3)</sup>、*eaeA*、*bfpA*、*aggR*遺伝子の保有状況と血清型、細胞付着性などとの相関性が明らかにされつつある<sup>4)</sup>、<sup>5)</sup>、<sup>6)</sup>、<sup>7)</sup>、<sup>8)</sup>、<sup>9)</sup>。しかしながら、*astA*については健康人由来の大腸菌からも高頻度に検出されることから、病原学的意義は不明である。本

例の大腸菌06:H10については、他の未知の病原因子が関与しているのかもしれないが、少なくとも*astA*の関与の有無を判別するためには、EAST 1の簡易な免疫学的検査法の確立と普及が望まれる。

本事例のように、常に同じものを飲食している集団生活者の食中毒事件において、既知の病原因子を保有していない微生物が共通して検出される場合に備えて、同一集団の中の非発症者も比較対照として検査することが重要であると考えられる。



Lane1 : DNAサイズマーカー  
Lane2-5 : 今回の事例分離株  
Lane6-7 : 健康者由来  
Lane : 8-13 : 散発下痢症由来  
Lane14 : 健康者由来  
Lane15 : DNAサイズマーカー

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

図1 大腸菌06のPFGEパターン

### 参 考 文 献

- 1) 伊藤文明、山岡弘二、萩野武雄、神辺眞之：下痢原性大腸菌におけるPCR法，臨床病理，43，772-775 (1995)
- 2) 渡辺治雄ら：パルスフィールド電気泳動法の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究，平成14年度総括報告書
- 3) 江部高廣ら：細胞付着性大腸菌の実態把握とその検査法の確立に関する共同研究
- 4) 河野喜美子、山田亨、八木利喬、伊藤健一郎：散発下痢症患者からの腸管凝集性大腸菌の検出，感染症学雑誌，72，1275-1282 (1998)
- 5) 加藤怜、尾形和恵、山田澄夫：散発下痢症由来大腸菌の腸管病原性大腸菌 (EPEC) *eaeA* 遺伝子および腸管凝集性大腸菌 (EaggEC) *aggR* 遺伝子保有状況とその病原性の評価，感染症学雑誌，76，721-729 (2002)
- 6) 森屋一雄、角典子、中尾昌弘、山崎貢、齋藤眞、伊藤健一郎：散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EaggEC) 関連遺伝子，*eaeA*，*aggR*，*astA* の保有状況について，感染症学雑誌，74，134-142 (2000)
- 7) 倉園貴至、近真理奈、山口正則、大関瑤子、伊藤健一郎：健康者から分離された大腸菌の血清型及び病原因子保有状況—埼玉県，病原微生物検出情報，21 (5)，95-96 (2000)
- 8) 成松浩志、緒方喜久代、阿部義昭、帆足喜久雄：大分県における下痢症由来大腸菌の病原性関連遺伝子の保有状況調査，大分県衛生環境研究センター年報，29，51-55 (2001)
- 9) 成松浩志、緒方喜久代、鷺見悦子、帆足喜久雄：健康人由来大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況調査，大分県衛生環境研究センター年報，30，47-52 (2004)

## 下痢症患者および健康人から分離された*eaeA* および*aggR* 遺伝子保有大腸菌における その他の病原性関連遺伝子の分布、並びに、*afaD*遺伝子保有大腸菌調査

成松浩志、緒方喜久代、鷲見悦子

### Investigation of the incidence of other pathogenesis-related genes in *Escherichia coli* carrying *eaeA* or *aggR* genes isolated from diarrhea cases and healthy humans, and the distribution of *afaD* gene in the isolates

