

【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4年度）

Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Okayama Prefecture (2022)

岡田達郎\*, 梶原知博, 河合央博

\*現 備北保健所

OKADA Tatsurou, KAJIHARA Tomohiro, KAWAI Hisahiro

### 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4年4月から12月までの期間に岡山県内で発生したEHEC事例の分離株を収集し、発生動向調査を実施した。収集した50株のO血清群は、O157が39株（78.0%）と最も多く、次いでO26が7株（14.0%）、O103、O128、O145及びO156が各1株（各2.0%）であった。O157及びO26の反復配列多型解析（以下「MLVA」という。）では、患者の疫学情報を基に家族内事例等グループ事例に分類された株は、MLVA型が一致した。また、グループ事例以外の複数の事例でもMLVA型が一致し、分子疫学的関連性が示唆された。薬剤感受性試験では、主要なEHEC感染症治療薬であるホスホマイシンに対する耐性株が2株確認されたことから、今後も継続的に耐性菌の動向を監視する必要があると考える。

[キーワード：腸管出血性大腸菌，発生動向調査，反復配列多型解析（MLVA），ホスホマイシン耐性]

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

Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA), Fosfomycin 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大腸菌による、激しい腹痛、水様性下痢、血便、嘔吐、発熱を主症状とする感染症である。重症化すると血小板減少、溶血性貧血、急性腎不全等の症状を示す溶血性尿毒症症候群（以下「HUS」という。）や脳症を併発し、死亡例も認められることから、特に食品衛生分野では注意が必要とされている。しかしながら、EHEC感染症の多くは散発的に発生するため、感染源や感染経路の特定は困難であり、食品の広域流通が進んだ現代では、自治体をまたぐ潜在的な集団発生（diffuse outbreak）も問題視されている。当センターではこれらの問題解決の一助とするため、県内で分離されたヒト由来EHEC株を収集し、性状試験、薬剤感受性試験及び反復配列多型解析（以下「MLVA」という。）法<sup>1)</sup>を用いた分子疫学解析等により、県内のEHEC感染症の発生動向調査を継続的に行っている。今回、令和4年4月から12月までの期間におけるEHECの発生動向調査を行ったので報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 菌株及び疫学情報

令和4年4月から12月までの期間に県内で発生したEHEC患者61名のうち、保健所、医療機関及び民間検査機関において50名から分離されたEHEC株50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>2)</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>3)</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)、セフトキシム (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。判定は、BD センシ・ディスクの基準に従った。

### 2.2.5 ホスホマイシン不活化酵素の検出

薬剤感受性試験の結果、FOMに耐性を示した菌株については、Nakamuraらが報告した方法<sup>4)</sup>に準拠し、ホスホマイシン不活化酵素 (以下「GST」という。) の阻害剤であるホスホノギ酸含有ディスクを用いたGST産生試験を実施した。

### 2.2.6 MLVA法による分子疫学解析

複数の株を収集したO26及びO157株について、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complex (以下「MLVA complex」という。) の情報提供を受けた。また、食中毒調査支援システム (NESFD) 内の全国のMLVA情報を参考に、他県の検出状況と比較した。

## 3 結果及び考察

EHEC感染症の月別発生件数を図1に示した。発生件数は、7月の13件が最も多く、次いで8月の11件、11月の8件、12月の5件の順で、例年どおり夏季に多く検出されたが、令和4年は11月及び12月の秋季終盤から冬季初旬にかけても発生が続いた。

ヒト由来EHEC株の血清型、志賀毒素 (以下「Stx」という。) 型、*stx* サブタイプ及び*eae*の有無並びに患者の症状を表1に示した。O血清群別ではO157が39株

