

感染予防対策に向けたヒト及び環境等における 感染症起因菌の調査（平成27年度）

① 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査

河合央博, 大畠律子, 檀上博子, 中嶋 洋, 井上 勝*, 仲 克巳**（細菌科）

*岡山赤十字病院第一小児科, **くらしき作陽大学食文化学部現代食文化学科

【調査研究】

感染予防対策に向けたヒト及び環境等における 感染症起因菌の調査（平成27年度）

① 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査

Investigation of pathogenic bacteria in the human and the environmental samples for prevention of transmission (FY2015)

① Investigation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

河合央博, 大島律子, 檀上博子, 中嶋 洋, 井上 勝*, 仲 克巳** (細菌科)

*岡山赤十字病院第一小児科, **くらしき作陽大学食文化学部現代食文化学科

Hisahiro Kawai, Ritsuko Ohata, Hiroko Danzyou, Hiroshi Nakajima, Masaru Inoue*,
Katsumi Naka** (Bacteriology Section)

* Department of Pediatrics, Okayama Red Cross General Hospital

** The Department of Contemporary Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

要 旨

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症の感染源・感染経路の究明と発生予防を目的として、平成27年度に県内でヒトから分離されたSTECの疫学調査を行い、併せて、子牛について保菌調査を実施した。

収集したヒト由来株57株のうち、O血清群157が40株 (70.2%) で最も多かった。また、O血清群157の異なる事例間で、反復配列多型解析法 (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) の結果、同一の遺伝子型別に分類される等、関連性が考えられるクラスターが複数見られたが、いずれも疫学的関連性は確認できず、感染源・感染経路の究明には至らなかった。

子牛における調査では、対象22頭中17頭 (77.3%)、ふん便55件中35件 (63.6%) と、STECが高率に分離された。

[キーワード：志賀毒素産生性大腸菌, 疫学, 血清型, 分子疫学]

[Key words : shiga toxin-producing *Escherichia coli*, epidemiology, serotype, molecular epidemiology]

1 はじめに

岡山県下で発生した志賀毒素産生性大腸菌 (以下「STEC」という。) 感染症の感染源・感染経路の究明と発生予防を目的として、疫学調査を継続して実施している。平成27年度は、収集したヒト由来株及び牛から分離した菌株を用いて疫学調査を行ったので報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び検体

平成27年度に県内のヒトから分離されたSTEC (以下「ヒト由来STEC」という。) 57株 (患者 (有症者) 由来株38株, 無症状病原体保有者由来株19株) を収集し、解析を行った。また、県内の農家が飼育している生後1年未満の子牛22頭について、月1回、ふん便 (床に排せつされた便の上部。以下「子牛便」という。) を採取し、STECの分離を行った。さらに、子牛便は、同一個体について、可能な範囲で継続して採取し、STEC保菌状況等について調査を行った。

2.2 検査法

2.2.1 ヒト由来 STEC の解析

2.2.1.1 血清型別試験

ヒト由来STECについて、病原性大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別試験を実施し、O血清群 (以下「O」という。) 及びH血清型 (以下「H」という。) 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。) に依頼して実施した。

2.2.1.2 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、井口らの報告によるPCR法¹⁾を参考にし、*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。

2.2.1.3 反復配列多型解析法 (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis 以下「MLVA法」という。) による遺伝子型別解析²⁾

O26, O111 及び O157 株については、MLVA 法による遺伝子型別（以下「MLVA 型」という。）の解析を感染研に依頼して実施した。

2.2.1.4 IS-printing system（以下「IS 法」という。）による遺伝子型別解析

O157 株については、IS-printing System（TOYOBO）を用いて遺伝子型別（以下「IS 型」という。）の解析を実施した。

2.2.2 子牛便からの STEC 分離及び同定

子牛便に 4 倍容の 1/15M PBS（pH7.6 自家製）を加えた懸濁液 1mL をノボピオシン加 m EC 培地（極東製薬工業）9mL に接種し、42℃ で一晩増菌した。前記 PCR 法により *stx* の検出を行い、*stx* 検出陽性の検体について、DHL 寒天培地（日水製薬）、EHT 寒天培地（極東製薬工業）、CT-SMAC 寒天培地（MERCK）及びクロモアガー STEC 寒天培地（関東化学）を用いて 37℃ 18～20 時間 分離培養を行った。培養後、各培地から疑わしい単独コロニー及びコロニー密集部分 20～40 箇所程度をトリプトソーヤ寒天培地（日水製薬）に釣菌し、37℃ 18～20 時間培養後、前記 PCR 法により *stx* 及び *eae* の確認を行った。*stx* を確認したコロニー密集部分は、分離した単独コロニーで *stx* が確認できなかった場合に、さらに DHL 寒天培地等を用いて分離培養後、単独コロニーを釣菌し *stx* 等の確認を行った。

