

愛媛県における腸管出血性大腸菌の分子疫学的考察

吉田紀美 青木紀子 田中 博 大瀬戸光明 井上博雄

The Epidemiological PFGE Analysis of Enterohemorrhagic *E. coli* in Ehime Prefecture

Kimi YOSHIDA, Noriko AOKI, Hiroshi TANAKA
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUYE

In Ehime prefecture, one hundred and seventy three patients of the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) infection including two outbreak cases were reported during April 1999 and December 2003. A total of one hundred and fifty eight EHEC isolates were collected and tested by various biological methods such as both verotoxin (VT) and serotyping with polyclonal antibodies against O and H antigens. Out of those isolates one hundred and forty three isolates were typed as O157:H7/–, fourteen were O26:H11/– and one was O121:H19. It was confirmed that O157 was most predominant in Ehime prefecture recently.

In 2003 forty-two EHEC isolates detected in hospitals or health care centers were examined by those method and antibiotic susceptibility pattern assay against twelve antibiotics. And we conducted the genetic epidemiology of O157:H7/– strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *Xba* I digestion of chromosomal DNA of sixteen strains selected randomly from thirteen cases in 2003. By the PFGE analysis some isolates from sporadic cases occurred independently were genetically identical, so it was suggested that those cases were a diffuse outbreak originated from the common source.

Keywords : enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), O157, O26
pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), diffuse outbreak

はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) による感染症は感染症法上三類感染症に指定され、全国の患者発生が報告されている。本疾病は例年夏季を中心として発生しているが¹⁾、愛媛県でも年間数十例の散発例に加えて、2000年以降、病院²⁾、保育園等での集団感染も見られている。

EHECの疫学調査のマーカーとして汎用されているのは、生化学的性状、ベロトキシン (VT) 型及びパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE法) 等である。そのなかでPFGE法は感染研において全国統一のプロトコールが推奨され、全国で広域に拡がる散在的集団発生の探知に利用されているが、本県においても1996年以降積極的に導入され^{3) 4)}、EHECのみならずサルモネラ等の食中毒の原因究明等に役立っているところである^{5) 6) 7)}。さらにその技術の普及と全国的なPulse-Netの構築⁸⁾を目的に、全国6ブロックの地方衛生研究所が参加して研

究班が結成され、当所も参加しているところである⁹⁾。

今回、感染症法施行後5年間の本県におけるEHEC感染症発生状況について報告するとともに、2003年分離株の分子疫学的解析を行なったので報告する。

対象と方法

1) EHEC感染症患者の発生状況

愛媛県感染症発生動向調査事業におけるEHEC感染症患者報告数を集計した。

2) EHEC分離株

愛媛県感染症発生動向調査病原体検査要領に基づき、診断した医師へ病原体の提供を依頼した。2003年は医療機関等から42株のEHEC (O157 40株, O26 2株) が提供された。

3) 分離株の確認検査及び薬剤感受性検査

分離株については図1により、生化学的性状試験、Vero毒素 (VT) 産生試験等を行いEHECであることを確認した。薬剤感受性試験はNCCLSの方法により、ア

ンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), ストレプトマイシン (SM), トリメトプリム (TMP), スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST), ナリジクス酸 (NA), シプロフロキサシン (CPFEX), ホスホマイシン (FOM) の12薬剤に対する耐性の有無を判定した。

4) 分離株の遺伝子解析

PFGE法は、感染研の新プロトコールにより実施した(図2)。標準マーカーとして、*Salmonella* Braenderup H9812株を用いて、PFGEの画像をFingerprinting II (Bio-Rad社)で画像解析を行い、デンドログラムを作成した。