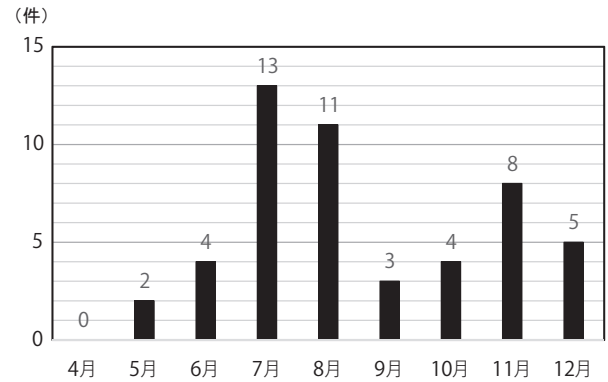


図1 岡山県におけるEHEC感染症の月別発生件数

(78.0%)で例年どおり最も多く<sup>5), 6)</sup>、次いでO26が7株 (14.0%)、O103、O128、O145及びO156が各1株 (各2.0%)であった。Stx1型のサブタイプは、4株全てが*stx1a*であった。Stx2型のサブタイプは、24株のうち17株が*stx2a*+*stx2c*、6株が*stx2a*、1株が*stx2c*であった。Stx1&2型のサブタイプは、22株のうち14株が*stx1a*+*stx2a*、7株が*stx1a*+*stx2c*、1株が*stx1c*+*stx2b*であった。*eae*は、O26、O103、O145、O156及びO157の49株が保有しており、このうち30株 (61.2%)が有症者由来株であったが、*eae*非保有のO128の1株は無症状病原体保有者由来株であった。*eae*は腸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性遺伝子であり、発症や重症化に関与すると考えられている<sup>7)</sup>。今回の調査では、*eae*非保有の株が1株と少ないため、*eae*保有株と非保有株の病原性の差異についての評価は困難であった。過去の我々の調査<sup>5), 6)</sup>と比較すると、今回の調査においても*eae*保有株の有症率は高いものと考えられ、病原性との関連が示唆された。

EHEC患者50名の内訳は、有症者が30名 (60.0%)、無症状病原体保有者が20名 (40.0%)であった。HUS、急性腎不全又は血便を呈した者 (以下「重症者」という。) は17名 (HUS+急性腎不全+血便: 1名、急性腎不全+血便: 1名、血便: 15名) で、有症者の56.7%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は、O157:H7 (Stx2;*stx2a*+*stx2c*)、O157:H7 (Stx1&2;*stx1a*+*stx2a*)、O157:H7 (Stx1&2;*stx1a*+*stx2c*)、O157:H- (Stx1&2;*stx1a*+*stx2c*)、O26:H- (Stx2;*stx2a*) 及びO145:H- (Stx1;*stx1a*) で確認された。*stx*サブタイプと重症化の相関については、当センターのこれまでの調査で、*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ている<sup>6)</sup>。しかし、今回の調査では、*stx2a*の他、*stx1a*や*stx2c*といったサブタイプを保有するEHECでも重症例が確認されているため、引き

続き詳細な調査が必要であると考え。

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、50株のうち19株(38.0%)で、薬剤耐性率は令和2年度14.3%、令和3年度22.1%と比較して高い傾向にあった<sup>5), 6)</sup>。O血清群別での内訳は、O157は16株、O26は3株で、耐性を示し

た薬剤はTCが18株で最も多く、次いでCPが16株、STが15株、FOMが2株であった。FOM耐性の2株はO157で、株間に疫学的関連性が認められたことから、その耐性機構を探るためにGST産生試験を実施した。その結果、これらは共に陽性でGST産生によるFOM耐性であることが判明した。FOMは、NFLX、KM及び

表1 ヒト由来EHEC株の生物学的性状及び患者の症状

血清型	Stx型	stxサブタイプ	eae	株数	分離率(%)	症状			
						有症者数			無症状病原体保有者数
						有症者	重症者*	重症者/有症者(%)	
O157:H7	Stx2	stx2c	+	1	2.0	0	0	—	1
		stx2a+stx2c	+	17	34.0	10	6	60.0	7
	Stx1&2	stx1a+stx2a	+	14	28.0	9	6	66.7	5
		stx1a+stx2c	+	5	10.0	2	1	50.0	3
O157:H-	Stx1&2	stx1a+stx2c	+	2	4.0	2	2	100.0	0
O26:H11	Stx1	stx1a	+	1	2.0	1	0	0.0	0
	Stx2	stx2a	+	3	6.0	3	0	0.0	0
O26:H-	Stx2	stx2a	+	3	6.0	1	1	100.0	2
O103:H2	Stx1	stx1a	+	1	2.0	1	0	0.0	0
O128:H2	Stx1&2	stx1c+stx2b	-	1	2.0	0	0	—	1
O145:H-	Stx1	stx1a	+	1	2.0	1	1	100.0	0
O156:H25	Stx1	stx1a	+	1	2.0	0	0	—	1
計				50		30	17	56.7	20