stx を確認した菌株は、TSI 寒天培地（日水製薬）、

CLIG 寒天培地（極東製薬工業）、LIM 培地（日水製薬）及び ID テスト EB-20（日水製薬）を用いて大腸菌の同定を行うとともに、病原性大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて血清型別試験を行い、O 及び H を決定した。

3 結果及び考察

3.1 岡山県内で分離されたヒト由来 STEC の疫学調査

平成 27 年度のヒト由来 STEC の月別検出状況を、表 1 に示した。

ヒト由来 STEC は、例年と同様に夏季に多く検出される傾向が見られ、特に、8 月は 50.9% と最も多く、平成 27 年度に収集した菌株のうち半数を占めた。

ヒト由来 STEC の血清型、志賀毒素（以下、「Stx」という。）型及び *eae* の有無（以下「血清型等」という。）と症状との関係を、表 2 に示した。

ヒト由来 STEC は、血清型等から 10 種類に分類された。O157 は 40 株（70.2%）、O26 は 9 株（15.8%）であり、例年と同様に、この 2 つの O が全体の 86% を占めた。O157 及び O26 以外では、O8、O103、O111、O121、O130 が検出された。STEC の腸管付着に参与する *eae* は、溶血性尿毒症症候群のリスク因子とされ、STEC の重要な病原因子であり³⁾、O8 及び O130 以外のすべての菌株が保有していた。*eae* を保有する STEC の多くは患者（有症者）からの分離株であり、*eae* を保有していない O8:H49（Stx2）及び O130:H11（Stx2）は無症状病原体保有者からの分離

表1 ヒト由来STEC月別検出状況

月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
患者(有症者)由来株	1	0	5	6	19	6	1	0	0	0	0	0	38
無症状病原体保有者由来株	1	0	2	2	10	3	0	0	0	0	1	0	19
計	2	0	7	8	29	9	1	0	0	0	1	0	57
%	3.5	0.0	12.3	14.0	50.9	15.8	1.8	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	

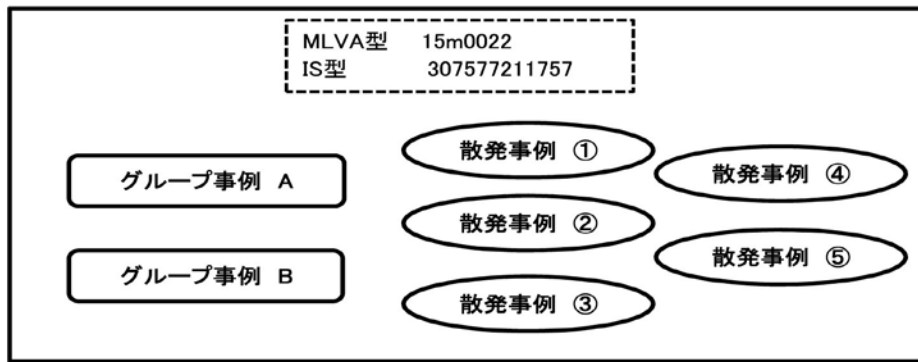
表2 ヒト由来STECの血清型・Stx型・eaeの保有と症状との関係

血清型	Stx型	eae	株数(%)	内訳	
				患者(有症者)	無症状病原体保有者
O8:H49	2	-	1(1.8)	0	1
O26:H11	1	+	9(15.8)	6	3
O103:H2	1	+	1(1.8)	1	0
O103:H11	1,2	+	1(1.8)	0	1
O111:H-	1	+	3(5.3)	2	1
O121:H19	2	+	1(1.8)	0	1
O130:H11	2	-	1(1.8)	0	1
O157:H7	2	+	2(3.5)	2	0
	1,2	+	34(59.6)	25	9
O157:H-	1,2	+	4(7.0)	2	2
計			57	38	19

