

## 【資 料】

## 岡山県における腸管出血性大腸菌感染症の発生動向調査（令和3年度）

Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Okayama Prefecture (FY2021)

岡田達郎, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明

OKADA Tatsuro, KAWAI Hisahiro, NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki

## 要 旨

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）感染症について、感染源や感染経路の究明により感染予防や感染拡大防止対策の構築の一助とすることを目的として、令和3年度に岡山県内でヒトから分離されたEHEC株を収集し疫学調査を実施した。収集した68株のO血清群は、O157が38株（55.9%）と最も多く、次いでO174が17株（25.0%）、O26及びO103が各4株（5.9%）、O111、O121、O145、O156及びO血清群別不能が各1株（1.5%）であった。反復配列多型解析（以下「MLVA」という。）等によるクラスター解析では、7種のクラスターが形成された。患者の疫学情報を元にグループ事例に分類された株は、MLVA型若しくはMLVAコンプレックス又はPFGE型の一致が確認された。また、患者間に疫学情報の関連性が認められないにもかかわらず、MLVA型等遺伝子型が一致し、同一クラスターに分類される等、分子疫学的関連性が示唆される事例群があった。EHEC感染症の感染予防や感染拡大防止のためには、分子疫学解析結果と疫学情報を併せた解析を継続する等、感染源や感染経路を解明することが重要と考える。

[キーワード：腸管出血性大腸菌, 疫学調査, 反復配列多型解析 (MLVA), 薬剤耐性]

[Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Epidemiological study,

Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA), Drug resistance]

## 1 はじめに

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）感染症は、志賀毒素を産生するEHECを起因菌とする感染性胃腸炎で、激しい腹痛、水様性下痢及び血便を主症状とし、軽い症状や無症状で終わる場合もあるが、溶血性尿毒症症候群（以下「HUS」という。）や脳症等の重篤な疾患を併発し、死に至る場合もある。EHECは牛等の家畜や鹿等の野生動物の腸内に保菌されることがあるため、これらの糞便に汚染された食品や水から感染する可能性がある。EHEC感染症の多くは散発事例で、このため感染源や感染経路の特定が困難であるケースが多い。また、食品の流通が発達した現代では、広域流通食品を感染源とした多くの自治体をまたぐ潜在的集団発生（diffuse outbreak）が問題となっている。当センターでは、これらの問題の解決の一助とするため、県内で分離されたヒト由来株の性状や分子疫学解析結果等と、疫学情報とを合わせたデータベースを構築し解析してきた<sup>1)~5)</sup>。今回、令和3年度の県内におけるEHEC感染症の発生状況、分離株の性状解析、そして反復配列多型解析（以下「MLVA」という。）法<sup>6)</sup>及びパルスフィールドゲル電気泳動（以下「PFGE」という。）法を用いた分子疫学解析

により、県内でのEHEC感染症の発生動向をまとめたので報告する。

## 2 材料及び方法

## 2.1 菌株及び疫学情報

保健所、医療機関及び民間検査機関において、県内のEHEC感染者から分離されたヒト由来EHEC株68株を収集し、解析対象とした。患者の疫学情報については、保健所から提供を受けた。

## 2.2 検査法

## 2.2.1 血清型別試験

病原性大腸菌免疫血清「生研」（デンカ）を用いて血清型別試験を実施し、O血清群及びH血清型を決定した。また、市販血清で同定できなかった菌株の血清型別試験は、国立感染症研究所（以下「感染研」という。）に依頼した。

## 2.2.2 志賀毒素遺伝子及びインチミン遺伝子検出試験

志賀毒素遺伝子（以下「*stx*」という。）及びインチミン遺伝子（以下「*eae*」という。）の検出は、井口らが報告した方法<sup>7)</sup>に準拠し、*stx1*、*stx2*及び*eae*の3種類の遺伝子を対象としたマルチプレックスPCR法により実施