Hiroshi Narimatsu, Kikuyo Ogata, Etsuko Washimi

Key words : EPEC, EAggEC, *afaD*

#### 要旨

下痢症患者由来大腸菌株中、*eaeA*保有の28株と*aggR*保有の18株、健康者便由来大腸菌株中、*eaeA*保有の5株と*aggR*保有の4株を対象に、*eaeA*保有菌株については*tir*, *espA*, *ler*, *perA*, *bfpA*の各遺伝子を、*aggR*保有菌株については*aggA*, *aggB*, *aafA*, *pet*の各遺伝子をPCR法にて検索し菌株の由来による保有率を比較した。結果、*eaeA*保有大腸菌の中で、下痢症由来のO157:H45とO153:H19のみが、調査した範囲の全遺伝子を保有しており、典型的なEPECの遺伝子パターンを示したものの、全体的に見ると由来による明確な差は認められなかった。

拡散型付着大腸菌の侵入因子とされる*afaD*遺伝子を保有する大腸菌について調査したところ、散発下痢症からの検出頻度は1% (1/90) と低率ではあったが、*afaD*保有大腸菌OUT:HNM分離された。また、過去の下痢症由来大腸菌67株中6株が*afaD*を保有していた。一方、健康者由来大腸菌157株中、O6:HNTとO25:HNTの2株が*afaD*を保有していた (O25は*aggR*も保有)。

#### はじめに

集団下痢症事件等の細菌検査を行う過程で、ヒトの常在菌である大腸菌は常に検出されるが、VTECやETEC、EIECのように病原因子が明確なもの以外は、煩雑な血清型別検査等を経なければ原因菌としての推定が困難な状況にある。このため、食中毒検査時には、既知の食中毒起因菌が検出されない場合、大腸菌検査がネックとなって行政対応を鈍らせている。そこで、ヒトに下痢を起こす大腸菌の中でも病原因子が不明な腸管病原性大腸菌/病原血清型大腸菌 (EPEC) や腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) について、病原性の指標となる因子を明らかにし、その迅速な検査法を確立することを目的として調査研究を開始した。

2001年度は、下痢症患者由来大腸菌 (VTEC, ETEC,

EIEC以外) について、2002年度は健康者由来大腸菌について、病原性関連遺伝子 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*, *astA*) の保有率を調査<sup>1, 2)</sup>し、統計的比較を試みた。結果として有意な差は認められなかった<sup>2)</sup>。下痢症及び健康者とも分離頻度の高い血清型は、O1やO18であるが、ほとんどが病原性関連遺伝子を保有していなかった<sup>1, 2)</sup>。一方、血清型別不能株 (OUT) でも病原性関連遺伝子を保有するものが多数認められた<sup>1, 2)</sup>。

2003年度は、同じ*eaeA*または*aggR*を保有する大腸菌における下痢症患者由来株と健康者由来株の違いを明らかにするため、*eaeA*保有菌株については、新たに*tir*, *espA*, *ler*, *perA*, *bfpA*を、*aggR*保有菌株については、*aafA*, *aggA*, *aggB*, *pet*などの調節遺伝子や線毛遺伝子等他の病原性関連遺伝子<sup>3)</sup>の保有状況を調査し、比較してみることにした。

さらに、近年、拡散型付着大腸菌の一部に下痢原

性があることが示唆されているので、その細胞内侵入性に関係する遺伝子 $afaD$ <sup>4)</sup>について、疫学的データ収集の一環として、散発下痢症患者便から $afaD$ 保有大腸菌の検索を試み、その散発下痢症における出現頻度を調べ、また、過去の下痢症由来菌株と健康者由来株を対象に $afaD$ 保有状況を調査した。

