

山梨県における1999年度の腸管出血性大腸菌 O157の分離状況と細菌・疫学的検討

金子通治 野田裕之 浅川洋美

Bacteriological and Epidemiological Studies on Enterohemorrhagic
Escherichia coli O157 in Yamanashi Prefecture (Apr. 1999～Mar. 2000)

Michiharu KANEKO, Hiroyuki NODA and Hiroyoshi ASAKAWA

はじめに

1996年5月に岡山県の小学校で腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 以後 EHEC) O157:H7による集団食中毒が発生した。この事件以後、この年日本全国各都道府県でEHEC O157による集団食中毒、散発下痢症が発生し、社会問題ともなった。同年7月に発生した堺市の小学校を中心にした集団食中毒事例は、患者が9000人を越えた。全国で発生例があったということは、すでにEHEC O157が全国に広く存在し、いつでも感染する機会のあることをも示唆した。

EHEC O157:H7による最初の事例報告¹⁾は、1982年アメリカのミシガン州とオレゴン州での食中毒事件であり、日本では1990年の大宮市の幼稚園での発生が初めての集団下痢症事例²⁾であった。この1990年の事例以降、全国の地方衛生研究所等の機関で志賀毒素検出法の検査体制が整備された。その結果、EHEC O157:H7をはじめとしてO26やO111等の志賀毒素産生株による食中毒・下痢症事例の報告^{3～11)}が相次いでなされてきた。

山梨県は1996年の全国各地でのEHEC O157:H7による食中毒下痢症事例では全国で最後の発生県であった。その事例および1990年から1999年6月までのO157等のEHEC株の細菌学的特徴については、すでに前報¹²⁾にその詳細を述べ、基礎的資料とした。

今回は、1999年度に分離されたEHEC株(すべてEHEC O157)の分離状況と細菌・疫学的特徴について検討したのでそれらの成績を報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

1999年度に分離されたEHEC O157型株計15株を供試した。これら15株のうち、5月に分離された2株は

前報¹²⁾と重複している。15株の内訳は県内医療機関等で分離された12株および患者発生に伴う保健所の接触者検便で分離された3株である。うち14株は志賀毒素産生性試験を依頼された株で、残りの1株は民間検査機関で志賀毒素産生性を調べたのち、再度当所で毒素産生性を確認した株である。

2. 検査方法

前報¹²⁾での報告と同様に実施した。すなわち、CT-SMAC培地およびクロモアガー培地で出現したコロニーをEHEC O157で感作した感作ラテックスで凝集を確認後、TSI, LIM培地等で生化学的、血清学的性状からO157と同定した。

志賀毒素産生性試験も前報¹²⁾同様にRPLA法およびPCR法の両法を実施し、EHEC O157と決定してStx1, Stx2の毒素型別を行なった。

3. 薬剤感受性試験法

NCCLS法の規格に準拠した一濃度ディスク法(BBLセンシディスク)によった。使用薬剤は前報¹²⁾同様15薬剤である。SAとしてスルフィソキサゾールを用い、ほかはSM, TC, CP, KM, ABPC, CET, CFX, LMOX, スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合剤いわゆるST, NFLX, CL, FOM, GMおよびNAである。

4. プラスミドの検出

KadoとLiuの方法¹³⁾に準拠し、プラスミドを検出した。ペンアッセイブローンスで1晩培養した被検菌のプラスミドDNAを抽出後、0.65%のアガロースゲル、TBEバッファーを使用し、100V2時間30分間電気泳動した。泳動後ゲルをエチジウムブロマイド液で染色、水洗後UV照射下でプラスミドDNAを観察後撮影し、プラスミドのバンドを確認した。標準プラスミド保有株として、サルモネラL156株、大腸菌NR1株およびV517株を用いた。