した。

### 2.2.3 stx サブタイプ型別試験

stx サブタイプ型別試験は、Scheutzらが報告した方法<sup>8)</sup>に準拠し、stx1は3種類(stx1a, stx1c, stx1d)、stx2は7種類(stx2a, stx2b, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, stx2g)を型別するPCR法により実施した。

### 2.2.4 薬剤感受性試験

BD センシ・ディスク（日本ベクトン・ディッキンソン）を用い、Kirby-Bauer法により薬剤感受性試験を実施した。薬剤はアンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、セフメタゾール（CMZ）、セフォタキシム（CTX）、セフェピム（CFPM）、イミペネム（IMP）、メロペネム（MEPM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、クロラムフェニコール（CP）、ホスホマイシン（FOM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、レボフロキサシン（LVFX）及びスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（ST）の15種類を用いた。

### 2.2.5 MLVA 法及び PFGE 法による分子疫学解析

O26, O103, O111 及び O157 株については、感染研に MLVA 法による解析を依頼し、反復配列17領域のそれぞれのリピート数、解析結果から付与される菌株の記号（以下「MLVA 型」という。）及びリピート数が17領域中1遺伝子座で異なる Single Locus Variant (SLV) 等の関連性が推測される型をまとめた様式であるコンプレックス（以下「MLVA コンプレックス」という。）の情報提供を受けた。他の株については、PFGE 法による解析を感染研に依頼した。

### 2.2.6 ヒト由来 EHEC 株のクラスター解析

O157 株については、MLVA 法による反復配列のリピート数の相違が2遺伝子座以内となる株を同一クラスターとして分類した。O174については、PFGE 型が一致又は類似した株を同一クラスターとして分類した。また、

患者の疫学情報から、居住地を市町村別、事例を散発事例又はグループ事例に分類し、クラスター分類と併せて解析した。

### 2.2.7 Minimum Spanning Tree 解析

O157については、MLVA 情報集計・可視化システム MLVA-mate<sup>9)</sup>により Minimum Spanning Tree（以下「MST」という。）を作成し、クラスター分類の結果と併せて菌株間の関連性を解析した。

## 3 結果及び考察

ヒト由来 EHEC の月別検出状況を図1に示した。ヒト由来 EHEC の検出数は、9月の18株が最も多く、次いで10月の14株、8月の11株、7月の10株の順であった。夏季に多い傾向は例年どおりであったが、令和2年度と同様、9月～10月の秋季にも検出数が多かった<sup>5)</sup>。

ヒト由来 EHEC の血清型、志賀毒素（以下「Stx」という。）型、stx サブタイプ及び eae の有無並びに感染者の症状を表1に示した。ヒト由来 EHEC は、O157が38株（55.9%）、次いでO174が17株（25.0%）、O26とO103が4株（5.9%）、O111, O121, O145, O156とO血清群別不能が1株（1.5%）であり、例年どおりO157が最も多く検出された。他方O174はこれまで県内では散発事例として少数例検出されたが、令和3年度の検出は、同一グループからのものであった。Stx1型のサブタイプは、11株全てがstx1aであった。Stx2型のサブタイプは、44株のうち10株がstx2a、21株がstx2c、12株がstx2a + stx2c、1株がstx2dであった。Stx1&2型のサブタイプは、13株のうち10株がstx1a + stx2a、3株がstx1a + stx2cであった。eaeは、50株（O157, O26, O103, O111, O121, O145, O156）が保有しており、このうち40株（80.0%）が有症者由来株であったが、eae非保有の18株における有症者由来株は2株（11.1%）のみであった。eaeは腸