### 材料及び方法

過去に下痢症患者便から分離された大腸菌保存菌株中、これまでの調査で $eaeA$ 保有が認められた28株(VTECを除く)と $aggR$ 保有が認められた18株、2002年度の調査等で健康者便から分離された大腸菌菌株中、 $eaeA$ 保有が認められた5株と $aggR$ 保有が認められた4株を対象に、 $eaeA$ 保有菌株については $tir$ ,  $espA$ ,  $ler$ ,  $perA$ 及び $bfpA$ を、 $aggR$ 保有菌株については $aggA$ ,  $aggB$ ,  $aafa$ 及び $pet$ をPCR法にて検索した。テンプレートDNAは、普通寒天培地で36°C一夜培養した菌株を1白金線分だけ100  $\mu$ lの滅菌蒸留水に懸濁し、10分間煮沸抽出後の遠心上清とした。プライマーは、表1に示す伊藤ら<sup>5)</sup>の設計したものを、テンプレート5  $\mu$ lを含む全量50  $\mu$ lの反応液中、プライマー最終濃度は、各0.5  $\mu$ Mとした。緩衝液と基質はTaKaRa Ex-Taq (宝酒造) 添付品を添付文書の処方に従って添加した。サーマルサイクラーは、MJリサーチ社製PTC-225を使用し、反応条件は、カリキュレート方式で、94°C 2分の前加熱の後に、94°C 5秒、55°C 5秒、72°C 10秒のサイクルを30回とした。PCR反応産物はエチジウムブロミド入り2%アガロースゲル(E-Gel, Invitrogen社)で電気泳動し、トランスイルミネーター上で観察した。

$afaD$ 保有大腸菌検索法は、2001年度及び2002年度の報告の方法<sup>1, 2)</sup>に準じて実施した。ただし、PCRのプライマーは伊藤ら<sup>5)</sup>の設計した $afaDks1$ と $afaDks2$ を用い(表1参照)、プライマー最終濃度は反応液中各0.5  $\mu$ Mとした。 $afaD$ 保有大腸菌の検索対象は、2003年度に大分市と周辺地域を中心とする感染症発生動向調査定点医療機関で細菌性下痢症を疑って採取された散発下痢症患者便90検体とした。さらに、過去の下痢症由来大腸菌菌株中、病原因子不検出の67株と2002年度の調査<sup>2)</sup>で健康者100人中の97人から分離された157株を対象に、 $afaD$ の検索を実施した。

### 結 果

$eaeA$ 保有大腸菌については表2のとおり、健康者由来及び下痢症由来の両方の菌株とも $tir$ ,  $espA$ ,  $ler$ の保有率が75~100%と高く、 $perA$ ,  $bfpA$ の保有率は7.1~20%と低い傾向にあり、由来による明確な差は認められなかったが、個々にみるとO157:H45とO153:H19(21)は、調査した全遺伝子を保有していた。

$aggR$ 保有大腸菌については表3のとおり、健康者由来及び下痢症由来の両方の菌株とも $aggA$ ,  $aggB$ ,  $aafa$ ,  $pet$ の保有率は5.6~27.8%低く、由来による明確な差は認められなかった。これらの遺伝子が検出されたものを個々に見ると $aggA$ と $aggB$ 、または $aafa$ と $pet$ の組合せで検出される傾向にあった。

$afaD$ については、PCR法を用い2003年度の散発下痢症90検体を検索したところ、1検体(1.1%)から $afaD$ 保有のOUT:HNMが1株分離された。一方、表4に示すように、過去の下痢症由来大腸菌保存株67株中、O1:HNM2株、O25:HNT1株、O126:HNM2株、O158:HNT1株の計6株が、健康者由来大腸菌157株中、O6:HNT1株とO25:HNT1株( $aggR$ も保有)の計2株が、 $afaD$ を保有していた。

### 考 察

$eaeA$ 保有大腸菌の中で、下痢症由来のO157:H45とO153:H19(21)の2株のみが、調査した全遺伝子を保有しており、遺伝子的には典型的(Typical)EPECのパターンを示した。しかし、他は、由来にかかわらず、染色体上の病原性アイランドLEE (locus of enterocyte effacement) 中の遺伝子 $tir$ ,  $espA$ ,  $ler$ をよく保有していたものの、多くはEAF (EPEC adherence factor) プラスミド上の遺伝子である $perA$ や $bfpA$ を欠いていた。下痢原性の強い典型的EPECは発展途上国において下痢症患者からよく検出されるが、米英などのように高度に工業化された国々ではまれにしか検出されず、むしろ、EAFプラスミドを欠き下痢原性の弱い非定型的(Atypical)EPECの方が比較的によく検出されるという<sup>6)</sup>。今回の結果から、大分県においても典型的EPECより非定型的EPECの遺伝子保有パターンを示す菌株の方が多いことがわかった。