表1 1999年度の腸管出血性大腸菌 O157 の分離状況

No.	菌株No.	分離年月日	施設	年齢・性	血清型	志賀毒素型	備考
1	32. (99-52)	1999.05.19	YK-HP	31 M (P)* ¹	O157:H7	— Stx2	
2	33. (99-53)	" 05.21	日下部HC (衛生公署研究所)	47 M (P)	"	— Stx2	
3	34. (99-143)	" 07.27	KOK-HP	23 M (P)	"	Stx1, Stx2	
4	35. (99-144)	" 07.26	ShiC, JM	17 F (P)	"	Stx1, Stx2	
5	36. (99-145)	" 07.26	YC-HP	23 F (P)	"	Stx1, Stx2	
6	37. (99-146)	" 07.26	HaC, JM	19 M (P)	"	Stx1, Stx2	
7	38. (99-156)	" 08.04	KMK-HP	7 M (P)	"	Stx1, Stx2	
8	39. (99-157)	" 08.04	YC-HP	69 M (P)	"	Stx1, Stx2	ABPC耐性
9	40. (99-170)	" 08.10	KOK-HP	11 M (P)	"	Stx1, Stx2	
10	41. (99-197)	" 08.22	KOK-HP	28 F (P)	O157:HNM	— Stx2	ABPC耐性
11	42. (99-202)	" 08.23	KK-HP	18 F (P)	O157:H7	— Stx2	
12	43. (99-209)	" 08.30	KoC, JM	2 F (P)	"	— Stx2	
13	44. (99-223)	" 09.03	甲府HC	9 M (P)	"	— Stx2	No. 12の兄
14	45. (99-224)	" 09.03	甲府HC	6 M (C)* ²	"	— Stx2	No. 12の弟
15	46. (99-470)	2000.02.10	ImC, SRL	55 M (P)			

*¹: (P); 患者 *²: (C); 無症状保菌者

5. 染色体DNAの制限酵素切断パターン分析

パルスフィールド電気泳動法 (PFGE法) を利用し、前報¹²⁾ 同様に実施した。スタートの試料は液体培養菌 (ベンアッセイブローズ) を用いた。35℃, 18時間培養菌を10,000rpm, 4℃で6分間遠心し、その沈渣の菌を供試菌とした。制限酵素は Xba I を用いた。電気泳動装置は CHEF-DR II (Bio-Rad) を使用し、DNA 切断パターンの分類は国立感染症研究所の分類方法によった。

結果および成績

1. EHEC O157 感染者の1999年度の発生状況

表1には1999年度に分離された EHEC O157 の分離株の性状と感染者の年齢、性別等を示した。1999年度は EHEC O157 のみが分離され、計15名、15株で、ほかの血清型株は分離されなかった。患者、保菌者別では、No.14のみが家族内感染の保菌者検索から分離された株で、保菌者由来である。

表2に1999年度の分離株も含め、1990年からの年次別の EHEC O157 分離株数と毒素型を示した。1999年は1997年に次いで多く EHEC O157 が分離された。また、1999年は、初めて運動性のない O157:HNM が分離され、その毒素型は Stx2 単独産生株であった。EHEC O157:H7 型では、例年と比較し、Stx2 単独産生株が6株と多くみられた。1990年からの統計では EHEC O157

型計40株のうち、O157:H7, Stx1, Stx2 産生型株が30株と最も多く、75%を占めた。次いで O157:H7, Stx2 産生型株が9株、22.5%、O157:HNM, Stx2 産生型株が1株、2.5%の順であった。

表3には1999年度の EHEC O157 型株の月別分離状況を示した。計15株のうち、7, 8, 9月の夏季の3ヶ月間で12株、80%を占めた。ほかは5月に2株、2月に1株が分離されたのみであった。

2. EHEC O157 感染者の年齢・性別分布

表4は15名の患者の年齢・性別分布を10歳ごとにみたものである。多い順に、0~9歳まで4名、10~19歳まで4名、20~29歳まで3名の順であった。ほかの年代層は各1名ずつであった。感染者の年齢は、表1に示したが、感染者の平均年齢は24歳であった。また、感染者の最低年齢は2歳女児で、最高年齢は69歳男であった。男女別では、男10名に対し女は5名と半数にとどまった。

