

山梨県内の腸管出血性大腸菌 0157 発生状況及び IS-printing system について (2009 年～2013 年)

植松 香星, 柳本 恵太

Epidemiological Survey and IS-printing System Analysis of
Enterohemorrhagic *E. coli* 0157 in Yamanashi Prefecture (2009～2013)

Kosei UEMATSU and Keita YANAGIMOTO

キーワード: Enterohemorrhagic *E. coli*, 血清型別, IS-Printing system

多くの *Escherichia coli* は、ヒトや動物の腸管正常細菌叢の一つである。一部では下痢、腹痛などの原因となる *E. coli* があり、一括して下痢原性大腸菌と呼ばれ、発生機序の違いにより主に 5 つのカテゴリーに分けられる。

腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*: EPEC)

腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*: EIEC)

腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC)

腸管凝集付着性大腸菌 (Enterocoagulative adherent *E. coli*: EAaggEC)

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC)

EHEC は、志賀毒素産生性大腸菌 Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) 又は Verotoxin-producing *E. coli*: VTEC) と呼ばれることが多い。ここでは、EHEC と呼ぶこととする。

EHEC は、ヒトからヒトへと感染する経路と本菌によって汚染された水や食品を経口摂取することで感染する食中毒としての形態があり、集団発生を引き起こすことが知られている。1982 年にアメリカ合衆国で発生したハンバーガーによる集団食中毒が最初の報告事例である¹⁾。そして、国内では、1984 年に大阪府で確認された事例が最初であるが²⁾、1990 年の埼玉県内の幼稚園での集団事例で社会的に知られるようになった。この事例は、溶血性尿毒症症候群 (HUS) により 2 名の園児が死亡したことが知られる³⁾。

さて、県内での EHEC 0157 による集団発生の報告は、これまでに無く、散発事例については、1990 年までさかのぼることができる。現在の南アルプス市内の医療機関で分離された事例である。患者は、4 歳の男児で分離菌は VT1 及び VT2 産生菌であった。当時の伝染病予防法では、届出の義務は無く、菌株の確保が困難な状況であったが、当時医療機関から下痢原性大腸菌を収集していたため EHEC 0157 を分離することができた。

その後、県内の EHEC 0157 の発生状況の報告について

は、金子ら⁴⁾、大沼ら⁵⁾、野田ら⁶⁾、千須和ら⁷⁾により報告されている。今回は、EHEC 0157 について過去 5 年間 (2009 年～2014 年) の発生状況報告を行い、近年開発された multiplex-PCR の技術を用いた分子疫学指標である IS-printing system⁸⁾を行ったので併せて報告する。

方 法

1 疫学情報

医師の保健所への届出に基づき保健所がデータ入力している NESID システムにより集計を行った。

2 使用菌株

2009 年 1 月から 2013 年 12 月に県内医療機関 (県内医療機関が検査委託をしている県内外の登録検査所を含む) で分離された株のうち、菌株確保が可能であった 38 株及び保健所からの依頼により当研究所が分離した 3 株の合計 41 株を用いた。

3 血清型別試験

血清型別については、常法⁹⁾により行い、市販の抗血清 (デンカ生研) を用いて O 型別及び H 型別を行った。運動性が無い株については、HNM と表記した。

4 IS-printing system (IS 法)

保存菌株を普通寒天培地に 35℃一夜培養後生じたコロニーを用いた。さらに TSB 培地 (OXOID) で 35℃18～20 時間静置培養し、生理食塩水で 10 倍希釈後、100 μl をとり 12,000r.p.m、4℃、10 分間遠心 (トミー精工) した。

得られた沈渣をアルカリ溶菌処理により遺伝子を抽出し鑄型 DNA とした。

PCR 試薬は、(東洋紡 (株)) を用いて取扱説明書のと

おり調製した。遺伝子増幅装置は、DNA Thermal Cycler (Perkin-elmer /cetus) を用い反応条件は、前熱変 96°C2 分、熱変性 96°C20 秒、アニーリング 64°C30 秒、伸長反応 68°C1 分で 20 サイクルとした。