全体的に見ると、今回調査した遺伝子の範囲では、 $eaeA$ 保有大腸菌及び $aggR$ 保有大腸菌について、由来による明確な差は認められなかった。このことは、散発下痢症から分離された大腸菌の場合、これらの

一部遺伝子の検出だけを根拠に起因菌かどうかの判定を個々に下すことが困難であること示唆している。しかし、集団下痢症事例の場合は、2002年度の調査で明らかとなった健康者における病原性関連遺伝子保有大腸菌の検出率（バッグランド）を有意に上回る陽性率をPCRスクリーニングで得た場合、起因菌としての可能性を濃厚に疑うことはできる。主に細胞付着に関連する遺伝子を標的とするPCRを利用した迅速検査法の手技は、この3年間でほぼ確立し、実際に2003年度、県内で発生した集団下痢症事例のいくつかに適用され<sup>7)</sup>、一定の成果を得た。今後は、散発下痢症の確定診断にも応用できるような明確な病原性の指標を探求する必要がある。

*afaD*保有大腸菌については、検出頻度は1.1%と低率ではあったが、実際に散発下痢症から分離されることが判明し、大分県の過去の下痢症事例由来株中にも存在していた。これらが、下痢の起因菌であったかどうかは現時点では証明できないが、原因不明の食中毒事例が発生した場合に、*afaD*保有大腸菌も検討すべき可能性の1つであることを示している。しかしながら、健康者由来の大腸菌157株中2株(1.3%)も*afaD*を保有しており、個々の散発事例においては、*afaD*検出だけでは原因菌の推定根拠にならないこともわかった。

今後もデータを蓄積して疫学的証拠を積み上げる一方で、大腸菌が産生する生理活性物質等の新たな視点から真の病原因子の解明とそのマーカーを探す調査を行いたい。

## 謝 辞

PCRの陽性コントロールと御指導を賜りました国立感染症研究所の伊藤健一郎博士に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 成松浩志, 緒方喜久代, 阿部義昭, 帆足喜久雄: 大分県における下痢症由来大腸菌の病原性関連遺伝子の保有状況調査. 大分県衛生環境研究センター年報, 29, 51-55 (2001).
- 2) 成松浩志, 緒方喜久代, 鷺見悦子, 帆足喜久雄: 健康人由来大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況調査. 大分県衛生環境研究センター年報, 30, 47-52 (2002).
- 3) Michael S. Donnenberg ed. : "Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen." p. 81-118, 189-207 (2002), Academic Press.
- 4) Mabel Jouvl, Marie-Isabelle Garcia, Pascale courcoux, Agnes Labigne, Pierre Gounon and Chantal le Bouguenec: Adhesion to and Invasion of HeLa Cells by Pathogenic Escherichia coli Carrying the *afa-3* Gene Cluster Are Mediated by AfaE and AfaD Proteins, Respectively. Infect. Immun. 65(10), 4082-4089 (1997).
- 5) 伊藤健一郎, 倉園 貴至, 山崎 貢, 中嶋 洋, 森屋 一雄: 食品中の大腸菌汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究. 平成13年度厚生科学研究事費補助金生活安全総合研究事業総括・分担研究報告書「食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究」, 99-122 (2003).
- 6) Luiz R. Trabulsi, Rogeria Keller, and Tania A. Tardelli Gomes: Typical and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli., Emerging Infectious Disease, 8 (5), 508-513 (2002).
- 7) 緒方喜久代, 成松浩志, 鷺見悦子, 内山静夫: 既知の病原因子を保有しない大腸菌06:H10 (*astA*保有) が検出された下痢症集団発生事例—大分県. 病原微生物検出情報, 25 (4), 101-102 (2004).

