

資料

腸管出血性大腸菌O111:H- 感染症事例の疫学的解析

榭 美代子, 宮崎 佳都夫, 小川 博美, 福田 澄子*, 財間 尚夫*

Epidemiological Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111:H- Infections in Hiroshima Prefecture

MIYOKO SAKAKI, KAZUO MIYAZAKI, HIROMI OGAWA, SUMIKO FUKUDA* and HISAO ZAIMA*

(Received Oct. 30, 2000)

平成8年のO157大流行以降は、広島県内でも他の血清型による感染が増加傾向を示してきた。本年夏季に、尾道市で腸管出血性大腸菌O111感染症2事例が相次いで集団発生したため、他のO111事例も加えて感染実態を解明するために疫学的解析を行い以下の結果を得た。2事例とも接触者検便等により10名から菌が検出されたが、大半は無症状であった。食品・環境調査からは菌が検出されず、感染源は特定できなかった。薬剤感受性試験から耐性は認められなかった。DNA解析結果から、それぞれの事例内の感染源は同一であり、事例間では感染源は異なることが明かにされた。除菌治療後に再排菌が認められたケースがあり、終息までに長期間を要した。

キーワード: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, O111, 集団発生事例, ペロ毒素, パルスフィールドゲル電気泳動法

緒言

平成8年に西日本を中心としてO157による大規模な集団発生が相次ぎ、その後も全国各地で患者の発生が続いた[1, 2]。O157が腸管出血性大腸菌(EHEC)の代名詞となっていたが、翌年からは全国的にO157による集団事例は減少し、O26, O111等他の血清型による集団事例や散発事例が増加傾向を示すようになった[3]。本県でも同様な傾向が認められ、事例数は依然としてO157が多いものの、O26やO111による集団及び散発事例が増加してきた[4]。本年夏季に、尾道市で発生した2例のO111による集団事例について相互の関連や感染実態を解明するために、過去の保存株を加えて、分子疫学的解析を行ったので報告する。

材料及び方法

1. 調査材料

(1) 患者情報の収集

発生の都度、年齢、性別、発症日、症状、採便日、便状、家族状況、原因推定食品等の項目について行った。

(2) 接触者検便及び感染源調査

1例目(A事例)の接触者検便は、対象者712名延べ

846件を調査した。原因究明のためS小学校の給食保存食29検体及び飲料水1検体と砂場の砂、動物の糞、排水溝等の環境18検体を供試した。同じく2例目(B事例)は、検便対象者101名延べ253件を調査した。原因究明のため、C児童厚生施設の井戸水1検体及び施設の砂場の砂、飼育動物の糞、飼育水槽水等の環境14検体を供試した。

(3) 分子疫学的解析

供試菌株は本年6月から9月の間に集団発生したA, B事例に由来する10株ずつ計20株及び他のO111事例から1株ずつ計6株を対照株として、総計26菌株を用いた。

2. EHEC検査方法

検査の主な流れを図1に示した。家族及び接触者から保健所で分離された菌株(当所でVTを検出)や、医療機関等から分離された患者の菌株を収集し、再分離の後、性状や血清型、VT型を確認した。必要に応じて、薬剤感受性試験やDNA解析等を実施した。

(1) 分離及び同定

食品や環境材料は、mEC培地(極東製薬)で増菌培養した[5]。ただし、A事例のみセフィキシム(藤沢薬品)0.05mg/lと亜テルル酸カリウム(和光純薬)2.5mg/lを添加した。選択分離培養にはセフィキシム・亜テルル酸カリウム加ソルボース・マッコンキー寒天培地(CT-

*広島県三原保健所尾道支所: Hiroshima Prefectural Mihara Community Health Center, Onomichi Branch Office

