

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)

大沼正行 野田裕之 金子通治

Isolation and Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
in Yamanashi Prefecture (Apr.2000～Mar.2003)

Masayuki OHNUMA, Hiroyuki NODA and Michiharu KANEKO

腸管出血性大腸菌(以下, EHEC)を原因細菌とした感染症は, 1996年全国で集団・散発感染事例が多発して以来, 毎年多くの患者が発生している。特に3類感染症となった1999年4月以降, 毎年全国で3000人以上が感染しており¹⁾, 主要な感染症の1つである。

山梨県は1999年全国で最後のEHEC感染者発生県であり, 11月に2名の患者発生があった。しかし, さかのぼり調査の結果, 1990年にすでに県内で初めてEHEC O157:H7が患者から分離されているのが明らかとなっており²⁾, 1996年以降は全国同様毎年EHECによる散発感染事例が続いている。

そこで今回は2000年度から2002年度までに県内で分離されたEHEC株の分離状況と特徴について報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

表1に示した2000年度から2002年度までに(2000年4月～2003年3月)県内で分離された計38株を供試した。内訳は医療機関等で分離された31株, 患者発生に伴う保健所の接触者検便で分離された7株である。うち32株は志賀毒素産生性試験を依頼された株で, 残りの6株は民間検査機関で志賀毒素産生性を調べたのち, 再度当所で試験した株である。

2. 検査方法

前報²⁾での報告と同様に, CT-SMAC培地およびクロモアガー培地で分離したのち, TSI, LIM培地で純培養し, 生化学的, 血清学的性状から大腸菌と同定した。

志賀毒素産生性試験は, PCR法による志賀毒素遺伝子検出およびRPLA法による志賀毒素蛋白質の検出を行って確認した。

3. 薬剤感受性試験

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, SA, SM, TC, CP, KM, ABPC, CET, CFX, LMOX, ST, NFLX, FOM, GM, TMP, DOXY, CTX, CPF, NAの18薬剤である。

4. プラスミドの検出

プラスミドプロファイルはKadoとLiuの方法³⁾に準拠し, 実施した。プラスミドDNAを抽出後, 0.65%のアガロースを使用し, 約2時間30分電気泳動してエチジウムブロマイドで染色後, 紫外線照射下で撮影し, プラスミドを観察した。

5. 細胞付着性因子の検出

近年下痢原性大腸菌の病原性に関与することが疑われている細胞付着性因子(*caeA*, *bfpA*, *aggR*, *astA*)の検出は既報⁴⁾と同様にPCR法を用いて行った。

6. パルスフィールド電気泳動(PFGE法)

PFGE法は国立感染症研究所(以下, 感染研)の方法⁵⁾に準拠して前報²⁾同様に行った。制限酵素はXba Iを用いた。

結 果

1. 分離株の血清型と毒素型および年度別の分離状況

2000年度から2002年度までに県内で分離されたEHECについて分離株の血清型と毒素型および年度別の株数を表2に示した。供試した38株の血清型はO157:H7が27株(71%), O157:HNMが10株(26%), O26:H11が1株(3%)であった。毒素型と組み合わせると最も多く分離されたパターンはO157:H7, Stx1, 2産生株で18株(47%)を占めた。