表1 使用したプライマー一覧

| 標的遺伝子       | primer       | mer | 塩基配列 (5' → 3')             | 位置        | Tm    | 産物長            | 病原性関連因子                             |
|-------------|--------------|-----|----------------------------|-----------|-------|----------------|-------------------------------------|
| <i>eae</i>  | eaek1        | 20  | GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT       | 66-85     | 53.83 | 591bp          | intimin                             |
|             | EA-2         | 20  | CTCTGCAGATTAACCTCTGC       | 656-637   | 55.28 |                |                                     |
| <i>perA</i> | perAks       | 20  | GGCGATGTCAGTAGTTC AAT      | 553-572   | 55.23 | 176bp          | plasmid-encoded regulator           |
|             | perAkas      | 20  | GAATTAACCAACCAACA          | 728-709   | 55.07 |                |                                     |
|             | perAtrkas    | 20  | GAATTAACCAACCAAGCA         | 726-707   | 55.39 |                |                                     |
| <i>tir</i>  | tir3koms     | 16  | GSTGGGGAATTGGTG            | 1123-1138 | 58.23 | 420bp          | Tir (translocated intimin receptor) |
|             | tir3kRDECs   | 16  | GGCGGGGAATTGGTG            | 1123-1138 |       |                |                                     |
|             | tir3kas      | 21  | CAGAAGCGCATAAGTRCTTTG      | 1542-1522 | 55.58 |                |                                     |
| <i>bfpA</i> | bfpks        | 20  | GAAGTAATGAGCGCAACGTC       | 154-173   | 58.53 | 248bp<br>133bp | bundlin                             |
|             | bfpAkomas2   | 20  | GTTGCAAGACTAACACATGC       | 401-382   | 54.29 |                |                                     |
|             | bfpA_IS66kas | 21  | AATACGGTCTTGTGCACGC        | 287-267   | 64.63 |                |                                     |
| <i>espA</i> | espAks1m     | 22  | TATATGTAYCAGGCACAAGCG      | 151-172   |       | 376bp<br>350bp | EspA (secreted proteins)            |
|             | espA119kas   | 20  | GCATATCTGAACGAGCATTT       | 526-507   | 55.49 |                |                                     |
|             | espAcomkas   | 21  | AACGTATTTGACATTTGCTG       | 500-480   | 54.93 |                |                                     |
| <i>ler</i>  | lerks2       | 27  | AAGCAGATTACTTATTACAATAAACC | 148-174   | 53.47 | 205bp          | LEE-encoded regulator               |
|             | lerkas       | 23  | CCTTCAAGAAAATCTTCTTTC      | 352-330   | 56.41 |                |                                     |
| <i>aggR</i> | aggRks1      | 21  | GTATACACAAAAGAAGGAGC       | 100-120   | 51.05 | 245bp          | regulator                           |
|             | aggRkas2     | 20  | ACAGAATCGTCAGCATCAGC       | 353-334   | 58.99 |                |                                     |
| <i>astA</i> | EASTOS1      | 21  | GCCATCAACACAGTATATCCG      | 3-23      | 57.98 | 109bp          | EAST1                               |
|             | EASTOAS2     | 20  | CGCGAGTGACGGCTTTGTAG       | 111-92    | 64.24 |                |                                     |
| <i>aafA</i> | aafAks2      | 22  | TAGCAAAACTGCGACCAGTAC      | 71-92     | 59.47 | 380bp          | AAF/ II fimbriae                    |
|             | aafAkas2     | 22  | TTCATATAGCCTGGTCGTAGC      | 450-429   | 60.48 |                |                                     |
| <i>aggA</i> | aggA-OS2     | 22  | CTTTGGGTTTAGTTAGTCTTCT     | 44-65     | 52.2  | 254bp          | AAF/I fimbriae subunit              |
|             | aggA-0AS3    | 22  | CCACTTATTAGCGGCACCTGTT     | 297-276   | 63.5  |                |                                     |
| <i>pet</i>  | pets         | 20  | TTTCCAGCACTTCCTGTTC        | 280-299   | 60.23 | 297bp          | toxin                               |
|             | petas        | 20  | ATTTCCAACGTCTACGCCAT       | 576-557   | 59.46 |                |                                     |
| <i>aggB</i> | aggBOS5      | 20  | TGCGGTGTA CTGTGATGGT       | 3477-3496 | 60.03 | 249bp          | invasin                             |
|             | aggBOAS5     | 20  | CCCACCCCTATTTGACTT         | 3725-3706 | 60.05 |                |                                     |
| <i>afaD</i> | afaDks1      | 22  | GGGAGTATAAGGAAGATGATGC     | 7-28      | 56.84 | 267bp          | invasin                             |
|             | afaDkas2     | 18  | CCTGACACGAAGCTCATG         | 273-256   | 56.16 |                |                                     |