3. EHEC O157 の薬剤感受性とプラスミドプロファイル

EHEC O157 15株のうち、耐性株は2株で表1の No.9 O157:H7, Stx1, Stx2 産生型株と No.11 の O157:HNM, Stx2 産生型株で、菌の性状はそれぞれ異なっていたがいずれも ABPC 単剤耐性型であった。それ以外のほかの13株はすべて感受性株であった。

表2 年次別のヒト由来 EHEC O157 の分離株数と毒素型

血清型	毒素型	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	計 (%)
O157 : H7	Stx1, Stx2	1	—	—	—	—	—	2	14	5	8	—	30 (75)
O157 : H7	— Stx2	—	1	1	—	—	—	—	1	—	5	1	9 (22.5)
O157 : HNM	— Stx2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1 (2.5)
計		1	1	1	0	0	0	2	15	5	14	1	40 (100)

* 2000年3月31日現在

表3 1999年度の月別 EHEC O157 の分離状況

血清型	毒素型	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
O157 : H7	Stx1, Stx2	—	—	—	4	4	—	—	—	—	—	—	—	8
O157 : H7	— Stx2	—	2	—	—	—	3	—	—	—	—	1	—	6
O157 : HNM	— Stx2	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
計		0	2	0	4	5	3	0	0	0	0	1	0	15

表4 1999年度の EHEC O157感染者の年齢・性別分布

性	年 齢 群 (歳)							計
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	
男	3	2	1	1	1	1	1	10 (66.7)
女	1	2	2	0	0	0	0	5 (33.3)
計	4	4	3	1	1	1	1	15
(%)	(26.7)	(26.7)	(20)	(6.7)	(6.7)	(6.7)	(6.7)	(100)

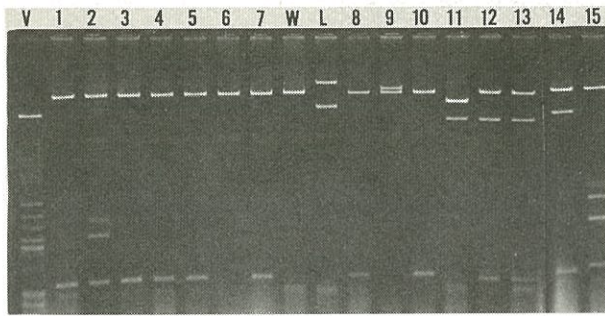
また、15株中14株が92.4kb¹⁴⁾プラスミドを共通に保有していた。この14株のうち、3株(レーン12,13,14)が92.4kbのほかに50kbプラスミドを、1株(レーン9)が110kbプラスミドをそれぞれ保有していた。14株以外のほかの1株(レーン11)は75kb, 50kbプラスミドを保有し、ABPC耐性株であった。残りのABPC耐性1株(レーン9)は92.4kbと110kbプラスミドを保有していた株であった。図1にそれらのプラスミドプロファイルを示した。レーン13とレーン14は泳動ゲルのウェルの数の関係からプロファイルの写真を一緒に合わせた。レーンVに *E. coli* V517 (55kb)、レーンWに *E. coli* W677 (NR1) (94.5kb) およびレーンLに *S. Enteritidis* L156 (200, 60kb) のサイズマーカー株を配した。図1

