

# 山梨県内の腸管出血性大腸菌の検出状況 (2014)

植松香星 柳本恵太

Bacteriological and Epidemiological Studies of Enterohemorrhagic *E. coli*  
in Yamanashi Prefecture, Japan (2014)

Kosei UEMATSU and Keita YANAGIMOTO

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

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*:EHEC) は、5つのカテゴリーに分けられる下痢原性大腸菌のひとつであり、志賀毒素を産生する大腸菌であることから志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*:STEC) 又はベロ毒素産生性大腸菌 (Verotoxin-producing *E. coli*:VTEC) と呼ばれることもあるが、ここでは、EHEC と呼ぶこととする。

近年、EHEC を原因とする食中毒や集団感染症発生事例において、原因を究明する検査手法として IS 法 (IS-printing system<sup>1)</sup>) や PFGE 法 (Pulsed Field gel electrophoresis) が用いられるようになった<sup>2)</sup>。また、国立感染症研究所細菌第一部 (感染研) では、複数の自治体に係る広域事例の早期探知のため、各地方衛生研究所が検出または譲り受けた菌株を収集し 0157、026、0111 については MLVA (Multilocus variable-number tandem repeat analysis)<sup>3)</sup> 及び PFGE 法を行っている。

当所でも当該研究事業に協力し、分離された株を感染研に送付し、広域散发事例や家族内事例で分離した菌株の同一性について確認している。

前回は 2009 年～2013 年県内で分離された EHEC 0157 の IS 法について検討し報告した<sup>4)</sup> が、今回は 2014 年に県内で分離された EHEC の疫学情報、血清型別、IS 法及び PFGE 法を行い、感染研で行った MLVA の結果も加え、疫学的考察を行ったので報告する。

## 方 法

### 1 疫学情報

保健所が行った医師及び患者からの聞き取り調査内容と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

2014 年 1 月から 2014 年 12 月に県内医療機関 (県内外の登録検査所を含む) で分離され菌株譲渡が可能であっ

た 10 株及び保健所及び医療機関からの依頼により当研究所が分離した 19 株の合計 29 株を用いた。

### 3 血清型別試験

血清型別については、常法<sup>5)</sup> により行い、市販の抗血清 (デンカ生研) を用いて O 群型別及び 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。

なお、O 群型別不能株については、国立感染症研究所 (感染研) に O 群型別を依頼した。

### 4 IS 法

保存菌株 (0157 のみ) を普通寒天培地に 35°C 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°C 18～20 時間静置培養し、生理食塩水で 10 倍希釈後、100  $\mu$ l をとり 12,000 r. p. m.、4°C、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鋳型 DNA とした。

PCR 試薬は、東洋紡 (株) 製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、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ (株)) を用い反応条件は、前熱変 96°C 2 分、熱変性 96°C 20 秒、アニーリング 64°C 30 秒、伸長反応 68°C 1 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  $\times$  TBE 緩衝液で 100V、80 分間泳動した。

泳動後、エチジウムブロマイド染色し撮影し、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。

### 5 PFGE 法

対象とした菌株は 0157 が 13 株、026 及び 0111 がそれぞれ 3 株、0146 が 4 株の合計 23 株である。

方法は、国立感染症研究所の New Protocol に準拠した<sup>6)</sup>。制限酵素は *Xba* I (30u/100  $\mu$  L) を用い、37°C で DNA の切断を行った。

泳動装置は CHEF-DR (Bio-Rad) を用い、泳動条件は 6 V/cm、スイッチタイム 2.2～54.2 秒、20 時間、緩衝液の温度を 12°C で行った。泳動後エチジウムブロマイド染色

し、写真撮影を行った。判定は目視で行い、バンドの比較については同一のパターン又は1~3本の違いについては同一クローンと判定した。

## 6 MLVA

MLVAについては0157、026及び0111のみ感染研に依頼した。

## 結果及び考察

### 1 分離状況

県内での EHEC 分離状況を届出順に表 1 に示した。NESID の集計によると感染者 29 名であるが、6 月に発生した EHEC 0157 の 1 事例については、保護者の同意が得られず菌株の譲渡が出来なかったため、この表には記載していない。