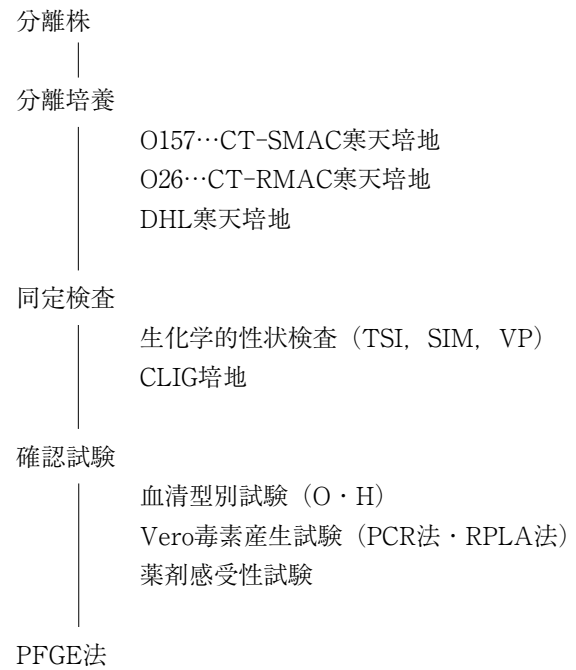


図1 腸管出血性大腸菌の確認検査

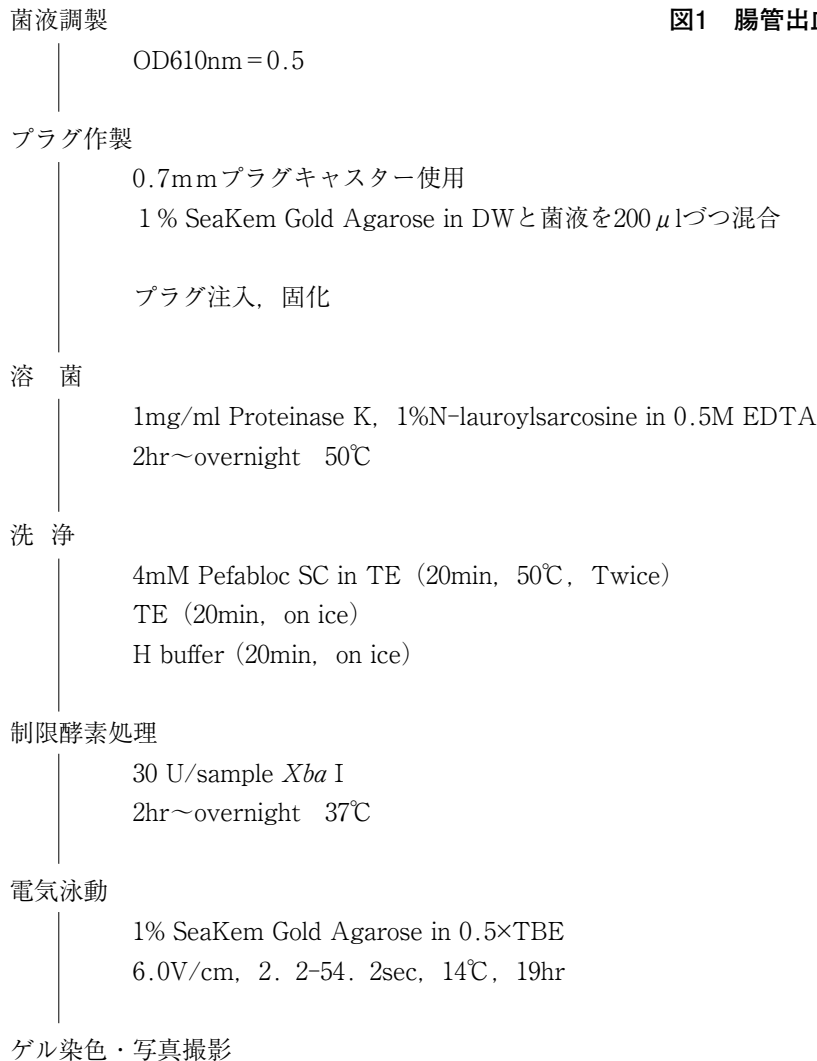


図2 PFGE法の新プロトコール

結 果

1) EHEC感染症患者の発生状況

1999年感染症施行以後のEHEC感染症患者の発生状況を表1に示す。

愛媛県では年間17～53例の発生で推移している。このうち2001年には松山市内の病院で26名のO157集団感染が、また2003年には宇和島中央保健所管内の幼稚園で20名のO157集団感染が発生した。その他は単発あるいは家族内感染の事例であった。O型別の内訳はO157が145例(83.8%)についてO26が22例(12.7%)であった。その他O111が1999年に4例、2000年にO121とO153が各々1例ずつ発生した。

月別の患者数を図3に示す。6～8月の夏季には毎年発生しているが、冬季に患者発生がみられた年もあった。その中で2003年宇和島管内のO157集団発生は11月下旬に発生した。

2) 1999年以降のEHEC分離株の性状

1999年から2003年に発生したEHEC感染症173例のうち、当所に提供を受けた分離株は158件であった(表2)。

血清型はO157:H7が132件(84.5%)についてO157:H-が11件、O26:H11及びO26:H-がそれぞれ7件、O121:H19が1件であった。毒素型別ではO157はVT1&2産生株が116件(81.1%)で、O26は全てVT1産生株であった。またO121はVT2産生であった。