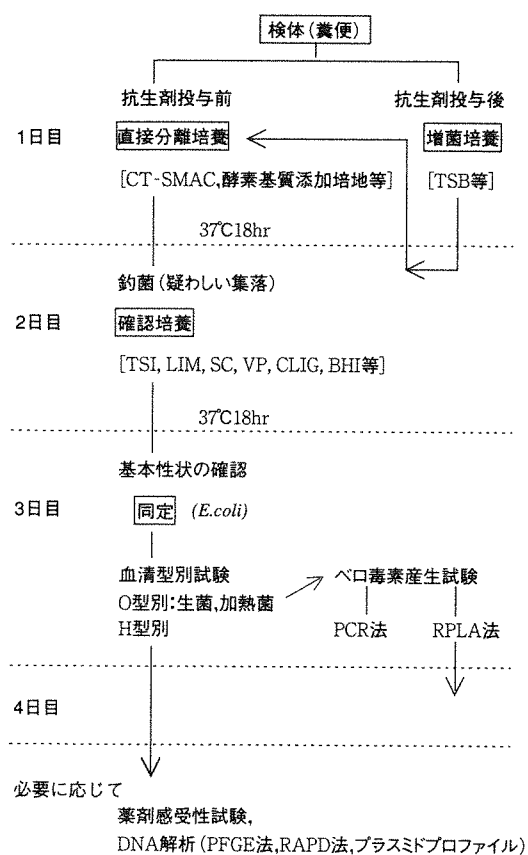


図1. 腸管出血性大腸菌の検査手順

SMAC)を用いた[6]. 分離培養にSIB寒天培地(極東製薬)も併用した. 収集した菌株の生化学性状試験は, TSI, LIM, SC寒天培地(日水製薬), VP半流動培地(栄研化学), CLIG寒天培地(極東製薬)を, 糖分解試験は, フェノールレッドプロスペース(Difco)にソルビット, ラムノース, ソルボース(和光純薬)をそれぞれ1%に添加し使用した. 各事例の代表株について簡易同定キットAPI 20E(ビオメリューバイテック)を使用し大腸菌の性状確認を行った.

(2) 血清型別

O及びH血清型別は, それぞれ病原大腸菌免疫血清「生研」1号及び2号セット(デンカ生研)を使用した. O型別は, 121°C15分加熱処理した菌液とのスライド凝集反応で, H型別はマイクロプレート凝集法により決定した.

(3) ペロ毒素(VT)産生性及びVT遺伝子の検出

VT産生性はCAYE培地(自家調整)で37°C一夜振盪培養した遠心(10000rpm, 5min)上清を, VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)による逆受身ラテックス凝集反応で測定した. VT遺伝子の検出は, Karch *et al*の方法[7, 8]ならびにO157 One Shot PCR Typing Kit(室酒造)によるPCR法で行った. 両試験法によりVT型の1型, 2型を型別した.

3. 薬剤感受性試験

National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)法に準じディスク法で行った. 供試菌液濃度をマクファーランド0.5に調整後, ミューラーヒントンII寒天培地(BBL)に均一に接種後, センシディスク(BBL)を置き, 37°C18時間培養後阻止円を計測した. 薬剤はアンピシリン(ABPC), ストレプトマイシン(SM), テトラサイクリン(TC), セプロフロキサシン(CPFX), カナマイシン(KM), セフォタキシム(CTX), クロラムフェニコール(CP), ST合剤(ST), トリメトプリム(TMP), ゲンタマイシン(GM), ナリジクス酸(NA), ホスホマイシン(FOM)の12剤を用いた.

4. パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)によるDNA解析

染色体DNAの抽出及び制限酵素による処理はGene Path Group 6 Reagent Kit(Bio-Rad)を使用し, 添付のマニュアルに準じた. 主な操作手順は, LB一夜培養液80 µlの菌体を100 µlのアガロースゲル内に均一に固めたプラグを作成し, Lysozyme, ProteinaseKで処理後制限酵素で切断した. そのDNA断片をアガロースゲル内に挿入しPFGE装置で泳動後, エチジウムブロマイドで染色し, UV照射して泳動像をポラロイドフィルムに撮影した[9]. 制限酵素は*Xba* I, *Spe* Iを, 機種はCHEF MAPPER(BAIO-RAD)を用いた. 泳動条件は*Xba* I切断後, 6V/cm, 120°, 4 to 8sec 9hrs, 8 to 50sec 13hrs及び*Spe* I切断後, オートプログラム10-300kbで20時間18分泳動した[10].