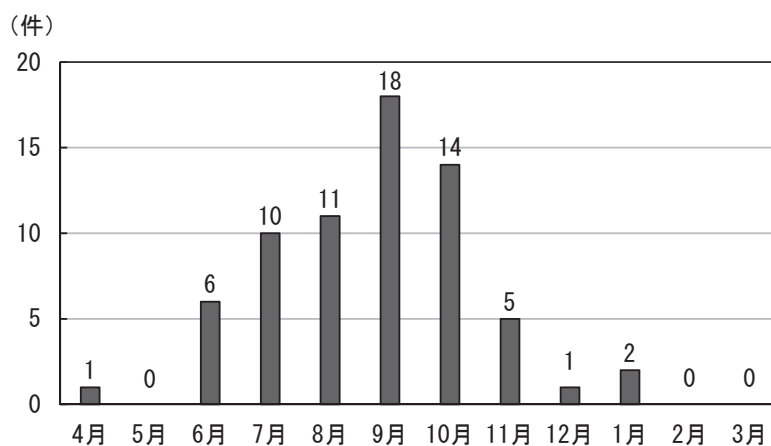


図1 ヒト由来 EHEC 株の月別検出状況

管上皮細胞への接着を媒介するタンパク質であるインチミンをコードする病原遺伝子であり、発症や重症化に関与すると考えられている<sup>10)</sup>。今回の調査でも、これまでの調査<sup>1)-5)</sup>と同様、*eae*保有株における有症率は高く、病原性との関連が示唆された。

令和3年度に収集したEHEC感染者68名の内訳は、有症者が42名(61.8%)、無症状病原体保有者が26名(38.2%)であった。HUSを発症した有症者はいなかったが、血便を呈した者(以下「重症者」という。)は25名で、有症者の59.5%に及んだ。また、血清型及び*stx*サブタイプの組合せで分類した場合の重症者の割合は、O157:H7(*Stx2;stx2c*)、O157:H-(*Stx1;stx1a*)及びO145:H-(*Stx2;stx2a*)でそれぞれ100%、O157:H7(*Stx2;stx2a+stx2c*)で72.7%、O157:H7(*Stx1&2;stx1a+stx2a*)で70.0%と、他と比較して高かった。*stx*サブタイプと重症化の相関に関しては、当センターの過去の調査で、*stx2a*保有株が他のサブタイプと比較して、関連が高い傾向が見られる<sup>1), 3), 4)</sup>。令和3年度の調査でも、*stx2a*保有株の重症者数の割合は高く、これまでの結果とおおむね一致していた。しかし、他の*stx*サブタイプでも重症者が見られたことから、より詳細に調査を行う必要があると考えられた。

ヒト由来EHEC株の薬剤感受性試験結果を表2に示した。15種類の薬剤のうち1剤以上に耐性を示した菌株

は、68株のうち15株(22.1%)で、薬剤耐性率はこれまでの調査と比較して大きな変化はなかった<sup>1)-5)</sup>。O血清群別での内訳は、O157は12株、O26、O103及びO145は1株で、耐性を示した薬剤はTCが15株で最も多く、次いでSTが13株、CPが12株、ABPCが2株であった。また、これらTC、ST、CP、ABPCの4剤に対する耐性菌は、これまでの調査でも常に検出されてきたが、令和3年度も引き続き検出された<sup>1)-5)</sup>。今回は、EHEC感染症治療の第一選択薬であるFOM、NFLX、KM及びニューキノロン系抗菌薬に対する耐性菌は見られなかったが、過去にはFOMやKMの耐性菌が確認されていることから<sup>1), 3)-5)</sup>、その他薬剤への耐性状況も含め、今後とも注視していく必要があると考える。

ヒト由来EHECのO157及びO174のクラスター解析結果を表3に、O157のMSTを図2に示した。O157によるグループ事例3件(グループ事例①、②、④)は各事例内の菌株間でMLVA型が一致した。そのため、グループ事例①、②及び④は、それぞれ同一由来株に起因すると推定された。O157による別のグループ事例1件(グループ事例③)は、同一事例内で1株のMLVA型が一致しなかったが、MLVAコンプレックスが一致したため、菌株間に関連性があると考えられた。また、O174によるグループ事例1件(グループ事例⑤)は16株のPFGE型が一致し、他の1株もPFGE型が類似したため、