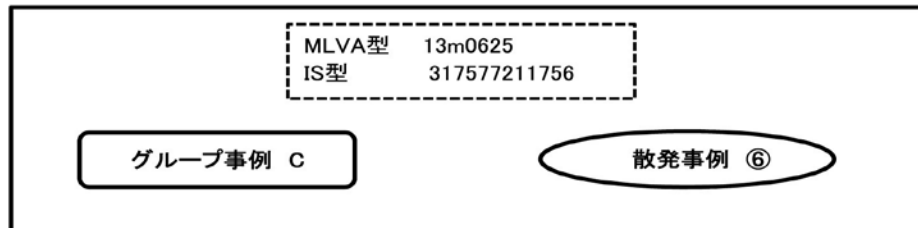
表3 ヒト由来STECのMLVA型及びIS型

血清型	Stx型	株数	MLVA型数	IS型数
O157:H7	2	2	2	2
	1,2	34	10	7
O157:H-	1,2	4	3	3
O26:H11	1	9	6	
O111:H-	1	3	2	

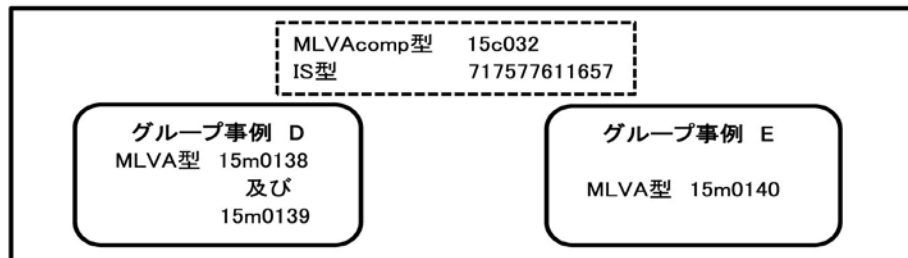
i) 同一のMLVA型及びIS型に分類されたO157:H7(Stx1,2)クラスター(1)



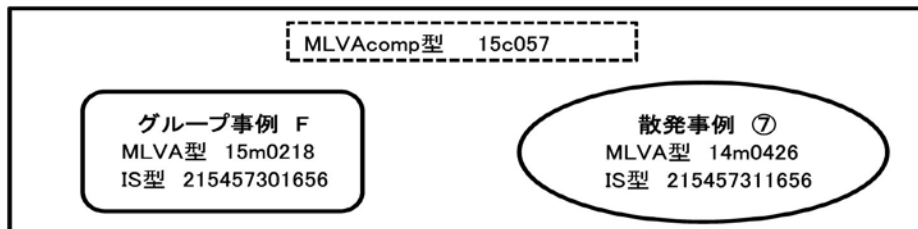
ii) 同一のMLVA型及びIS型に分類されたO157:H7(Stx1,2)クラスター(2)



iii) 同一のMLVAcomp型及びIS型となったO157:H7(Stx1,2)クラスター



iv) 同一のMLVAcomp型に分類されたO157:H-(Stx1,2)クラスター



v) 同一のIS型に分類されたO157:H7(Stx1,2)クラスター

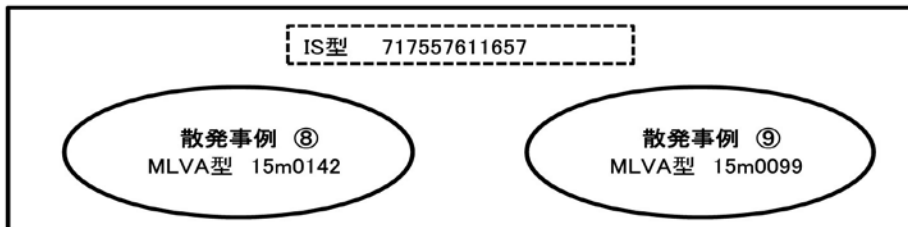


図1 O157株の異なる事例間で同一のMLVA型、MLVAcomp型、IS型に分類されたクラスター

株であった。一方、株数がそれぞれ1株と少ないものの、O103:H11 (Stx1,2) 及び O121:H19 (Stx2) は *eae* を保有しているにも関わらずどちらも無症状病原体保有者からの分離株であったことから、今後さらに多くの菌株について、