結果及び考察

EHEC O111による集団感染症2事例及び対照事例の患者情報及び菌株の検査結果を表1に示した.

1. A, B事例の概要

A事例: 尾道市内のS小学校1年生6歳女児が本年6月16日から腹痛, 嘔吐を呈し小児科を受診し18日入院, 19日採取した便から22日O111(VT 1, 2)を検出した. 当日から保健所で, 接触者調査を家族とS小学校1年生全員及び職員を対象として実施し, 食品・環境調査も開始した. その結果7家族10名(内医療機関5名)から菌が分離され, そのうち有症者4名(血便1名), 家族内感染3名が確認された. 感染の広がりによって, 調査対象者はそれぞれの家族とS小学校, S幼稚園全員及びK中学校のクラス全員と担当職員に拡大された. 食品環境等からは菌が検出されず, 原因は特定できなかった. 連続2回の検便で菌陽性者の陰性化確認を実施したが, 児童1名から再排便が認められ(7月14日採便), その陰性化を待

表1 広島県内で発生したO111事例の概要 (H9-12年, 広島市を除く)

| No. | 届出年月日 | 発症年月日 | 保健所 | 発生状況 | 感染者数 | 有症者数 | 血清型 | 毒素型 | 薬剤耐性 |
|-----|-----------|-----------|-----|------|------|------|---------|--------|----------------------|
| ① | H 9. 9.17 | H 9. 9.18 | 廿日市 | 散 発 | 1 | 1 | O111:H- | VT1 | ABPC, SM, TC, KM, NA |
| ② | H10. 8.11 | H10. 8. 3 | 福山市 | 散 発 | 1 | 1 | O111:H- | VT1, 2 | - |
| ③ | H10.10.26 | H10.10.20 | 廿日市 | 散 発 | 1 | 1 | O111:H- | VT1 | - |
| ④ | H10.11. 9 | H10.10.30 | 廿日市 | 集団C | 40 | 11 | O111:H- | VT1 | ABPC, SM, TC, KM, NA |
| ⑤ | H12. 6.22 | H12. 6.16 | 尾 道 | 集団A | 10 | 4 | O111:H- | VT1, 2 | - |
| ⑥ | H12. 8. 3 | H12. 7.27 | 尾 道 | 集団B | 10 | 1 | O111:H- | VT1 | - |
| ⑦ | H12. 8.19 | H12. 8. 8 | 廿日市 | 家族内 | 2 | 1 | O111:H- | VT1, 2 | - |
| ⑧ | H12. 8.24 | H12. 8.20 | 福山市 | 家族内 | 2 | 1 | O111:H- | VT1, 2 | - |
| | | | 合計 | | 67 | 21 | | | |

って届出から48日目の8月9日に終息した。

事例B: 同じ市内のC児童厚生施設に通う4歳男児が本年7月27日から下痢を呈し小児科で31日採取した便から8月3日O111(VT1)を検出した。接触者調査は家族と施設児全員及び職員について開始した。最終的に8家族10名から菌が分離され、その内訳は施設利用児から9名と家族の学童1名で有症者は初発患者のみであった。使用していた井戸水と環境等検査結果は陰性であった。感染経路として簡易プールのプール水(施設外利用者から感染者は出ていない)及び施設内の足洗い場で午睡前に行っていた水浴びの溜り水等からの感染が疑われたが、確認検査はできなかった。本事例で感染が比較的拡大しなかったのは、発生が夏休み期間中で出席学童が少なかったこと、昼食は弁当を持参していたことなどが大きな要因と考えられた。又、2名の幼児から再排菌が認められたため10月6日、届出から64日目に終息した。過去のO111やO26の事例についても発生から約2か月後に陰性化したケースがあり、除菌や陰性化には長期間を要することが報告されている[11, 12]。抗生剤の使用は、VTの放出や腸内細菌叢の攪乱、耐性菌の出現等の問題があり、今後抗生剤投与以外に、乳酸菌やカテキン等を利用した治療効果が期待されている[13, 14]。又、菌陽性者への対応については、集団が背景にある場合、集団の施設を一時的に閉鎖したり、あるいは本人が、集団への参加を自粛するというケースが多い。このような集団への感染防御を優先させる対応は、平成11年4月に施行された感染症法の精神からずれており、無症状の感染者が多いO26, O111等は、O157との区別をするか、無症状感染者に対する軽減措置を行う等の見直しが望まれる。