\* 重症者: HUS、急性腎不全又は血便を呈した有症者とした。

表2 ヒト由来EHEC株の薬剤耐性 (O血清群別)

O血清群	株数	耐性株数	血清型	薬剤耐性パターン(株数)
O157	39	16	O157:H7	TC・CP・FOM・ST(2), TC・CP・ST(13), CP(1)
O26	7	3	O26:H11	TC(3)
O103	1	0		
O128	1	0		
O145	1	0		
O156	1	0		
計	50	19		

\* 「TC・CP・FOM・ST」はTC、CP、FOM及びSTの4剤に、「TC・CP・ST」はTC、CP及びSTの3剤に耐性を示すことを表す。

ニューキノロン系抗菌薬とともにEHEC感染症治療の第一選択薬の一つとされ、临床上極めて重要な抗菌薬である。これらの抗菌薬に対する耐性菌は、EHEC感染症の早期治療に支障をきたすだけでなく、感染拡大防止にも影響を及ぼす可能性がある。当県では、過去にも少数ではあるがFOM耐性EHEC株を検出し<sup>10)</sup>、また、他県での検出事例も報告されていることから<sup>8), 9)</sup>、その広がり懸念される。そのため、今後も継続して調査を行い、動向に注視する必要があると考える。

O157及びO26のEHEC事例のMLVA法による分子疫学解析結果を表3に示した。EHEC事例31件の内訳は、家族内事例等グループ事例が12件（O157：11件、O26：1件）、散発事例19件（O157：15件、O26：4件）であった。収集したO157の39株のMLVA型は24種類に、O26の7株は3種類に分類された。グループ事例では、

各事例内の菌株間でそれぞれMLVA型が一致したことから、各事例とも同一由来株によるものと推定された。一方で、事例番号①の散発事例と事例番号②のグループ事例ではMLVA型22m0119（クラスターⅠ）、事例番号⑮のグループ事例と事例番号⑯及び⑰の散発事例ではMLVAcomplex22m072（MLVA型22m0335及び22m0005）（クラスターⅡ）、そして事例番号⑳、㉑及び㉒の散発事例3件ではMLVA型22m2113（クラスターⅢ）と異なる事例間でMLVA型又はMLVAcomplexが一致し、事例間（患者間）の疫学情報に明確な関連性が認められないにもかかわらず、分子疫学的関連性が示された。また、8種類のMLVA型20m0185（事例番号⑪）、22m0071（事例番号⑬）、22m0337（事例番号⑱）、22m0273（事例番号㉑）、19m0149（事例番号㉒）、22m2099（事例番号㉓）、22m2113（事例番号㉕、㉖、㉗）及び22m0529（事例番号