増幅された PCR 産物を電気泳動により検出した。泳動槽は Mupid-2X ((株) アドバンス) を用い、泳動条件は、

0.5×TBE 緩衝液で 100V、50 分泳動後 50V、40 分泳動した。

泳動後、エチジウムブロマイド染色し撮影後、バンドの有無について判定を行った。バンドが生じた部位を 1 と表記し、バンドが生じない場合を 0 と表記した。

表 1 患者疫学情報

感染者No.	報告年月	診断の種類	性別	年齢	発生状況	血清型	ペロ毒素型
1	2009年7月	患者	女	85	散発	0157:H7	VT1+VT2
2	2009年7月	患者	男	19	散発		
3	2009年8月	患者	女	28	家族内	0157:H7	VT1+VT2
4	2009年8月	無症状病原体保有者	男	33		0157:H7	VT1+VT2
5	2009年8月	患者	女	50	散発	0157:H7	VT1+VT2
6	2009年12月	患者	女	26	家族内	0157:HNM	VT1+VT2
7	2009年12月	無症状病原体保有者	男	26		0157:HNM	VT1+VT2
8	2010年4月	患者	女	32	散発	0157:H7	VT1+VT2
9	2010年6月	無症状病原体保有者	男	43	散発	0157:H7	VT1+VT2
10	2010年6月	患者	男	22	散発	0157:H7	VT1+VT2
11	2010年7月	患者	男	3	家族内	0157:H7	VT1+VT2
12	2010年7月	無症状病原体保有者	女	34		0157:H7	VT1+VT2
13	2010年8月	患者	女	15	散発	0157:H7	VT2
14	2010年8月	患者	女	18	散発		
15	2010年8月	患者	男	22	散発	0157:H7	VT1+VT2
16	2010年9月	患者	女	14	家族内	0157:H7	VT1+VT2
17	2010年9月	患者	男	10		0157:H7	VT1+VT2
18	2010年11月	患者	女	41	散発	0157:H7	VT1+VT2
19	2011年1月	患者	女	75	家族内	0157:H7	VT1+VT2
20	2011年1月	無症状病原体保有者	男	74		0157:H7	VT1+VT2
21	2011年7月	患者	男	33	散発	0157:H7	VT1+VT2
22	2011年7月	患者	女	47	家族内	0157:H7	VT2
23	2011年7月	患者	男	52		0157:H7	VT2
24	2011年7月	患者	男	18	散発	0157:H7	VT1+VT2
25	2011年9月	患者	男	23	散発	0157:H7	VT1+VT2
26	2011年9月	患者	女	10	家族内	0157:H7	VT1+VT2
27	2011年10月	無症状病原体保有者	女	12		0157:H7	VT1+VT2
28	2011年11月	患者	男	3	散発	0157:H7	VT1+VT2
29	2012年5月	患者	男	29	散発	0157:H7	VT1+VT2
30	2012年7月	無症状病原体保有者	男	57	散発	0157:H7	VT2
31	2012年7月	無症状病原体保有者	女	30	散発	0157:HNM	VT1+VT2
32	2012年8月	患者	女	39	散発	0157:H7	VT1+VT2
33	2012年8月	患者	女	56	散発	0157:H7	VT1+VT2
34	2012年10月	患者	女	4	散発	0157:H7	VT1+VT2
35	2012年10月	患者	男	19	散発	0157:H7	VT2
36	2013年4月	患者	男	18	散発	0157:H7	VT2
37	2013年7月	患者	女	79	散発	0157:H7	VT1+VT2
38	2013年8月	患者	男	10	散発	0157:H7	VT1+VT2
39	2013年8月	患者	男	27	散発	0157:HNM	VT2
40	2013年9月	患者	女	7	散発	0157:H7	VT1+VT2
41	2013年10月	患者	男	1	散発	0157:H7	VT2
42	2013年10月	患者	女	33	散発	0157:HNM	VT1
43	2013年11月	患者	男	6	散発	0157:H7	VT1+VT2