2. 菌株の型別と性状

血清型とVT型は、A事例がO111:H-, VT 1, 2で、B事例がO111:H-, VT 1であった。対照とした他のO111:H- 6事例のVT型は1, 2型が3株と1型が3株であった。生化学性状は全ての事例株とも普通の大腸菌に比べ、リジン脱炭酸陰性、β-グルクロニダーゼ

(MUG)遅陽性、ソルボース非分解の性状が異なり、これらの特徴が菌の分離を容易にした。API 20Eコードは1044552(*E.coli* I)に該当した。

3. 薬剤感受性試験

対照とした2事例株(廿日市保健所管内で発生)はABPC, SM, TC, KM, NAの5剤に耐性を示したが、他は全ての供試薬剤に感受性を示した。

4. PFGEによるDNAパターン解析

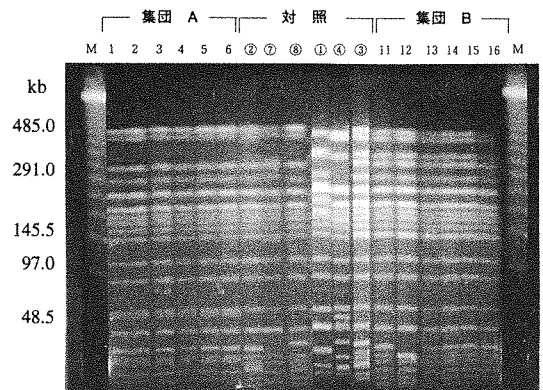


図2. パルスフィールドゲル電気泳動パターン(*Xba* I 切断) レーン M: λ Ladder

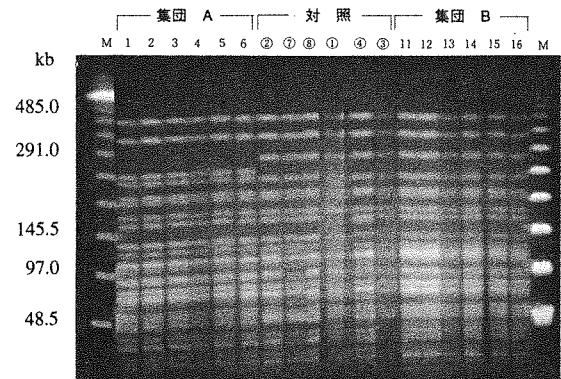


図3. パルスフィールドゲル電気泳動パターン(*Spe* I 切断) レーン M: λ Ladder

A, B事例とも同一集団内ではほぼ一致したパターンが得られたが, 事例間においては明らかな差を認めた. 感染研のDNA解析結果ではO157以外のEHECについては遺伝子型はND表示され菌株ごとに異同のコメントのみが記載されている. その内容はA事例株は, 初発菌株と全て一致し, B事例については2番菌株が2バンド, 3番菌株が1バンド異なり, 他は一致したとのコメントであった. そこで, *Xba* I によるPFGE(図2)を感染研と同等の条件[10]で実施し, 泳動パターンを比較した. B事例の1-2本のバンドの違いは, いずれも48.5kb以下の小さな分子量領域で認められたが, この差は許容範囲内であることから, 同一感染源と考えられた. 又, 他の保存株の中にも泳動パターンが類似するものも認められた. A事例株と対照②株は48.5kb以下でわずかな差異を認めたが, 総じて同一VT型でみると大きな分子量サイズでは類似していた. 対照の①, ④株(VT1型)はバンドの数, 位置ともに他の菌株とは異なった. *Spe* I によるPFGE像(図3)をみると, A事例株だけが200-300kbの範囲でB事例や対照株と差異が認められた. 以上のことから, A, B事例株には明かな差を認め, VT型別の違いもあり, 相互の感染源, 感染経路には共通性がないことが明らかとなった. 又, 今回の2事例は, 全国の同時期に発生したO111菌株間の比較検討はされていないが, 今後, 地方衛生研究所と感染研を結ぶパルスネットが構築されれば, 全国的に感染源, 感染経路を迅速に把握, 分析することも可能になると考えられる[15].