2000年度は家族内感染事例と海外感染の疑いのある同一グループの事例⁶⁾が発生し, 同じく2001年度は家族内感染事例が発生したため分離株数が増加した。表3

表1 2000年度～2002年度の腸管出血性大腸菌の分離状況

No	菌株 No	分離月日	年齢	性	血清型	志賀毒素型	備考
1	47. (00- 9)	2000. 4.17	42	F (P) ^{*1}	O 157:H 7	Stx 2	
2	48. (00- 65)	2000. 6.20	4	F (P)	O 157:HNM	Stx 2	SA,SM 耐性
3	49. (00- 66)	2000. 6.20	11ヶ月	M (P)	O 157:HNM	Stx 2	
4	50. (00- 67)	2000. 6.23	4	M (P)	O 157:HNM	Stx 2	
5	51. (00- 68)	2000. 6.23	8	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
6	52. (00-160)	2000. 7.24	52	M (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
7	53. (00-161)	2000. 7.24	5	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
8	54. (00-172)	2000. 7.27	19	M (C) ^{*2}	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	No.7 の家族
9	55. (00-173)	2000. 7.27	14	F (C)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	No.7 の家族
10	56. (00-242)	2000. 8.14	5	M (P)	O 157:H 7	Stx 2	
11	57. (00-266)	2000. 9. 8	6	M (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
12	58. (00-335)	2000. 9.18	27	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	SA,SM 耐性
13	59. (00-336)	2000. 9.27	47	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
14	60. (00-338)	2000. 9.28	17	M (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	SA,SM,ABPC 耐性
15	61. (00-547)	2001. 3.15	4	M (P)	O 157:HNM	Stx 1,Stx 2	海外感染疑い
16	62. (00-548)	2001. 3.15	3	M (P)	O 157:HNM	Stx 1,Stx 2	〃
17	63. (00-549)	2001. 3.18	33	F (C)	O 157:HNM	Stx 1,Stx 2	〃
18	64. (00-550)	2001. 3.18	27	M (C)	O 157:HNM	Stx 1,Stx 2	〃
19	65. (00-551)	2001. 3.18	58	F (C)	O 157:HNM	Stx 1,Stx 2	〃
20	66. (01- 49)	2001. 6.11	77	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
21	67. (01- 50)	2001. 6.16	84	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	SA,SM,ABPC 耐性
22	68. (01- 81)	2001. 7.21	37	M (P)	O 157:H 7	Stx 2	
23	69. (01- 88)	2001. 7.27	49	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
24	70. (01- 89)	2001. 8. 1	17	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
25	71. (01- 90)	2001. 8. 1	25	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
26	72. (01-128)	2001. 8.17	70	F (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
27	73. (01-147)	2001. 9. 3	6	F (P)	O 157:H 7	Stx 2	
28	74. (01-165)	2001. 9. 9	12	M (P)	O 157:H 7	Stx 2	
29	75. (01-166)	2001. 9.11	85	M (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
30	76. (01-188)	2001. 9.14	7	F (C)	O 157:H 7	Stx 2	No.28 の家族
31	77. (01-189)	2001. 9.14	11	M (C)	O 157:H 7	Stx 2	No.28 の家族
32	78. (02- 27)	2002. 6.23	27	M (P)	O 157:HNM	Stx 2	
33	79. (02- 28)	2002. 6.27	48	M (P)	O 26:H 11	Stx 1,Stx 2	TC,KM,DOXY 耐性
34	80. (02- 37)	2002. 7.17	18	M (P)	O 157:H 7	Stx 2	
35	81. (02- 48)	2002. 7.18	3	F (P)	O 157:H 7	Stx 2	
36	82. (02-104)	2002. 9.18	5	M (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
37	83. (02-108)	2002. 9.27	29	M (P)	O 157:H 7	Stx 1,Stx 2	
38	84. (02-151)	2003. 2. 7	3	M (P)	O 157:HNM	Stx 1,Stx 2	

* 1 : (P) ; 患者 * 2 : (C) ; 無症状保菌者

に海外感染の疑いのある同一グループの事例について概要を示した。2002年度は散発事例のみであり、2次感染事例等はなかったが、県内ではじめてO26:H11,Stx1,2陽性株が分離された。O111:HNMやその他血清型株は分離されなかった。

2000年度は神奈川県、埼玉県、静岡県のレストランチェーン店で輸入冷凍牛肉を原因食材とした散発的集団

下痢症（以下、diffuse outbreak）が発生し⁷⁾、県内でも1名の患者の発生がみられた。（表1、No.11株）2001年度は東京都、埼玉県にて和風キムチを原因食品とする集団事例が発生し、感染研や他の地方衛生研究所との情報交換から県内でも関連の疑われた株が分離された。（表1、No.26株）

表2 年度別分離状況

血清型	毒素型	年			計 (%)
		'00	'01	'02	
O 157:H 7	Stx 1, Stx 2	9	7	2	18 (47.4%)
O 157:H 7	Stx 2	2	5	2	9 (23.7%)
O 157:HNM	Stx 1,Stx 2	5	—	1	6 (15.8%)
O 157:HNM	Stx 2	3	—	1	4 (10.5%)
O 26:H 11	Stx 1,Stx 2	—	—	1	1 (2.6%)
計		19	12	7	38 (100%)