表1 ヒト由来EHEC株の血清型等及び感染者の症状

血清型	Stx型	<i>stx</i> サブタイプ	<i>eae</i>	株数	分離率(%)	症状			
						有症者			無症状病原体保有者数
						有症者数	重症者数*	重症者数/有症者数(%)	
O157:H7	Stx2	<i>stx2a</i>	+	8	11.8	7	3	42.9	1
		<i>stx2a+stx2c</i>	+	12	17.6	11	8	72.7	1
		<i>stx2c</i>	+	4	5.9	2	2	100.0	2
	Stx1&2	<i>stx1a+stx2a</i>	+	10	14.7	10	7	70.0	0
O157:H-	Stx1	<i>stx1a</i>	+	1	1.5	1	1	100.0	0
	Stx1&2	<i>stx1a+stx2c</i>	+	3	4.4	3	1	33.3	0
O26:H11	Stx1	<i>stx1a</i>	+	3	4.4	2	1	50.0	1
O26:H-	Stx2	<i>stx2a</i>	+	1	1.5	0	0	—	1
O103:H2	Stx1	<i>stx1a</i>	+	4	5.9	3	1	33.3	1
O111:H-	Stx1	<i>stx1a</i>	+	1	1.5	0	0	—	1
O174:H21	Stx2	<i>stx2c</i>	-	17	25.0	2	0	0.0	15
O121:H19	Stx1	<i>stx1a</i>	+	1	1.5	0	0	—	1
O145:H-	Stx2	<i>stx2a</i>	+	1	1.5	1	1	100.0	0
O156:H25	Stx1	<i>stx1a</i>	+	1	1.5	0	0	—	1
OUT:H49	Stx2	<i>stx2d</i>	-	1	1.5	0	0	—	1
計				68		42	25		26

\* 重症者：血便を呈した有症者とした。

表2 ヒト由来EHEC株の薬剤感受性試験結果（O血清群別）

O血清群	株数	耐性株数	血清型（Stx型）	薬剤耐性パターン（株数）
O157	38	12	O157:H7（Stx2）	TC・CP（12）、ST（11）
O26	4	1	O26:H-（Stx2）	TC（1）
O103	4	1	O103:H2（Stx1）	ABPC・TC・ST（1）
O111	1	0		
O174	17	0		
O121	1	0		
O145	1	1	O145:H-（Stx2）	ABPC・TC・ST（1）
O156	1	0		
OUT	1	0		
計	68	15		

\*「TC・CP」はTC及びCPの2剤に、「ABPC・TC・ST」はABPC、TC及びSTの3剤に耐性を示すことを表す。

同一由来株に起因すると推定された。

O157の38株は21種類のMLVA型に分類され（データ示さず）、28株が6種類（A～F）のクラスターを形成した。クラスターAは県南部で発生した事例で構成され、グループ事例①を含む9株で形成された。9株のうち8株は6月から8月にかけて検出され、MLVAコンプレックス「21c011」に分類された。このうち7株はMLVA型が「20m0185」であり、他1株（菌株No.8）は1遺伝子座のみ異なる「20m0043」であった（図2）。クラスターAの残り1株（菌株No.9「21m0313」）は、他の事例は検出時期が互いに近接し、疫学的な関連が疑われたのに対し、1か月以上離れていたことから、他の事例との疫学的な関連性は低いと考えられた。クラスターBは県南部で発生した事例で構成され、グループ事例②を含む全て同じMLVA型「21m0173」である4株で形成された。クラスターCは県南部で発生した事例で構成され、グループ事例③を含む8株で形成された。8株のうち7株は7月及び9月に検出され、MLVAコンプレックス「21c042」に分類された。このうち5株はMLVA型が「19m0046」であり、他2株は1遺伝子座のみ異なる「21m0289」であった（図2）。菌株No.14「21m0089」及び菌株No.15「19m0046」はそれぞれ、6月、7月に検出され、他6株の検出月（9月）と離れていたことから、事例間の疫学的な関連性は低いと考えられた。クラスターDはグループ事例④を含む3株で形成された。全ての菌株が10月に検出され、居住地区も近隣地域であったことから、疫学的な関連が疑われた。クラスターEは、単一のMLVA型「21m0090」の散発事例2株で形成された。検出時期が