結 語

1. O111:H-によるA, B集団事例は接触者検便等により各10名から菌が検出され, うち有症者はA事例4名, B事例1名, 無症状感染者が大半であった.
2. A, B事例とも食品・環境調査からは菌が検出されず, 感染源は特定できなかった.
3. A, B事例株の薬剤耐性は認められなかったが, 対照の2事例で5剤耐性を認めた.
4. DNA解析結果からA, Bそれぞれの事例内の感染源は同一であり, 事例間では感染源は異なることが明かにされた.
5. A, B事例及び他のO111集団事例で除菌治療後に再排菌が認められたケースがあり, 終息までに長期間を要した.

本調査研究の疫学情報ならびに菌株収集にご協力いただきました保健所はじめ関係機関各位に深謝致します.

文 献

- [1] 伊藤 武, 甲斐明美(1996):腸管出血性大腸菌食中毒の発生状況. 医学のあゆみ178, 909-914.
- [2] 国立予防衛生研究所(1997):特集Vero毒素産生性大腸菌(腸管出血性大腸菌)感染症1996-1997. 6. 病原微生物検出情報月報18, 153-154.
- [3] 国立感染症研究所(2000):O157以外の腸管出血性大腸菌(EHEC)の血清型別成績. 病原微生物検出情報月報21, 94.
- [4] 榊 美代子(2000):腸管出血性大腸菌感染症の発生状況について. 第8回広島県保健環境センター業績発表会要旨集1-4.
- [5] 森 良一(1998):O157以外の腸管出血性大腸菌のスクリーニング方法に関する研究. H9年度厚生科学研究報告書・保健医療福祉地域総合調査研究事業46-48.
- [6] 厚生省生活衛生局食品保健課長通知(1997):腸管出血性大腸菌O157の検査法について. 衛食第207号, 衛乳第199号.
- [7] Karch, E., Meyer, T.(1989):Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27, 2751-2757.
- [8] 伊藤文明, 荻野武雄, 伊藤健一郎, 渡辺治雄(1992):混合プライマーを用いたPCRによる下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法. 日本臨床(特別号) 343-347.
- [9] Barrett, T.J., Lior, H., Green, J.H., Kakhria, R., Wells, J.G., Bell, B.P., Green, K.D., Lewis, I., Griffin, P.M.(1994):Laboratory investigation of a multistate foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. J.Clin.Microbiol.32,3013-3017.
- [10] 寺島 淳(2000):腸管出血性大腸菌及び赤痢菌の解析条件の標準化について. 衛生微生物技術協議会第21回研究会講演抄録集39. 郡山市.
- [11] 榊 美代子, 宮崎佳都夫, 竹田義弘, 東久保 靖, 山田圭一, 小川博美, 佐々木実己子, 島岡真佐子(1999):保育園児等に発生した腸管出血性大腸菌(O111:H-)感染症の集団事例について. 第4回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム抄録3. 吹田市.
- [12] 杉村光永, 財間尚夫(1999):当所管内で発生した腸管出血性大腸菌O26による感染症事例について. 公衆衛生検査5, 47-50.
- [13] 相場勇志, 藤本孝明, 志水恵子, 古賀泰裕(1998):VTEC感染に対する乳酸菌の抗生物質との併用療法を含めた治療効果. 第3回腸管出血性大腸菌感染症

シンポジウム40, 東京都.

- [14]大久保幸枝, 佐々木武二, 原 征彦, 森 扶美代, 島村忠勝(1998): 腸管出血性大腸菌O157:H7に対するCatechinの殺菌作用及び抗毒素作用. 感染症学雑誌72, 211-217.
- [15]寺島 淳(2000): パルスフィールドゲル電気泳動法による腸管出血性大腸菌及びその早期把握システムの構築. 第21回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集38-39, 東京都.