3) 2003年のEHEC感染症患者と病原体情報

表3に2003年のEHEC感染症患者数を示す。2003年は単発6事例、家族内感染事例7事例、集団感染事例1例の計14事例43名の患者発生であった。14事例のうち13事例42件の分離株が搬送された。その起因菌はO157:H7(VT1&2)が10事例、O157:H-(VT1&2)が2事例、O26:H11(VT1)が1事例であった。薬剤感受性試験の結果、ABPC耐性2件、ABPC+SM及びSM耐性1件、ABPC+SM+TC耐性が1件であった。

3) 2003年分離株の遺伝子解析

2003年のO157分離株の中から事例ごとに1～2株選びPFGEを実施した。デンドログラムを作成し株間の遺伝子の相同性を比較した(図4)。O157:H7では事例2、5、1及び14はDNAの相同性が94%以上で非常に同一性の高

表1 腸管出血性大腸菌感染症患者数

(感染症発生動向調査)

年	全国患者数*	愛媛県患者数 (集団発生再掲)	O型別				
			157	26	111	121	153
1999	3,222	32	26	2	4		
2000	3,647	28	21	5		1	1
2001	4,336	53 (26)	47	6			
2002	3,185	17	10	7			
2003	2,986	43 (20)	41	2			
計	17,376	173 (46)	145	22	4	1	1

* 文献(1)から引用

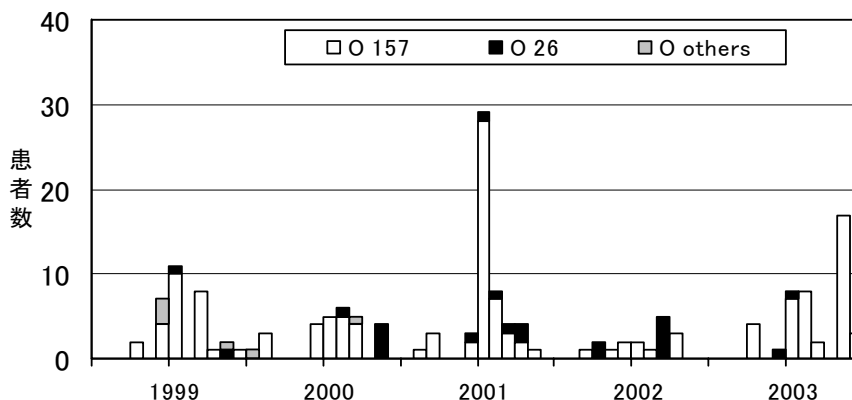


図3 愛媛県における腸管出血性大腸菌感染症の月別発生状況

い株であり、また事例7と8及び事例9と10は各々100%同一DNAの株であった。O157:H-では事例12と事例4で別のPFGEパターンを示した。H-では事例12と事例4で別のPFGEパターンを示した。

考 察

1999年感染症法施行以後、全国のEHEC感染症の発生動向が詳細に調査報告されている¹⁾。全国的には食中毒はじめ集団感染事例を含め、毎年約3000人以上の発生がみられている。愛媛県においては2001年までは散発的な発生に留まっていたが、2001年7月松山市内の病院で入

表2 EHEC血清型と毒素型

(1999~2003年 分離株158株)

血清型	株数	VT1	VT2	VT1+VT2
O157:H7	132	2	21	109
O157:H-	11	3	1	7
O157計	143	5	22	116
O26:H11	7	7	0	0
O26:H-	7	7	0	0
O26計	14	14	0	0
O121:H19	1	0	1	0