近く、居住地区も一致していたことから、疫学的な関連が疑われた。クラスターFは、MLVA法による反復配列のリピート数が2遺伝子座で異なる散発事例2株で形成された（図2）。菌株No.27「14m0088」は8月中旬、菌株No.28「18m0297」は9月末に検出され、検出時期が離れていたことから、事例間の疫学的な関連性は低いと考えられた。また、クラスターC、Fに含まれるMLVAコンプレックス「21c011」、「21c046」は、それぞれ複数の自治体で検出され、広域流行株として本県、関係自治体及び感染研による調査が行われたが、感染源の究明には至らなかった。

令和3年度の調査では、患者の疫学情報を元にグループ事例に分類された株は、MLVA型若しくはMLVAコンプレックス又はPFGE型の一致が確認された。また、患者間に疫学情報の関連性が認められないにもかかわらず、MLVA型等遺伝子型が一致し、同一クラスターに分類される等、分子疫学的関連性が示唆される事例群があった。集団事例や広域的な食中毒事案の早期探知、適切な原因調査には、自治体、保健所等の関係機関の情報共有が不可欠である。そのため、当センターでは、収集したヒト由来EHEC株について、分子疫学解析等を行い、保健所から得られた疫学情報と併せた菌株データベースの構築を進めてきた。EHEC感染症の感染拡大防止や感染予防のためには、当センターでの分子疫学解析結果と疫学情報を併せた解析を継続し、さらに、分子疫学解析結果から必要に応じて、保健所等行政サイドが追加疫学調査等を実施することで、感染源や感染経路を解明していくことが重要であると考えられる。

表3 ヒト由来EHEC株のクラスター解析結果

クラスター	血清型 (Stx型)	菌株No.	菌検出月	居住地 (市町村別)	事例種	MLVA型	MLVA コンプレックス	PFGE型
A	O157:H7 (Stx2)	1	2021.6	b	散発事例	20m0185	21c011	/
		2	2021.7	b	グループ事例①			
		3	2021.7	b				
		4	2021.7	b				
		5	2021.7	b	散発事例			
		6	2021.8	d				
		7	2021.8	b				
		8	2021.8	c				
		9	2021.9	e	散発事例	20m0043	21m0313	
B	O157:H7 (Stx1,2)	10	2021.7	b	散発事例	21m0173	/	
		11	2021.7	b	グループ事例②			
		12	2021.8	b				
		13	2021.8	b				
C	O157:H7 (Stx2)	14	2021.6	c	散発事例	21m0089	/	
		15	2021.7	a	散発事例	19m0046		
		16	2021.9	b	散発事例			
		17	2021.9	b	散発事例			
		18	2021.9	b	グループ事例③	21m0289		
		19	2021.9	b				
		20	2021.9	b	散発事例			
21	2021.9	b						
D	O157:H7 (Stx2)	22	2021.10	b	散発事例	21m0271	/	
		23	2021.10	f	グループ事例④			
		24	2021.10	f				
E	O157:H7 (Stx2)	25	2021.6	c	散発事例	21m0090	/	
		26	2021.7	c	散発事例			
F	O157:H7 (Stx1,2)	27	2021.8	g	散発事例	14m0088	/	
		28	2021.9	c	散発事例	18m0297		21c046
G	O174:H21 (Stx2)	29	2021.9	c	グループ事例⑤	/	/	類似のバンドパターン
		30	2021.9	c				
		31	2021.9	c				
		32	2021.9	c				
		33	2021.9	c				
		34	2021.9	c				
		35	2021.9	c				
		36	2021.10	c				
		37	2021.10	c				
		38	2021.10	c				
		39	2021.10	c				
		40	2021.10	c				
		41	2021.10	c				
		42	2021.10	c				
43	2021.10	c						
44	2021.10	c						
45	2021.10	c						
								同一のバンドパターン