また、発生状況については、家族内感染であるか共通食が原因であるか判断が不明確の場合は散発とした。

陽性者 No. 22 については同時に異なる 2 つの血清型の株が分離されたため、分離株の合計は 29 株であった。

2014 年の EHEC の分離数は、これまでで最も多く、3 月～11 月に分離されたが、気温が高い 6 月～9 月に集中しており、この期間の分離株は全体の 79.3% を占めていた。

0 群血清型別の分離率をみると 0157 が 44.8%、026 と 0111 がそれぞれ 10.3%、0146 が 13.8%、その他が 20.7% であった。千須和ら<sup>7)</sup>によると 2003 年～2007 年の 5 年間は 0157 が分離株の 73.8% を占めており、EHEC 分離株中の 0157 の比率が低下している。これは、0157 以外の血清型の EHEC の流行や、ベロ毒素によるスクリーニング検査方法が普及し、0157 以外の血清型が見つけやすくなったこと等の要因が考えられた。

また、05、084、091、0115、0145 及び 0146 の 5 種類の EHEC が県内での初めて分離された。

次に毒素型では、No. 8 は血清型 0157:H7 であったが、ベロ毒素型が VT1 であった。当所での分離同定時には LAMP 法で VT1+VT2 であったが、約 1 年後に行った IS 法の結果では VT1 単独陽性の結果であった。保存中に VT2 遺伝子の欠落又は変異が起こったことが考えられた。ここでは結果の整合性をとるため IS 法に合わせ VT1 とした。

EHEC が分離された疫学的状況は、食中毒や集団感染事例ではなく、患者が 1 名のみの散発事例か家族内感染事例であり、HUS や脳炎症状を呈する重症事例は 1 例もなかった。

### 2 他自治体からの調査依頼状況

他自治体からの調査依頼は 2 事例あった。

事例 1 は、県外 (K 市) から本県を訪れ、A 保健所管内の飲食店で、EHEC 0157 に感染したと疑われた事例である。

当該飲食店の従業員の検便及び食材の検査を実施した結果、配膳担当者 (陽性者 No. 24) 及びその家族から

EHEC 0146 が検出され (No. 26、27)、食材のセンマイ刺しから EHEC 0115 が検出された。

A 保健所は、食品から患者と共通の EHEC が検出できなかったことから有症苦情として処理したが、複数の EHEC が分離されたことから、センマイ刺し等牛の内臓や生肉の取り扱いについて、重点的に指導を行った。

この調査対象者以外に同施設を利用した発症者 (No. 19) を含む複数の発症者の MLVA 検査結果が K 市の発症者と一致したことが判明し、広域で同一の EHEC が流行していることが示唆された。

事例 2 は、ドイツで牛の飼育実習をした学生が EHEC に感染した事例である。

山梨県内の調査対象者 7 名について検査を実施した結果、3 名から 0157:HNM、VT1+VT2 が 2 株及び 084:H11、VT1 が 1 株、OUT:H2 を 1 株を分離した。(No. 20、21、22)。

この事例では、数種類の EHEC が分離されたことから実習中に EHEC を保菌する複数の牛から手指等を介して EHEC に感染したと考えられた。

### 3 IS 法及び PFGE、MLVA の結果

IS 法の結果を表 2 に、PFGE 法の結果を図 1 に示した。IS 法では 0157 の 13 株が 8 パターンに分かれた。同一パターンは 3 パターンあった。

一つ目の同一パターンは No. 4 及び 7 であった。2 株は家族で疫学的に関連性があり、PFGE ではバンドが 1 本異なるだけであった。感染研が行った MLVA 型は 13m0157 で一致した。このことから家族内で母親から子供に感染したことが考えられた。

二つ目の同一パターンは No. 3、8、5 及び 14 であった。PFGE の各バンドが 1~2 本異なっていたが、感染研で行った MLVA では 14m0061 で同一クローンであり、IS 法のパターンと MLVA 型が一致した。また、他の自治体でも同一クローンの株が分離されていたことから 14m0061 は広域での流行していた事が示唆された。