にみられるように小さいプラスミドを保有していた株もあるが、これら小さいプラスミドの検討は省略した。

4. EHEC O157 の DNA 切断パターン分析

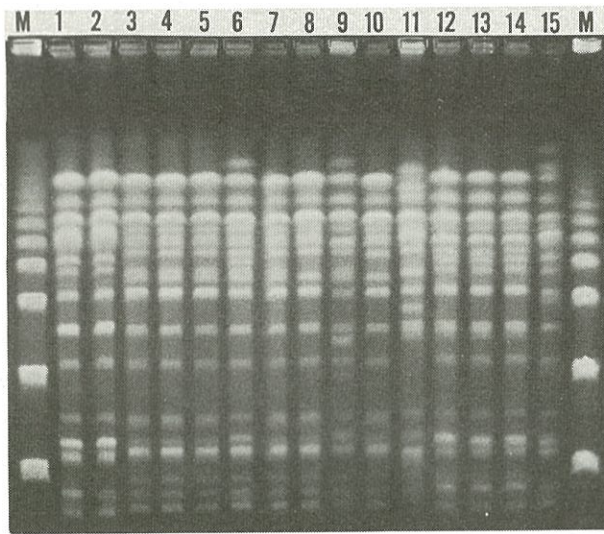
国立感染症研究所でのDNA切断パターン分類によって検討した。すなわち、制限酵素 Xba I による PFGE 法の EHEC O157 染色体 DNA 切断断片のパターンによって株間の比較、分析をした。

表5にはEHEC O157 15株のPFGE法の分類パターンを、また、図2にはPFGE法による切断パターンを示した。表5に示したように、計9の型に分類された。最も多かった型は、菌株 No.34, 35, 36, 38, 39 の II b', II b, III であった。これらは7月下旬から8月上旬にかけて分離された



レーン V : *E. coli* V517
 " 1 : 菌株 No. 32
 " 2 : 菌株 No. 33
 " 3 : 菌株 No. 34
 " 4 : 菌株 No. 35
 " 5 : 菌株 No. 36
 " 6 : 菌株 No. 37
 " 7 : 菌株 No. 38
 " 8 : 菌株 No. 39
 レーン W : *E. coli* W677 (NRI)
 " L : *S. Enteritidis* L156
 " 9 : 菌株 No. 40
 " 10 : 菌株 No. 41
 " 11 : 菌株 No. 42
 " 12 : 菌株 No. 43
 " 13 : 菌株 No. 44
 " 14 : 菌株 No. 45
 " 15 : 菌株 No. 46

図1 EHEC O157のプラスミドプロファイル



レーン M : λ ladder
 " 1 : 菌株 No. 32
 " 2 : 菌株 No. 33
 " 3 : 菌株 No. 34
 " 4 : 菌株 No. 35
 " 5 : 菌株 No. 36
 " 6 : 菌株 No. 37
 " 7 : 菌株 No. 38
 レーン 8 : 菌株 No. 39
 " 9 : 菌株 No. 40
 " 10 : 菌株 No. 41
 " 11 : 菌株 No. 42
 " 12 : 菌株 No. 43
 " 13 : 菌株 No. 44
 " 14 : 菌株 No. 45
 " 15 : 菌株 No. 46

図2 EHEC O157のPFGEパターン

株である。1996年に堺市を中心にして発生した集団食中毒での堺株のパターンであるIIa, IIb, Iの型と一致したのは菌株No.37の1株のみであった。これらの型は図2の切断パターンによっても明らかであるが、同じ分類型でも菌株No.38と39ではバンドが1本異なっていることが観察された。

前報¹²⁾のPFGEパターンの分類に比べ、堺型の1株を除き、新しい型に分類される株が大部分であった。

表5 EHEC O157のPFGEパターン分類*
(制限酵素 Xba I)

No.	菌株No.	<100kb	100-200kb	>350kb
1	32	IIIk	ND	III
2	33	IIIk	ND	III
3	34	IIb'	IIb	III
4	35	IIb'	IIb	III
5	36	IIb'	IIb	III
6	37	IIa	IIb	I
7	38	IIb'	IIb	III
8	39	IIb'	IIb	III
9	40	IIa	IIa	I
10	41	II f	IIa	III
11	42	IIIa	V	ND
12	43	IIIb'	ND	III
13	44	ND	ND	III
14	45	ND'	ND	III
15	46	ND'	ND	ND

* 国立感染症研究所の分類による

考 察

1999年度は計15名の感染者から15株のEHEC O157が分離された。O157:H7が14株で、ほかの1株はO157:HNMで、山梨県では初めて分離された血清型であった。毒素型もStx2単独産生株が多いという特徴がみられた。前報¹²⁾同様集団発生例はなく、すべて散発下痢症事例であった。また、これら事例の原因食品は不明であった。原因食品の究明は、本感染症の潜伏時間の長さ(4~8日)から喫食食品が残存しておらず調べるのが難しい。集団食中毒事例の場合は喫食食品が保存されている場合も多く、検査も可能で原因食品が判明することがある。しかし散発事例では上述のように喫食食品がなく、原因食品は不明である。