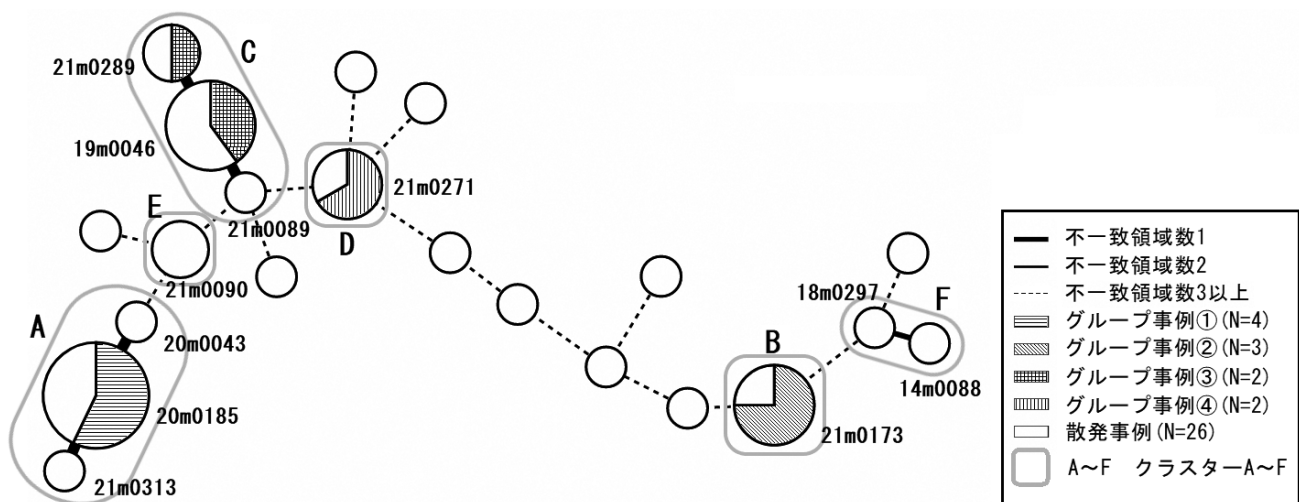


図2 O157 Minimum Spanning Tree (MST)

## 謝 辞

本調査の実施に際して、MLVA法による解析をお願いしました国立感染症研究所の泉谷秀昌先生、伊豫田淳先生、そして菌株の分与にご協力いただきました関係機関の先生方に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 河合央博, 仲 敦史, 畑ますみ, 中嶋 洋: 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成28年度), 岡山県環境保健センター年報, 41, 51-57, 2017
- 2) 仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明: 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成29年度), 岡山県環境保健センター年報, 42, 35-42, 2018
- 3) 森本晃司, 仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明: 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成30年度), 岡山県環境保健センター年報, 43, 73-78, 2019
- 4) 河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋, 狩屋英明: 岡山県における腸管出血性大腸菌感染症の発生動向調査 (2019年度), 岡山県環境保健センター年報, 44, 55-60, 2020
- 5) 岡田達郎, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明: 岡山県における腸管出血性大腸菌感染症の発生動向調査 (令和2年度), 岡山県環境保健センター年報, 45, 29-34, 2021
- 6) Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T 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
- 7) 井口 純, 秋吉充子, 伊豫田淳, 大西 真: 腸管出血性大腸菌の主要なO血清群と病原性遺伝子を判定するOne-shotマルチプレックスPCR法の開発と評価, *日本食品微生物学会雑誌*, 32(4), 215-218, 2015
- 8) Scheutz F, Teel L D, Beutin L, Piérard D, Buvens G et al.: Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature, *J. Clin. Microbiol.*, 50(9), 2951-2963, 2012
- 9) 南須原亮, 灘岡陽子, 草深明子, 石川貴敏, 安中めぐみら: MLVA (VNTR) 情報の集計・可視化システムMLVA-mateの開発, *東京都健康安全研究センター年報*, 69, 279-284, 2018
- 10) 仲西寿男, 丸山務監修: 食品由来感染症と食品微生物, 281-296, 中央法規, 2009