表2 *eaeA*保有大腸菌におけるその他の付着関連遺伝子保有状況調査結果

| 由来        | 血清型 |          | 菌株数    | LEE (染色体) 上 |             |            | EAFプラスミド上   |             |         |
|-----------|-----|----------|--------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|---------|
|           | 0   | H        |        | <i>tir</i>  | <i>espA</i> | <i>ler</i> | <i>perA</i> | <i>bfpA</i> |         |
| 健康者       | UT  | NT       | 5      | 4           | 5           | 5          | 1           | 0           |         |
|           |     |          | %      | 100.0%      | 80.0%       | 100.0%     | 100.0%      | 20.0%       | 0.0%    |
| 下痢症       | 55  | 7        | 2      | 2           | 0           | 2          | 0           | 0           |         |
|           | 63  | 6        | 2      | 2           | 2           | 2          | 0           | 0           |         |
|           | 86a | UT       | 1      | 1           | 1           | 1          | 0           | 1           |         |
|           | 119 | 19, NM   | 3      | 3           | 3           | 3          | 0           | 0           |         |
|           | 124 | 40       | 1      | 1           | 0           | 1          | 0           | 0           |         |
|           | 125 | 6        | 1      | 1           | 1           | 1          | 0           | 0           |         |
|           | 153 | 19       | 1      | 1           | 0           | 1          | 0           | 0           |         |
|           | 153 | NM       | 1      | 0           | 0           | 1          | 0           | 0           |         |
|           | 157 | 16       | 1      | 1           | 1           | 1          | 0           | 0           |         |
|           | 157 | 45       | 1      | 1           | 1           | 1          | 1           | 1           | Typical |
|           | 157 | NM       | 1      | 1           | 1           | 1          | 0           | 0           |         |
|           | UT  | NT       | 9      | 8           | 8           | 8          | 0           | 0           |         |
|           | UT  | NM       | 3      | 1           | 2           | 3          | 0           | 0           |         |
| 不明(下痢?)*1 | 153 | 19(21)*2 | 1      | 1           | 1           | 1          | 1           | 1           | Typical |
|           |     | 計        | 28     | 24          | 21          | 27         | 2           | 3           |         |
|           |     | %        | 100.0% | 85.7%       | 75.0%       | 96.4%      | 7.1%        | 10.7%       |         |