表3 海外感染疑い事例の概要

発生年月日	2001年（平成13年）3月
推定感染地	北マリアナ諸島
感染者数	5家族24名中患者2名、 無症状保菌者3名
症状	下痢、腹痛、血便
原因食品	不明
分離株	EHEC O157:HNM,Stx1,2産性

表4 月別分離状況

血清型 / 月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12月	計
O 157:H 7	—	—	5	1	—	3	8	4	11	—	—	—	32
O 157:HNM	1	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	5
O 26:H 11	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
計	1	0	5	1	0	8	8	4	11	0	0	0	38

表5 EHEC 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	> 70	
男	8	5	3	1	1	1	0	1	20
女	6	2	2	1	3	1	0	3	18
計	14	7	5	2	4	2	0	4	38
(%)	(36.8)	(18.4)	(13.2)	(5.3)	(10.5)	(5.3)	(0)	(10.5)	(100)

表6 各血清型における薬剤耐性型とプラスミドプロファイル

血清型	薬剤耐性型	株数	プラスミド (kb)								
			92	92,48	92,50	92,58	92,60	92,63	92,75	92,80	92,140
O 157:H 7	感受性	24	16	2	—	1	1	—	1	2	1
	SA, SM	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	SA, SM, ABPC	2	—	—	—	—	—	2	—	—	
O 157:HNM	感受性	9	5	—	1	—	1	2	—	—	
	SA, SM	1	—	—	1	—	—	—	—	—	
O 26:H 11	TC, KM, DOXY	1	1	—	—	—	—	—	—	—	
計		38	23	2	2	1	2	2	3	2	1

2. 月別の分離状況

EHEC 感染症者の発生を月別に見ると表4に示したように、9月が最も多く、次いで6月、7月、3月の順であった。夏季の6～9月以外に3月の感染者が多いのは、2000年度の同一グループによる海外感染疑い事例が影響したためであった。感染者の発生がない月は、2月、5月、10～12月であった。

3. 年齢・性別の分離状況

表5にEHEC感染者の年齢・性別分布を10歳ごとの年齢群で示した。最も多かったのが乳幼児、小児の0～9歳の年齢群で14名(36.8%)を占めた。ついで10～19歳群が7名(18.4%)であった。70歳代以上も4名(10.5%)の感染者がみられた。乳幼児や小児、高齢者では、臨床症状が重篤となり、しばしば溶血性尿毒症症候群を続発することもあり注意が必要である。感染者の最低年齢は11カ月で最高年齢は85歳であった。男女別の分離頻度は男20名(52.6%)と、やや男が多かった。

4. 薬剤感受性試験およびプラスミドプロファイル

表6に示したように、薬剤感受性試験の結果、耐性を示した株は38株中5株でありSA, SM, TC, KM, ABPC, DOXYのいずれかの薬剤に耐性であった。また、38株全株がプラスミドを保有し、全ての株が92.4kbのプラスミドを共通に保有していた。ほかの大きさのプラ

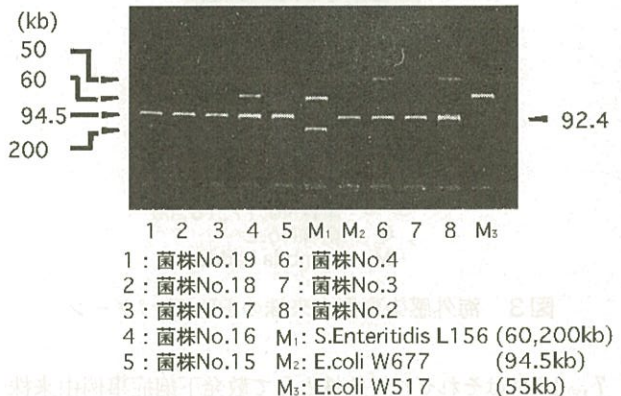


図1 EHECのプラスミドプロファイル

スミドは表6に示したとおりであった。図1に一部の株について示した。

5. 細胞付着性因子保有状況

細胞付着性因子は、38株全ての株が *eaeA* を保有し、1株(表1, No.33株)が同時に *astA* を保有していた。*bfpA*, *aggR* は検出されなかった。