病原因子の保有と発症の関係を検討する必要があると思われる。

ヒト由来 STEC の O157 株の MLVA 型及び IS 型、O26 株及び O111 株の MLVA 型について、表3に示した。

MLVA 解析では、O157 株は 15 種類、O26 株は 6 種類、O111 株は 2 種類の MLVA 型に分類された。このうち、家族内等同一グループ由来株等の疫学的関連性が高い株間では、おおむね同一の MLVA 型に分類された。また、O157 株については IS 法を行った結果、12 種類の IS 型に分類され、MLVA 解析と同様に、疫学的関連性と IS 型に高い相関が見られた。

平成 27 年度の特徴として、O157 株の異なる事例間で MLVA 型及び IS 型が同一であるか、あるいはリピート数が 1 遺伝子座で異なる single locus variant の MLVA 型(以下、「MLVAcomp 型」という。)に分類されるクラスターが複数見られた(図 1)。その中でも、図 1 の i) に示す O157:H7 (Stx1,2) 株のグループ事例 A 及び B の 2 例、及び散発事例①～⑤の 5 例の計 7 事例は、同一の MLVA 型「15m0022」及び IS 型「307577211757」のクラスターに分類された。これらの発症あるいは分離時期は、3 ヶ月程度の期間に及んだ。保健所からの疫学情報を解析したところ、患者の居住地はすべて同一地域であったことから何らかの共通した感染源が疑われたが、それ以外に明確な疫学的関連性は確認できず、感染源等の究明には至らなかった。感染研では全国で分離された STEC 株を収集し、O26 株、O111 株、O157 株については MLVA 法による解析を行って、広域発生事例の把握を行っている。その結果、この MLVA 型「15m0022」は、現在のところ、当県外の数地域で分離されているため、今後の発生動向に注意が必要であると考えられた。また、図 1 の ii) ～ v) に示すクラスターについても事例間での関連性を調査したが、明確な疫学的関連性は確認することができなかった。

STEC の主な遺伝子型別解析法には、パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis 以下「PFGE 法」という。)、IS 法及び MLVA 法がある。これらの分離能は、PFGE 法と MLVA 法が同等で、IS 法はこれらに比べやや劣ると言われているが^{4),5)}、手技が非常に簡便で迅速に遺伝子解析が行えるといった利点がある。一方、平成 27 年度の遺伝子解析結果では、IS 型は同一であるが MLVA 型の異なるパターン(図 1 の v)) や、逆に MLVA 法では同じ MLVAcomp 型に分類されたが、IS 型が異なるパターン(図 1 の iv)) も確認された。このため、IS 法は迅速スクリーニング法として使用し、MLVA 法あるいは PFGE 法を組み合わせる方が有効であると思われるが、いずれの方法においても、疫学情報に基づいた解析が必要である。

子牛便からの STEC 分離状況を表 4 に、分離された STEC の血清型等を表 5 に、また、子牛毎の STEC 保菌状況を表 6 に示した。

表 4 子牛便からの STEC 分離状況

	件数	陽性数	検出率(%)
検査頭数	22	17	77.3
ふん便検体数	55	35	63.6

表 5 子牛便由来 STEC の血清型・Stx 型・eae の有無

血清型	Stx 型	eae	分離菌株数(%)
O1:HUT	2	-	1(2.0)
O8:H7	2	-	3(6.1)
O26:H11	1	+	4(8.2)
O26:H-	1	+	1(2.0)
O55:H12	1	-	1(2.0)
O103:H2	1	+	3(6.1)
O103:H11	1	+	2(4.1)
O103:HUT	1	+	1(2.0)
O111:H-	1	+	4(8.2)
O119:H16	2	-	2(4.1)
O145:H-	1	+	1(2.0)
OUT:H16	2	-	1(2.0)
OUT:H19	2	-	1(2.0)
OUT:H21	2	-	9(18.4)
OUT:HUT	1	+	1(2.0)
OUT:HUT	2	-	8(16.3)
OUT:H-	1	+	4(8.2)
OUT:H-	1	-	1(2.0)
OUT:H-	2	-	1(2.0)
計			49