三つ目の同一パターンは No. 21、22 で牛の飼育実習参加者から分離されたものであった。この 2 株の IS パターンは一致し、PFGE のバンドが 2 本のみ異なっていたので同一クローンによる感染かとも考えられたが、MLVA 型が異なっていた。この事例では、複数の血清型の EHEC も分離されており、この農場は多種類の EHEC に汚染されていると考えられた。

他に IS 法及び PFGE でのパターンが一致しないが、No. 18 (13m0694 型) は、他の自治体の分離株と MLVA 型が一致し、広域で流行している事が確認できた。

### 4 026 及び 0111 の PFGE 及び MLVA の結果及び 0146 の PFGE 結果

026、0111 の PFGE 及び MLVA の結果及び 0147 の PFGE の結果を図 2 に示した。

血清型 026 については No. 11、13 が PFGE バンド 2 本が異なっていたが、家族内感染事例で MLVA 型が 14m2036 で一致していた。

血清型 0111 では 3 株とも一致した疫学情報がなく、

PFGE 及び MLVA 型も異なっていた。

しかし、No. 17 は他の自治体の分離株と同一の MLVA 型 (14m3003) であり、広域に流行していることが確認できた株である。

血清型 O146 では疫学情報が一致する 3 株及び疫学情報が一致しない 1 株について PFGE パターンが一致した。感染研が実施した PFGE で、他の自治体で分離された株とのパターンが一致していることが判明し、広域に流行している可能性がある。

### まとめ

EHEC は感染原因が不明な場合が多いが、今回の調査結果の様に感染研や他の自治体の地衛研と菌株の情報を共有することにより、広域で流行している EHEC を把握できた。

また、感染研が司令塔となり、複数の自治体に同時に菌株の情報を提供することで、保健所の疫学調査の精度を格段に上げることも可能である。

今後も感染研に協力すると共に、各地衛研と情報を共有し、EHEC の菌株情報を集約していくことで、これまで明らかに出来なかった多くの感染原因の究明につながっていくと思われる。

### 謝辞

疫学情報を提供していただいた各保健所職員、O 群型別及び MLVA を実施していただいた感染研細菌第一部諸氏、最後に菌株の提供をしていただいた関係医療機関に深謝いたします。

### 参考文献

- 1) Tadaske Ooka, et al. :Development of a Multiplex PCR-Based Rapid Typing Method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2888-2894 (2009)
- 2) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 : 病原微生物検出情報, **36**, 76-82 (2015)
- 3) Hidemasa Izumiya et al. :New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111, *Microbiol. Immunol.*, **54**, 569-577 (2010)
- 4) 植松香星 柳本恵太 : 山梨県内の腸管出血性大腸菌 O157 発生状況及び IS-Printing system について (2009 年~2013 年), 山梨衛環研年報, **57**, 43-47 (2013)
- 5) 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)
- 6) 国立感染症研究所細菌第一部 : 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 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15-17 年度総括・総合研究報告書, 168~185 (2005)
- 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**, 29-32 (2007)