表4 2003年愛媛県内の腸管出血性大腸菌感染症分離株

事例番号	患者情報						病原体情報									
	患者	週	保 健 所	年齢	性別	症状	血清型	毒素型 VT	耐性薬剤*	菌株番号	DNA切断パターン (感染研)					
											[<100kb	100~ 200kb	>200kb]	
1	1	14	松山市	48	女	無	157	7	1・2	-	E2 H15	[IIa	IIa	I]
	2	14	松山市	4	男	有	157	7	1・2	-	E1 H15	[IIa	IIa	I]
2	3	15	松山市	5	男	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	4	15	松山市	30	男	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
3	5	26	今治中央	6	女	有	26	11	1	ABPC		[ND	ND	ND]
	6	27	今治中央	42	女	無	26	11	1	ABPC		[ND	ND	ND]
4	7	27	松山中央	17	女	有	157	-	1・2	-	E56 H15	[IIIa'	IVa	VIII]
	8	28	松山中央	49	男	無	157	-	1・2	-		[IIIa'	IVa	VIII]
5	9	29	松山市	28	女	有	157	7	1・2	-	E59 H15	[IIa	IIa	I]
6	10	29	松山市	19	女	有	(分離株なし)									
7	11	29	松山市	28	女	有	157	7	1・2	-	E62 H15	[IIa	IIb	I]
	12	30	松山市	34	男	有	157	7	1・2	-	E61 H15	[IIa	IIb	I]
8	13	31	松山市	5	女	有	157	7	1・2	-	E66 H15	[IIa	IIb	I]
9	14	32	松山市	13	男	有	157	7	1・2	-	E68 H15	[IIa'	ND	III]
10	15	32	松山市	82	男	有	157	7	1・2	-	E70 H15	[IIa'	ND	III]
11	16	34	伊予三島	15	女	有	157	7	1・2	-	E77 H15	[IIb	IIb	I]
	17	34	伊予三島	45	男	無	157	7	1・2	ABPC		[IIb	IIb	I]
12	18	34	今治中央	9	男	有	157	-	1・2	ABPC・SM	E79 H15	[IIIb	ND	ND]
	19	35	今治中央	37	女	無	157	-	1・2	ABPC・SM		[IIIb	ND	ND]
	20	35	今治中央	39	男	無	157	-	1・2	SM	E87 H15	[IIIb	ND	ND]
	21	35	今治中央	11	女	無	157	-	1・2	ABPC・SM		[IIIb	ND	ND]
13	22	39	新居浜	2	男	有	157	7	1・2	ABPC・SM・TC	E108 H15	[IIa	ND	I]
	23	40	新居浜	4	女	無	157	7	1・2	ABPC・SM・TC	E109 H15	[IIa	IIa	I]
14	24	47	宇和島中央	3	男	有	157	7	1・2	-	E173 H15	[IIa	IIa	I]
	25	48	宇和島中央	6	男	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	26	48	宇和島中央	5	男	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	27	48	宇和島中央	4	男	有	157	7	1・2	-	E158 H15	[IIa	IIa	I]
	28	48	宇和島中央	4	男	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	29	48	宇和島中央	4	女	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	30	48	宇和島中央	6	男	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	31	48	宇和島中央	6	女	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	32	48	宇和島中央	6	女	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	33	48	宇和島中央	4	女	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	34	48	宇和島中央	2	女	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	35	48	宇和島中央	10	女	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	36	48	宇和島中央	4	女	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	37	48	宇和島中央	4	女	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	38	48	宇和島中央	5	男	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	39	48	宇和島中央	61	女	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	40	48	宇和島中央	4	女	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	41	49	宇和島中央	6	男	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	42	49	宇和島中央	8	男	有	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]
	43	49	宇和島中央	11	男	無	157	7	1・2	-		[IIa	IIa	I]

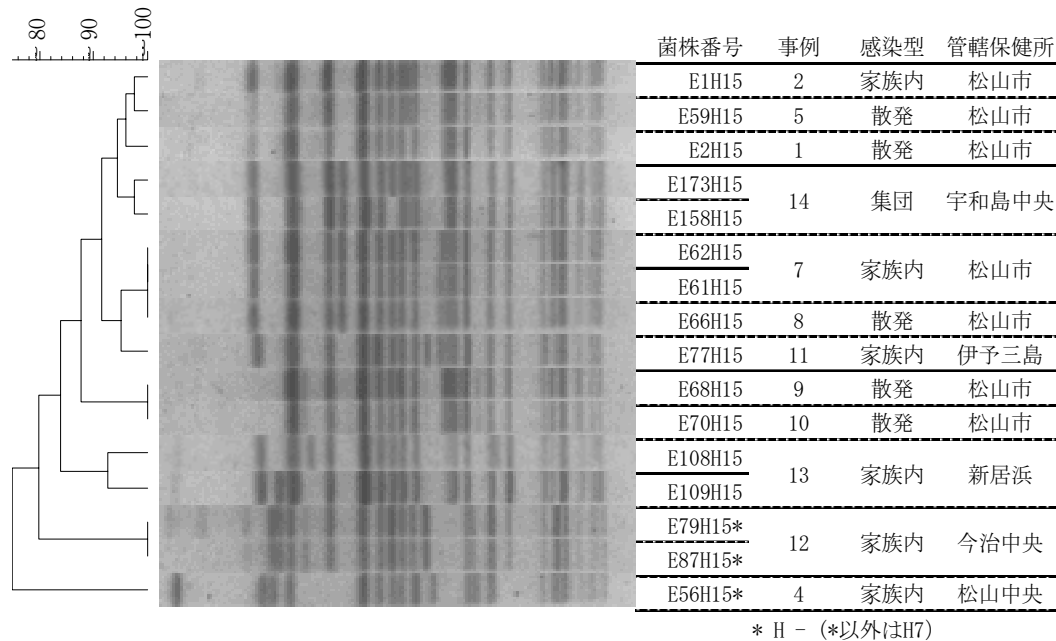


図4 2003年愛媛県で分離された腸管出血性大腸菌(O157:H7/-)の遺伝子解析

院患者26名のO157:H7による集団感染が発生した。これは、感染症法施行以降県内で初めての集団発生事例であった²⁾。

血清型別では1999年から2003年の間にO157:H7/-143株、O26:H11/-が14株、O121:H191株が提供され、県内ではO157:H7/-が優勢であった。