6. PFGE法を用いたDNA切断パターン

図2に各種感染事例由来株のPFGEパターンを示した。すなわち、家族内感染2事例、レストランチェーン店による感染事例および疫学調査から関連がないと考えられたが同一泳動パターンを示した株である。レーン1, 3,

考 察

2000年度から2002年度までの3年間、県内では計38名の感染者からEHECが分離された。O157:H7が27株、O157:HNMが10株、O26:H11が1株であった。全国の分離状況は、年々O26、O111等のO157以外の血清型株が増加し、O157のEHEC感染症者に占める割合は減少していると報告¹⁾されているが、山梨県内は前報²⁾と同様の状況であった。全国的には、O157、O26、O111以外の血清型O86、O91、O121等による感染事例もみられており、今後県内でも同様の状況になることが予想される。

小林ら⁸⁾は、国内の研究機関に保存されていたEHEC O26、O111、O157の3血清型は、ヒトおよび環境の由来によらず全て*eaeA*を保有し、*astA*、*aggR*を保有する株は少数であり、*bfpA*の保有はみられなかったと報告している。今回検査した38株は全て*eaeA*を保有し、1株は*astA*を同時に保有し、*bfpA*、*aggR*は検出されなかったことから小林ら⁸⁾の報告と同様の結果であった。

薬剤感受性試験の結果を前報²⁾の報告と比較すると、分離株数に占める耐性菌の割合には変化がなかったが、耐性パターンがより多剤化の傾向にあり、今後も検査を続ける必要がある。

山梨県ではEHECによる集団発生や、原因食品が特定された事例はない。2000年度はレストランチェーン店における牛サイコロステーキを原因食品とした集団事例が東京近郊であり、県内でも1株分離され、疫学調査から原因食品の喫食も確認された。2001年度は東京都、埼玉県にて和風キムチを原因食品とする集団事例が発生した。県内でもそれら由来株と同一のDNAパターンを示す株が分離されたが、原因食品の喫食の有無は確認されなかった。

現在、感染研を中心にして、全国の地研・研究機関で分離されたEHECのPFGEデータを解析し、ネットワーク上でデータの還元が可能なパルスネット⁹⁾が検討中である。パルスネットの構築により、diffuse outbreakの迅速な発見、感染拡大の防止等が期待される。

2000～2002年度の3年間の分離状況をみると年々分離株数が減少しているが、EHECは極めて少量の菌数でも感染が成立するため、食品の流通が広域化した現在、全国規模のdiffuse outbreakは今後も発生する可能性がある。EHEC感染症の発生動向および菌の疫学的特徴を引き続き注目、監視、調査していく必要があると考える。