子牛 22 頭について、月 1 回、可能な範囲で継続して子牛便を採取し、STEC の分離を行った。採取期間は、1 回のみが 6 頭、2 ヶ月継続が 9 頭、3 ヶ月継続が 1 頭、4 ヶ月継続が 2 頭、5 ヶ月継続が 4 頭であった。1 回から複数回子牛便を採取し、そのうち一度でも STEC が分離された子牛は 17 頭 (77.3%) であった。また、子牛便の検体数は延べ 55 検体であり、そのうち 35 検体 (63.6%) から STEC が分離された。子牛便から分離された STEC は、同一個体あるいは同一検体から複数の STEC が分離されたものも含めて 49 株であり、血清型等により 19 種類に分類された。そのうち O 血清群型別不能 (OUT) が 26 株 (53.1%) と半数以上を占めたが、ヒトからの分離頻度が高い O26 が 5 株 (10.2%)、O103 が 6 株 (12.2%) そして、O111 が 4 株 (8.2%) 分離された。eae 保有株は 21 株で、O26、O103、O111、O145 及び OUT:HUT (Stx1) のすべての株と OUT:H- (Stx1) 5 株のうち 4 株が含まれた。また、Stx1 が確認された STEC 23 株のうち 21 株 (91.3%) が eae を保有し、Stx2 が確認された STEC はすべて eae を保有していないといった特色のある結果が得られた。

2 ヶ月以上継続して子牛便を採取できた個体は 16 頭で、このうち、2 ヶ月以上継続して STEC が分離されたのは、子牛 No.3、5、10、11、15、17、18、19、21 及び 22 の 10 頭であった。子牛 No.5 は O103:H11 (Stx1) eae+ が、子牛 No.19 では O8:H7 (Stx2) eae- が、2 ヶ月継続して分離される状況が見られ、子牛が何らかの経路により感染後、ある程度の間 STEC を保菌していることが示唆された。また、子牛 No.5 からは OUT:H21 (Stx2) eae- が、子牛 No.15 からは OUT:HUT (Stx2) eae-、そして子牛 No.17

表6 子牛毎の STEC 保菌状況

子牛No.	調査回数	結 果				
		初回	1ヶ月後	2ヶ月後	3ヶ月後	4ヶ月後
1	1回	—				
2	1回	—				
3	4回	O26:H-(Stx1) eae+	O111:H- (Stx1) eae+	—	OUT:HUT(Stx2) eae-	
4	1回	—				
5	4回	OUT:H21(Stx2) eae-	OUT:H21(Stx2) eae-	O103:H11(Stx1) eae+ O119:H16(Stx2) eae-	O103:H11(Stx1) eae+ OUT:H21(Stx2) eae-	
6	1回	O111:H- (Stx1) eae+				
7	1回	—				
8	1回	O111:H- (Stx1) eae+				
9	2回	—	O145:H-(Stx1) eae+			
10	2回	OUT:H21(Stx2) eae-	O26:H11(Stx1) eae+			
11	2回	OUT:H21(Stx2) eae-	OUT:HUT(Stx2) eae-			
12	2回	—	—			
13	2回	—	OUT:HUT(Stx2) eae-			
14	2回	OUT:HUT(Stx2) eae-	—			
15	2回	OUT:HUT(Stx1) eae+ OUT:HUT(Stx2) eae-	O119:H16(Stx2) eae- OUT:HUT(Stx2) eae-			
16	2回	—	OUT:HUT(Stx2) eae-			
17	5回	—	—	O1:HUT(Stx2) eae- O26:H11(Stx1) eae+	O111:H-(Stx1) eae+ OUT:H21(Stx2) eae- OUT:HUT(Stx2) eae-	OUT:H21(Stx2) eae- OUT:H-(Stx1) eae+
18	5回	OUT:H19(Stx2) eae-	OUT:H-(Stx2) eae-	—	—	—
19	3回	O103:HUT(Stx1) eae+	O8:H7(Stx2) eae- OUT:H-(Stx1) eae+	O8:H7(Stx2) eae-		
20	5回	—	—	O103:H2(Stx1) eae+	—	—
21	5回	OUT:H21(Stx2) eae-	O26:H11(Stx1) eae+ OUT:H21(Stx2) eae-	O55:H12(Stx1) eae- OUT:H-(Stx1) eae+	O103:H2(Stx1) eae+	O8:H7(Stx2) eae- OUT:H-(Stx1) eae+ OUT:H-(Stx1) eae-
22	2回	O103:H2(Stx1) eae+	O26:H11(Stx1) eae+ OUT:H16(Stx2) eae-			