表 2 EHEC 0157 感染者の年齢・性別分布

性別	年齢群 (歳)							合計
	0～9	10～19	20～29	30～39	40～49	50～59	60～	
男	4	6	6	2	1	2	1	22 (51.2)
女	2	5	2	5	2	2	3	21 (48.8)
合計	6	11	8	7	3	4	4	43
(%)	(14.0)	(25.6)	(18.6)	(16.3)	(7.0)	(9.3)	(9.3)	(100)

結果及び考察

1 発生状況

県内での 2009 年～2013 年の EHEC 0157 感染者発生数状況を表 1 に示した。感染者 43 名であり、そのうち 14 名が家族内感染であった。年齢範囲は、1 歳～85 歳であった。

EHEC 0157 感染者の年齢及び性別分布を表 2 に示した。各年齢群別で最多であったのが、10～19 歳の 25.6%であり、次いで 20～29 歳の 18.6%であった。39 歳以下の年齢群が全体の 74.5%を占めていた。金子ら⁴⁾は、若年層に感染者が多いことを示しており、今回も同様な傾向であった。男女の内訳は、男 22 名、女 21 名であり、男女比は、ほぼ 1:1 であった。

年別感染者発生数を図 1 に示した。過去 5 年間では、年間 7 名～11 名の感染者発生があった。2010 年の 11 名の発生が最も多く、次いで 2010 年の 10 名であった。感染者発生が最も少ない年は、2009 年及び 2012 年の 7 名であった。

過去 5 年間の月別感染者発生状況を図 2 に示した。7 月の発生が 11 名と最も多く、次いで 8 月の 10 名であった。金子ら⁴⁾、大沼ら⁵⁾、千須和⁷⁾の報告と同様夏季の発生が多い傾向であった。

無症状病原体保有者を除いた発現率は、水様性下痢 91.4%、腹痛 82.9%、血便 51.4%、発熱(37℃以上) 22.9%、嘔吐 11.4%、HUS 疑い 2.9% (1 名)、痙攣 2.9% (1 名)であった。HUS 疑いは 1 歳であり、痙攣については、85 歳の高齢者であった。乳幼児や高齢者は、HUS を続発することがあるので注意する必要がある。

2 血清型別及びベロ毒素型別

菌株の確保が可能であった 41 株についての血清型別の結果を表 3 に示した。O157:H7 で VT1 及び VT2 を産生する株が最も多く O157 全体の 70.7%を占めていた。また、O157:HNM で VT1 のみ産生の菌株が 1 株分離され、後で示す IS 法でも stx2 のバンドは認められなかった。これは、ベロ毒素遺伝子の変異又は欠落によるものと思われる。

3 IS 法結果

IS 法の結果を表 4 に示した。使用した 41 株から 31 パターンが得られた。家族内事例が 7 事例あり、そのうち

表 3 EHEC 0157 の血清型及びベロ毒素型

血清型	ベロ毒素型	合計	%
O157:H7	VT1+VT2	29	70.7
O157:H7	VT2	7	17.1
O157:HNM	VT1+VT2	3	7.3
O157:HNM	VT2	1	2.4
O157:HNM	VT1	1	2.4