\*1: 被験者の自己申告は健康とのことであったが、便は緑色水様便であった。

\*2: H型別結果が、1回目はH19、2回目はH21であった。

UT: 型別不能、NM: 運動性なし、NT: 検査未実施

表3 *aggR*保有大腸菌におけるその他の付着関連遺伝子保有状況調査結果

| 由来  | 血清型 |            | 菌株数    | LEE (染色体) 上 |             |             |             |             |            |
|-----|-----|------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|     | 0   | H          |        | <i>aggR</i> | <i>astA</i> | <i>aggA</i> | <i>aggB</i> | <i>aafA</i> | <i>pet</i> |
| 健康者 | 25  | 6          | 1      | 1           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
|     | 44  | UT         | 1      | 1           | 1           | 0           | 0           | 1           | 1          |
|     | 111 | 21         | 1      | 1           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
|     | UT  | NM         | 1      | 1           | 0           | 1           | 1           | 0           | 0          |
|     |     |            | 4      | 4           | 1           | 1           | 1           | 1           | 1          |
|     |     | %          | 100.0% | 100.0%      | 25.0%       | 25.0%       | 25.0%       | 25.0%       | 25.0%      |
| 下痢症 | 86a | NM, NT     | 3      | 3           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
|     | 111 | 21         | 6      | 6           | 5           | 0           | 0           | 0           | 0          |
|     | 111 | 19, NM     | 2      | 2           | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
|     | 114 | NT         | 1      | 1           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
|     | 126 | 27, UT, NM | 4      | 4           | 3           | 0           | 1           | 4           | 3          |
|     | 164 | NM         | 1      | 1           | 1           | 0           | 0           | 1           | 1          |
|     | UT  | 10         | 1      | 1           | 1           | 1           | 1           | 0           | 0          |
|     |     |            | 18     | 18          | 11          | 1           | 2           | 5           | 4          |
|     |     | %          | 100.0% | 100.0%      | 61.1%       | 5.6%        | 11.1%       | 27.8%       | 22.2%      |

UT: 型別不能、NM: 運動性なし、NT: 検査未実施

表4 当所保存の大腸菌株における $afaD$ 保有状況調査結果

| 下痢症患者由来株 |           |           |                  | 健康人由来株 |           |           |                  |
|----------|-----------|-----------|------------------|--------|-----------|-----------|------------------|
| 血清型      |           | 検査<br>菌株数 | $afaD(+)$<br>菌株数 | 血清型    |           | 検査<br>菌株数 | $afaD(+)$<br>菌株数 |
| 0        | H         |           |                  | 0      | H         |           |                  |
| 1        | NM, NT    | 3         | 2                | 1      | 7, NM, NT | 18        | 0                |
| 6        | 10, NM    | 7         | 0                | 6      |           | 3         | 1                |
| 18       | 6, 21, NT | 5         | 0                | 8      | NT        | 5         | 0                |
| 25       | NT        | 1         | 1                | 15     | NT        | 1         | 0                |
| 36       | 7         | 2         | 0                | 18     | 7, NT     | 6         | 0                |
| 44       | NT        | 1         | 0                | 20     |           | 2         | 0                |
| 55       | 10        | 4         | 0                | 25     | 6, NT     | 6         | 1                |
| 63       | 6         | 1         | 0                | 44     | UT        | 1         | 0                |
| 86a      | UT, NT    | 2         | 0                | 125    | NT        | 2         | 0                |
| 114      | NM        | 1         | 0                | 126    | NT        | 2         | 0                |
| 115      | UT        | 1         | 0                | 128    | NT        | 1         | 0                |
| 119      | NT        | 1         | 0                | 146    | NT        | 2         | 0                |
| 125      | 6, NT     | 4         | 0                | 151    | NT        | 1         | 0                |
| 126      | NM, NT    | 4         | 2                | 152    | NT        | 1         | 0                |
| 143      | 4, NM     | 2         | 0                | 153    | NT        | 3         | 0                |
| 146      | NT        | 4         | 0                | 159    | NT        | 3         | 0                |
| 153      | 19        | 2         | 0                | 164    | NT        | 2         | 0                |
| 157      | NM        | 2         | 0                | 166    | NT        | 2         | 0                |
| 158      | NT        | 1         | 1                | 167    | NM, NT    | 2         | 0                |
| 159      | 38        | 7         | 0                | 169    | NT        | 1         | 0                |
| 164      | NM        | 1         | 0                | R      | NT        | 7         | 0                |
| 166      | NT        | 3         | 0                | UT     | NM, NT    | 86        | 0                |
| 167      | NT        | 1         | 0                |        |           |           |                  |
| 168      | NT        | 1         | 0                |        |           |           |                  |
| 169      | NT        | 2         | 0                |        |           |           |                  |
| UT       | NM, NT    | 4         | 0                |        |           |           |                  |
| 計        |           | 67        | 6                | 計      |           | 157       | 2                |

R：自家凝集、UT：型別不能、NM：運動性なし、NT：検査未実施