からは OUT:H21(Stx2)*eae*- が2ヶ月継続して分離された。これらは、OUTではあるがH, Stx型、及び*eae*の有無が一致するSTEC、あるいは、OUT:HUTであるがStx型及び*eae*の有無が一致するSTECであったが、継続して分離された株が、それぞれ同一菌株である場合は、同様に、一定期間の保菌の可能性が考えられた。さらに、子牛No.5ではOUT:H21(Stx2)*eae*-が、初回、1ヶ月後及び3ヶ月後に、子牛No.21では、OUT:H-(Stx1)*eae*+が2ヶ月及び4ヶ月後と間欠的に分離された。これらもOUTであるが、間欠的に分離された菌株がそれぞれ同一菌株であるとした場合、子牛の保有するSTECの間欠的な排菌によるものか、あるいは再感染によるものかは不明であった。

牛のSTEC感染率は成牛より子牛の方が高いとする報告がある⁶⁾。我々は、数年にわたり牛のふん便からSTECの分離を行い、保菌調査を継続して実施してきた。平成26年度の調査では、成牛を主とした牛直腸便456検体中55検体からSTECが分離され、分離率は12.1%であり⁷⁾、その他の年度の調査でも分離率はおおむね10~20%程度であった。今回、子牛の検査頭数は少なく、かつ排せつ後のふん便という良くない条件にもかかわらず、対象22頭中17頭(77.3%)、ふん便55件中35件(63.6%)とSTECが高率に分離されたことから、他の報告と同様に牛のSTEC保菌率は、成牛より子牛の方が高い可能性が示唆された。また、ヒトからたびたび分離されるO26, O103及びO111が分離されたことや発症に関わると言われる*eae*を保有したSTECが分離されたこと、さらには、子牛との接触が原因と推定される感染事例が数例報告^{8)~10)}されていることから、子牛はヒトのSTEC感染症の重要な感染源の一つとなる可能性が考えられた。

このことから、子牛のSTEC感染予防あるいは従業員等への感染予防に、飼育環境の衛生管理の徹底が重要であると考えられる。

謝 辞

本調査の実施に際して、MLVA型別等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、菌株の分与や検体採取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) 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
- 2) Hidemasa Izumiya, Yingxin Pei, Jun Terajima,

Makoto Ohnishi, Tetsuya Hayashi 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

- 3) 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, 東京, 2009
- 4) 石原朋子, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 大西 真:腸管出血性大腸菌の分子型別, IASR, 35, 129-130, 2014
- 5) 中嶋 洋, 黒崎守人, 大島律子, 石井 学, 竹田義弘ら:食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究, 平成21年度 総括・分担研究報告書(厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業), 87-93, 2010
- 6) 東京都衛生局生活環境部食品保健課編集:ペロ毒素産生性大腸菌(VTEC)食中毒の感染源について, 平成5年東京都の食中毒概要, 170, 1994
- 7) 河合央博, 大島律子, 檀上博子, 中嶋 洋, 井上 勝ら:感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起因菌の調査(平成26年度)①志賀毒素産生性大腸菌の疫学解析, 岡山県環境保健センター年報, 39, 99-101, 2015
- 8) 齋藤紀行, 伊藤友美, 島山 敬, 秋山和夫, 白石廣行:飼育牛からの感染が疑われた腸管出血性大腸菌O26感染散発事例-宮城県, IASR, 21, 35, 2000
- 9) 矢端順子, 亀山光博, 富永 潔:牛との接触により感染したと推察された非定型性状の腸管出血性大腸菌O26:H11感染症例-山口県, IASR, 33, 194-196, 2012
- 10) 秋山由美, 辻 英高, 二井洋子, 萩田堅一, 三村昌司:飼育牛との接触が感染経路と推定された腸管出血性大腸菌O121感染事例-兵庫県, IASR, 35, 294-295, 2014