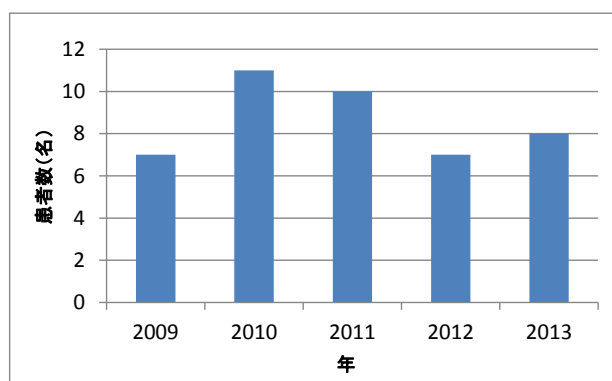
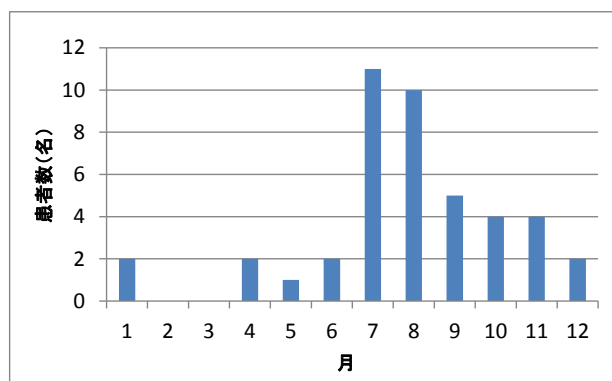


図 1 年別感染者発生数

図 2 EHEC0157 月別感染者発生数
(2009 年～2013 年)

5 事例についてパターンが一致した。一致しなかった 2 事例は、感染者 No. 3, 4 の事例及び感染者 No. 6, 7 であった。感染者 No. 3, 4 については、1st set の 3 番目、2nd set の stx2 及び stx1 のバンドが異なっていた。これは保存中の変異が原因と考えられたが、今後パルスフィールド電気泳動 (PFGE) を行い詳細に検討していく必要がある。感染者 No. 6, 7 については、stx2 のバンドの有無による違いであったので先に述べた stx2 遺伝子の

変異や落脱が考えられた。

疫学情報が一致せず IS 法が一致したパターンが 4 パターンあった。感染者 No. 6 及び 31、感染者 No. 33、37、43 の組み合わせ、感染者 No. 16 又は 17 と 25 の組み合わせ、感染者 No. 9、10 及び 21 であった。感染源が同一である可能性が否定できないことから今後 PFGE についても行っていく必要がある。

今回、過去 5 年間で分離された 41 株について IS 法を行ったところ 31 パターンに分けられた。そのことから散发事例について IS 法は有用と思われた。IS 法でスクリーニングを行いパターンが一致した株について、PFGE を行う方法が省力化でき合理的と考えられた。

謝 辞

最後に菌株の提供をいただいた関係医療機関に深謝いたします。

参考文献

- 1) Riley L. et al: Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. , N. Engl. J. Med. , **308**, 681~685, (1983)
- 2) 埼玉県衛生部: 「腸管出血性大腸菌による幼稚園集団下痢症」報告書, 1991 年 10 月
- 3) 小林一寛ら: *Escherichia coli* 0157 による出血性大腸炎の“さかのぼり”調査, 感染症学雑誌, **59**, 1056~1060, (1985)
- 4) 金子通治 野田裕之 浅川洋美: 山梨県における 1999 年度の腸管出血性大腸菌 0157 の分離状況と細菌・疫学的検討, 山梨衛公研年報, **43**, 9~13, (2000)
- 5) 大沼正行 野田裕之 金子通治: 山梨県における腸管出血性大腸菌の分離状況と特徴 (2000~2002), 山梨衛公研年報, **46**, 27~31, (2002)
- 6) 野田裕之 長田美母衣 金子通治: 1995 年~2006 年の 12 年間に山梨県で発生した細菌性食中毒とその特徴, 山梨衛公研年報, **50**, 20~27, (2006)
- 7) 千須和美母衣 野田裕之: 山梨県における三類感染症の発生状況 (2003~2007), 山梨衛公研年報, **51**, 29~31, (2007)
- 8) Ooka T, et al: Development of a Multiplex PCR-Based Rapid Typing Method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 Strains, J. Clin. Microbiol. , **47**, 2888~2894, (2009)
- 9) 厚生省監修: 微生物検査必携細菌真菌検査, 第 3 版, 日本公衆衛生協会, 東京 (1987)