表3 O157及びO26事例の分子疫学解析結果

事例番号	発生日	事例	管轄保健所	血清型	Stx型	患者数	MLVA型 (MLVAcomplex)	他県での同一MLVA型検出状況
①	5月	散発事例	F	O157:H7	Stx1&2	1	22m0119	
②	5~6月	グループ事例	F	O157:H7	Stx1&2	3	22m0119	
③	6月	散発事例	E	O157:H-	Stx1&2	1	22m0120	
④	6月	散発事例	E	O157:H7	Stx2	1	22m0121	
⑤	7月	散発事例	E	O157:H7	Stx2	1	19m0428	
⑥	7月	グループ事例	B	O157:H7	Stx2	2	22m0177	
⑦	7月	グループ事例	F	O157:H7	Stx1&2	3	22m0178 (22c023)	
⑧	7月	散発事例	D	O157:H7	Stx1&2	1	22m0179	
⑨	7月	散発事例	C	O157:H7	Stx1&2	1	22m0180	
⑩	7月	散発事例	F	O157:H7	Stx2	1	22m0240	
⑪	7月	散発事例	F	O157:H7	Stx2	1	20m0185 (21c011)	有
⑫	7~8月	グループ事例	E	O157:H7	Stx2	2	22m0241	
⑬	8月	散発事例	E	O157:H7	Stx1&2	1	22m0071 (22c011)	有
⑭	8月	グループ事例	E	O157:H7	Stx2	2	22m0334	
⑮	8月	グループ事例	A	O157:H7	Stx2	2	22m0335 (22c072)	
⑯	8月	散発事例	E	O157:H7	Stx2	1	22m0335 (22c072)	
⑰	12月	散発事例	E	O157:H7	Stx2	1	23m0005 (22c072)	
⑱	8月	散発事例	E	O157:H-	Stx1&2	1	22m0336	
⑲	8月	グループ事例	F	O157:H7	Stx2	2	22m0337	有
⑳	8月	グループ事例	F	O157:H7	Stx1&2	2	22m0338	
㉑	9月	グループ事例	F	O157:H7	Stx1&2	2	22m0273	有
㉒	10月	散発事例	E	O157:H7	Stx1&2	1	19m0149 (22c002)	有
㉓	10月	散発事例	C	O26:H11	Stx1	1	22m2099	有
㉔	10~11月	グループ事例	E	O26:H-	Stx2	3	13m2013	
㉕	10月	散発事例	F	O26:H11	Stx2	1	22m2113 (22c209)	有
㉖	11月	散発事例	F	O26:H11	Stx2	1	22m2113 (22c209)	有
㉗	12月	散発事例	F	O26:H11	Stx2	1	22m2113 (22c209)	有
㉘	11月	グループ事例	F	O157:H7	Stx2	2	22m0529 (22c070)	有
㉙	11月	散発事例	E	O157:H7	Stx1&2	1	22m0530	
㉚	11~12月	グループ事例	C	O157:H7	Stx1&2	2	22m0531	
㉛	12月	散発事例	E	O157:H7	Stx1&2	1	22m0578	

号⑳) は他県でも検出されており、広域流行の可能性が考えられた。特に、O26 (Stx2) のMLVA型22m2113 (MLVAcomplex22c209) は、令和5年3月27日時点で、令和4年9月から令和5年3月の長期間にわたり15自治体(都道府県数)で全国広域に検出されたが、当県事例との関連性は不明であった。その他のMLVA型の中には当県を含めた近隣県でのみ検出された型も認められ、地域特異的な共通の感染源が疑われた。

集団事例や広域的な食中毒事案の早期探知と原因調査には、自治体や保健所等の関係機関が情報を迅速に共有することが重要である。当センターでは、収集したヒト由来EHEC株の分子疫学解析結果等を迅速に保健所等関係機関へ還元し、事例間の関連性等の疫学調査サポートしている。今後も感染拡大防止や感染予防のため分子疫学解析を継続し、県内だけでなく広域的な事例も含め、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る。

## 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) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Nakamura, G., Wachino, J., Sato, N., Kimura, K., Yamada, K. et al. : Practical Agar-Based Disk

Potential Test for Detection of Fosfomycin Nonsusceptible *Escherichia coli* Clinical Isolates Producing Glutathione S-Transferases, *J. Clin. Microbiol.*, 52, 3175-3179, 2014

- 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3年度), *岡山県環境保健センター年報*, 46, 43-48, 2022
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 北川恵美子, 小坂 恵, 加藤真美, 木村恵梨子, 崎田敏晴 : 2007~2015年に石川県で分離された腸管出血性大腸菌について - O26, O111の発生状況及び細菌学的性状 -, *石川県保健環境センター研究報告書*, 53, 25-29, 2016
- 9) 津曲洋明, 水流奈己, 阿波野祥司, 吉野修司, 元明秀成 : 宮崎県で分離された腸管出血性大腸菌(EHEC) O26, O157の薬剤感受性と分子生物学的解析, *宮崎県衛生環境研究所年報*, 29, 59-64, 2017
- 10) 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