2003年は14事例43名の患者発生があったが、このうち宇和島中央保健所管内の保育園で、O157:H7による集団感染が発生した。この事例は園児15名、園児の家族等5名計20名で、このうち10名が有症者10名が無症状であった。拭き取り検体や検食からは菌が検出されず、感染源を特定することはできなかった。しかし、保健所による早期の全員検便等適切な感染防止策がとられたため、家族への二次感染は5名に抑えることができたものと思われる。

2003年に提供のあった42件の分離株ではO157:H7が大半を占めた。このなかで事例12患者18(9才男児)は、1999年6月EHEC(O157:H7)に感染、発症した既往歴があった。前回1999年の株と今回の株ではPFGEパターンは異なっていたことから(データ未発表)、4年後に再度感染したものと考えられた。

薬剤感受性試験の結果、4事例においてABPC、SM、TCの単剤あるいは多剤耐性菌がみられたが、FOM、CPFX等の第一選択薬剤に対する耐性は認められなかった。今後も耐性株の出現を監視することが重要である。

O157:H7のPFGE遺伝子型別の結果、事例1, 2, 5及

び事例14(集団発生)の分離株の相同性が高いことがわかった。感染研において全国の分離株と比較したところ、パターンは感染研No.577株(IIaIIaI)と非常に相同性の高い株であった。この感染研No.577株は2001年以降数年にわたり全国的に流行している株である。本県においても2001年同じ株が病院内集団感染の原因となり²⁾、このような菌株の存在にも留意する必要があると思われる。

事例4のO157:H-は2003年に茨城県、石川県、福井県、岐阜県、岡山県の各地で散発例から同一パターンの株として分離されており¹⁰⁾、広域におよぶ同一タイプのO157と考えられるが感染源は不明である。

県内では29~31週に発生した事例7と8及び32週に発生した事例9と10の分離株は、それぞれ同じ地域でほぼ同時期に発生した散発例であったが、PFGEによる遺伝子解析パターンも一致したことから分離株の同一性が確認された。保健所による疫学調査の結果、相互に関連性はないと思われたが、遺伝子パターンが完全に一致したことから、分子疫学的には同一感染源の存在あるいは感染経路のつながりが示唆された。

今回、感染研新プロトコールにより2003年分離株のPFGEによる遺伝子解析をおこなったところ、広域流行株の探知及び事例間の共通性を裏付ける結果を得ることができた。新プロトコールは旧法に比べ、検査時間が短縮されたことから、より速く管轄保健所への結果通知が可能となる。そのため、PFGE結果によりさらに詳細な

聞き取り調査や共通食材の探索を促し、感染源の究明および患者拡大防止に資するものと考えられる。

ま と め

1. 1999年以降愛媛県において集団発生2事例を含む173例のEHEC感染症が発生した。O157が84%を占め、その他O26や少数ながらO111, O121, O153もあった。
2. 2003年、全国6県で広域に検出されたO157が分離された。
3. PFGEによる遺伝子解析の結果、2003年同時期に発生した散発事例において、分離株のDNA相同性が認められ共通感染源が示唆された。

愛媛県感染症発生動向調査事業に御協力いただきました各医療機関の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報, 25, 138～140 (2004)
- 2) 田中博ほか：病原微生物検出情報, 1, 15 (2002)
- 3) 近藤玲子ほか：愛媛衛研年報, 59, 1-4 (1997)
- 4) 青木里美ほか：愛媛衛研年報, 59, 5-8 (1997)
- 5) 田中博ほか：病原微生物検出情報, 20, 244 (1999)
- 6) 芝美和ほか：愛媛衛環研年報, 3, 1-4 (2000)
- 7) 田中博ほか：日本食品微生物学会雑誌, 18, 135-140 (2001)
- 8) 渡辺治雄ほか：感染症学雑誌, 76:842～848 (2002)
- 9) 厚生労働科学研究事業 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 平成15年度研究報告書
- 10) 寺嶋淳ほか：病原微生物検出情報, 25, 141 (2004)