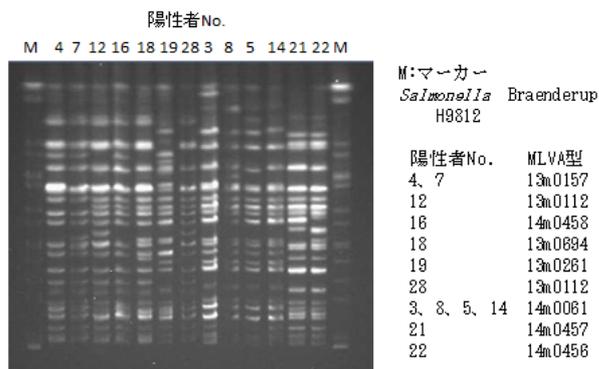


図1 EHEC O157 13株のPFGE結果

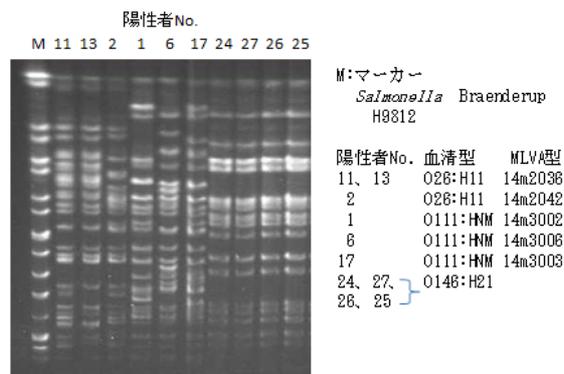


図2 O26, O111及びO146のPFGE結果

表1 県内の腸管出血性大腸菌分離状況

陽性者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	疫学情報
1	2014年3月	患者	女	20	散発	O111:NM	VT1+VT2	
2	2014年6月	患者	女	63	散発	O26:HNM	VT1	
3	2014年6月	患者	女	32	散発	O157:HNM	VT1+VT2	
4	2014年6月	患者	女	0	家族内感染	O157:H7	VT1+VT2	陽性者No.7の子 陽性者No.8と兄弟
5	2014年6月	患者	女	21		散発	O157:HNM	
6	2014年6月	無症状病原体保有者	女	7	散発	O111:HNM	VT1+VT2	
7	2014年6月	無症状病原体保有者	女	27	散発	O157:H7	VT1+VT2	陽性者No.4の親
8	2014年6月	無症状病原体保有者	男	23	散発	O157:H7	VT1	陽性者No.5と兄弟
9	2014年7月	患者	女	8	散発	O5:HNM	VT1	
10	2014年7月	無症状病原体保有者	男	57	散発	O91:H14	VT1+VT2	
11	2014年7月	患者	女	56	散発	O26:H11	VT1	陽性No.13の子
12	2014年7月	患者	男	40	散発	O157:H7	VT1+VT2	
13	2014年7月	無症状病原体保有者	女	79	散発	O26:H11	VT1	陽性No.11の親
14	2014年8月	患者	男	22	散発	O157:HNM	VT1+VT2	
15	2014年8月	無症状病原体保有者	男	35	散発	O145:NM	VT1	
16	2014年8月	無症状病原体保有者	女	28	散発	O157:H7	VT1+VT2	
17	2014年8月	患者	女	12	散発	O111:NM	VT1	
18	2014年8月	患者	女	21	散発	O157:H7	VT1+VT2	
19	2014年9月	患者	女	49	散発	O157:H7	VT2	
20	2014年9月	無症状病原体保有者	女	20	散発	O84:H11	VT1	ドイツで牛との接触歴あり
21	2014年9月	無症状病原体保有者	女	19	散発	O157:HNM	VT1+VT2	ドイツで牛との接触歴あり
22	2014年9月	無症状病原体保有者	女	19	散発	O157:HNM	VT1+VT2	ドイツで牛との接触歴あり
						OUT:H2	VT2	
23	2014年9月	無症状病原体保有者	男	19	散発	O115:H10	VT1	
24	2014年10月	無症状病原体保有者	女	19	散発	O146:H21	VT1	陽性者No.26、27の子
25	2014年10月	無症状病原体保有者	男	43	散発	O146:H21	VT1	
26	2014年10月	無症状病原体保有者	女	52	散発	O146:H21	VT1	陽性者No.27との夫婦でNo.24の親
27	2014年10月	無症状病原体保有者	男	57	散発	O146:H21	VT1	陽性者No.26との夫婦でNo.24の親
28	2014年11月	患者	女	47	散発	O157:H7	VT1+VT2	

表2 IS-printing systemの結果

陽性者No.	1st set primers mix																		2nd set primers mix																		MLVA型	エキストラバンド
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Primer No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	ese	1-16	hly	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	sta2	sta1		
Size(bp)	974	839	742	646	595	561	495	442	405	363	325	300	269	241	211	185	171	157	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151		
4	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	13a0167	
7	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	13a0167	
12	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	13a0112	
16	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	14a0488	
18	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	13a0694	
19	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	13a0261	
28	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	13a0112	
3	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	14a0061	
8	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	14a0061	
5	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	14a0061	
14	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	14a0061	
21	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	14a0457	
22	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	14a0456	