PFGE法を使用しての分離株のDNA切断パターン、菌の保有プラスミドおよび薬剤感受性から菌株間の比較検討を行なった。散発事例においても、菌株No.43, 44, 45のように家族内感染事例では保有プラスミド、薬剤感受性およびPFGEパターンは同一であり、同一菌株によると推定できた。しかし、推定原因食品、食材等がない場合には汚染源が究明できない場合がほとんどであった。

1999年度は1997年に次いで多くEHEC株が分離され、しかもPFGEパターンの多様化が目立ってきている。また、初めてEHEC O157:HNM型株が分離されたことなどを考慮すると、EHEC O157は身の回りの食生活環境にすでに常在していると考えられ、食品の取り扱い、調理等には十分な配慮が必要である。

DNA切断パターンのわずかなバンドの相異については、Tenoverら¹⁵⁾、Muraseらの*Salmonella*における例¹⁶⁾からも2~3本のバンドの相異は相関性を否定するものではないと考えられている。EHEC O157の一部の株は92.4kbプラスミドのほか110, 75, 50kbのプラ

スミドも保有しており、宮崎ら、原田らの報告^{17, 18)}と同様であった。92.4kb プラスミドは HEp-2 培養細胞等の付着に役割を果たしていると Toth らは報告¹⁹⁾しており、92.4kb プラスミドは病原性の発現にも関与していると考えられることができる。

EHEC O157 等の感染症は発症菌数が少なく、潜伏時間が長いことから原因食品の判明は難しい。さらに散発事例では喫食品が残存していることがほとんどなく、原因究明が困難であることが多い。

しかし、関東一円のカイワレによる EHEC O157 感染症事例、イクラによる O157 感染症事例等広域的な散発事例の集積、いわゆる diffuse outbreak の可能性もあり、近県同志の情報交換も大切で、重要である。また、今後汚染源や感染源の追求、菌株間の比較検討のために PFGE 法による DNA パターンの解析は必要不可欠であると考えられる。

文 献

- 1) Riley L. W. et al. : 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) 国立予防衛生研究所 : 病原微生物検出情報, **17**, 1~2 (1996)
- 4) 同上 : 病原微生物検出情報, **17**, 180~190 (1996)
- 5) 国立感染症研究所 : 病原微生物検出情報, **18**, 153~154 (1997)
- 6) 同上 : 病原微生物検出情報, **19**, 122~123 (1998)
- 7) 甲斐明美, 工藤泰雄 : 日本の感染性腸炎 II, 211~222, 菜根出版, 東京 (1997)
- 8) 小嶋由香ら : 川崎市衛研年報, **29**, 85~89 (1993)
- 9) 梅迫誠一ら : 奈良衛研年報, **29**, 54~61 (1993)
- 10) 河野喜美子ら : 宮崎衛環研年報, **6**, 41~45 (1995)
- 11) 八柳 潤ら : 病原微生物検出情報, **18**, 132~133 (1997)
- 12) 金子通治ら : 山梨衛公研年報, **42**, 17~24 (1998)
- 13) Kado, C. I. & Liu, S. T. : J. Bacteriol., **145**, 1365~1373 (1981)
- 14) Levine, M. M. et al. : J. Infect. Dis., **156**, 175~182 (1987)
- 15) Tenover F.C. et al. : J. Clin. Microbiol., **33**, 2233~2239 (1995)
- 16) Murase T. et al. : Microbiol. Immunol., **40**, 873~875 (1996)
- 17) 宮崎憲明ら : 長崎衛公研所報, **42**, 25~29 (1996)
- 18) 原田誠也ら : 熊本保環研所報, **27**, 38~42 (1997)
- 19) Toth I. et al. : Infect. Immun., **58**, 1223~1231 (1990)