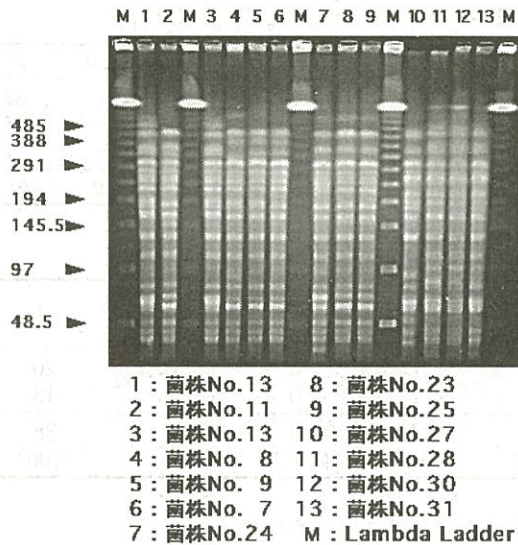


図2 各種感染事例由来株のPFGEパターン

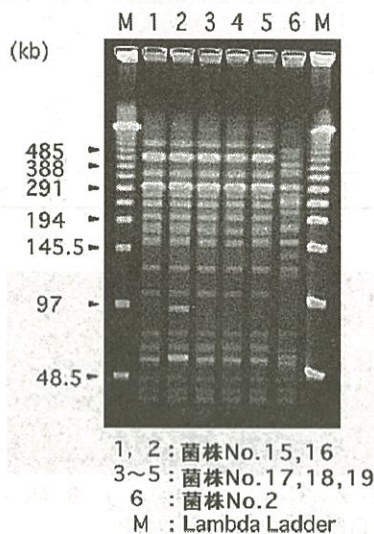


図3 海外感染事例由来株のPFGEパターン

7, 10にはそれぞれ対象株として散発下痢症事例由来株を泳動した。レーン2にはレストランチェーン店による感染事例由来株を、レーン4～6, 11～13には家族内感染事例由来株を、レーン8, 9には散発下痢症事例由来株をそれぞれ泳動した。図3には海外感染の疑いのある同一グループの事例についてPFGE法による切断パターンを示した。レーン1, 2には発症者由来株を、レーン3～5には無症状保菌者を、レーン6には対象株として同一血清型の散発下痢症由来株をそれぞれ泳動した。

図2, 図3の結果から家族内・海外感染の疑いのある同一グループの事例は、それぞれ1, 2本のバンドの違いが見られたが、ほぼ同一の泳動パターンを示し、由来が同じ菌であると考えられた。図2のレーン8, 9の株については、菌株の性状が同一であり、分離時期も近く、同一泳動パターンであったため起源が同じ菌による感染の可能性も考えられたが、食材等の原因は不明であった。

文 献

1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**23**，137～138 (2002)

2) 金子通治ら：山梨衛公研年報，**43**，9～13 (1999)

3) Kado,C.I.&Liu,S.T.：J.Bacteriol.，**145**，1365～1373 (1981)

4) 大沼正行ら：山梨衛公研年報，**45**，30～33 (2001)

5) 和田昭仁：腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修会テキスト，17～31 (1997)

6) 野田裕之ら：病原微生物検出情報，**22**，165～166 (2001)

7) 神奈川県衛生研究所細菌病理部：病原微生物検出情報，**22**，140～141 (2001)

8) 小林一寛ら：感染症誌，**76**，911～920 (2002)

9) 渡辺治雄ら：感染症誌，**76**，842～848 (2002)

水質調査の動向および今後の展望

山梨県の水質調査は、昭和30年代前半頃から開始された。当初は、生活排水の汚染による雑菌の増加を主眼とした。その後、農業排水によるリン、窒素の汚染が問題となり、1980年代後半には、工業排水による重金属の汚染も問題となった。現在では、生活排水の浄化率向上による水質改善が課題となっている。また、河川水質調査についても、生活排水と農業排水の両方を対象とした調査が行われており、その結果に基づいて水質改善対策が実施されている。

調査結果

生活排水の調査

生活排水の調査は、昭和30年代後半から開始された。調査項目は、雑菌数、リン、窒素、COD、BOD等である。調査結果は、雑菌数の増加傾向を示している。これは、生活排水の浄化率向上が不十分であることが原因と考えられる。また、リン、窒素の汚染も問題となっている。これは、農業排水の影響によるものである。今後、生活排水の浄化率向上を図ることが水質改善の鍵となる。

河川水の調査

河川水の調査は、昭和30年代後半から開始された。調査項目は、雑菌数、リン、窒素、COD、BOD等である。調査結果は、雑菌数の増加傾向を示している。これは、生活排水と農業排水の影響によるものである。今後、生活排水と農業排水の両方の浄化率向上を図ることが水質改善の鍵となる。

生活排水の調査は、昭和30年代後半から開始された。調査項目は、雑菌数、リン、窒素、COD、BOD等である。調査結果は、雑菌数の増加傾向を示している。これは、生活排水の浄化率向上が不十分であることが原因と考えられる。また、リン、窒素の汚染も問題となっている。これは、農業排水の影響によるものである。今後、生活排水と農業排水の両方の浄化率向上を図ることが水質改善の鍵となる。

調査結果のまとめ

調査結果をまとめると、生活排水と農業排水の両方の浄化率向上が水質改善の鍵となる。また、水質調査の体制強化も重要である。



山梨県水質調査点の位置