

平成3年に秋田県で分離された腸管出血性大腸菌について

八 柳 潤 齋 藤 志保子 遠 藤 守 保 佐 藤 宏 康
森 田 盛 大

キーワード：腸管出血性大腸菌, 溶血性尿毒症症候群, Vero 毒素,
生物型, プラスミドプロファイル

I はじめに

大腸菌 0157 : H7 (Escherichia coli Serotype 0157 : H7) は腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic E. coli EHEC) と呼ばれ, 従来から知られていた腸管病原性大腸菌, 腸管組織侵入性大腸菌, 腸管毒素原性大腸菌とは異なり比較的最近確認された新たなカテゴリーの病原大腸菌である。EHEC による集団中毒例として世界で初めて知られたのは, 1982 年に米国オレゴン州で発生した事例であり¹⁾, 同年, ミシガン州, カナダのオンタリオ州でも引き続き集団例が確認された¹⁾²⁾³⁾。この EHEC は, 培養 Vero 細胞に毒性を示す毒素 (Vero 毒素, Vero cytotoxin VT) を産生し⁴⁾, この Vero 毒素が本菌の病原因子であると考えられている。一方, 血清型 0157 : H7 以外の大腸菌にも本毒素を産生するものがあることから, これらは Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) とも呼ばれている⁵⁾。EHEC に感染した場合激しい腹痛を伴う出血性大腸炎が惹起され, とくに小児では溶血性尿毒症症候群 (HUS) が続発する場合があるなど⁶⁾, 感染病像は一般に重篤であることが多い。わが国における EHEC の感染例としては, 1985 年に小林ら⁷⁾, 小川ら⁸⁾が少数例を報告していた程度であり, 集団例は知られていなかった。しかし, 1990 年 10 月に, EHEC を病因菌とする大規模な集団例が埼玉県で発生したこと⁹⁾を契機として, 本菌が国内においてもわかに注目されるようになった。

秋田県内においても埼玉県の事例を契機に, 臨床医の EHEC に対する関心が高まり, 1991 年に入ってから当所に対して EHEC を疑う菌株の同定依頼が相次いで寄せられるようになった。その結果, 秋田県において初めて 4 株の EHEC が分離同定されたので, それらの菌株について得られた知見を報告する。

II 材料と方法

A. 材料

1991 年 4 月から 12 月までの間に, EHEC 疑いまたは

病原大腸菌疑いとして医療機関から提出された大腸菌株 36 件, および EHEC 感染疑いの患者から採取した直腸スワブなどの糞便材料 27 件について EHEC を検索した。

B. 方法

(1) 糞便材料からの EHEC および病原細菌の検出

糞便材料は, Sorbitol MacConkey 寒天平板培地 (Oxoid) に塗抹し, 37°C 1 夜培養した。Sorbitol 非分解性の白色コロニーを選択し, EHEC 疑い株として検査を実施した。さらに, Salmonella, Shigella, Vibrio, Campylobacter についても, 常法¹⁰⁾に従い分離を試みた。

(2) 大腸菌株の性状検査

大腸菌の生化学的性状検査は Edwards and Ewing の記載にもとづいて行った¹¹⁾。

(3) 大腸菌の血清型別

大腸菌の血清型別は市販の診断用免疫血清 (デンカ生研) を使用し, O 型別については生菌および加熱菌についてスライド凝集法により, また H 型別についてはホルマリン処理菌について試験管内凝集法により, それぞれ行った。

(4) Vero 毒素産生性検査

EHEC 疑い株を CAYE 培地 (日水製薬) に接種し, 37°C 1 夜振盪培養した。培養液を遠心し, 得られた上澄みをメンブランフィルター (0.2 μ m) によりろ過し, 試料とした。10 倍段階希釈した試料を加えた Vero 細胞 (African Green Monkey Kidney Cells) 懸濁液をマイクロトレイに接種し, 5% CO₂ 条件下, 37°C で培養した。7 日間細胞変性 (CPE) の発現を観察し, 明瞭な CPE の認められたものを陽性とした。

(5) Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による Vero 毒素産生遺伝子の検出, および Vero 毒素の型別

VT-1, VT-2 検出用のプライマーは小林らの報告したもの¹²⁾を使用した。被検菌のテンプレート DNA とし

ては被検菌を生理食塩に懸濁し、沸騰水中で5分間加熱した後水冷したものを使用した。PCR 反応液の組成は、KCl 50mM, Tris-HCl 10mM (pH9.0), TritonX-100 0.1% dNTP's 200 μ M ea., Primers 0.2 μ M ea., MgCl₂ 2 mM, Taq DNA Polymerase (クラボウ) 2.5U/50 μ l, template DNA solution 5 μ l とし、全量 50 μ l で反応を行った。サーマルサイクラーには JAPH-90 (理工化学) を使用し、Denature 94°C 1.1min $\Rightarrow$ Annealing 55°C 1.6 min $\Rightarrow$ Extension 72°C 1.0min のヒートサイクルを 25 サイクル行い、目的の遺伝子を増幅した。Final Extension は 72°C 2.0min とし、Store Temp. は 4°C とした。反応終了後、反応液を 1.5% アガロース中で電気泳動し、増幅断片を検出した。

陽性対象には、東京都立衛生研究所微生物部、工藤泰雄博士から分与された、E. coli Serotype 0157 : H7 EDL-931 株を使用した。

(6) 薬剤感受性試験

分離 EHEC の薬剤感受性は 1 濃度ディスク (昭和) を使用して試験した。薬剤には、Gentamisin, Streptomycin, Tetracycline, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Cefalocin, Nalidixic acid, Sulfamethoxazole Trimethoprim を使用し、生じた阻止円から推定 MIC を求めた。それぞれの薬剤について、感受性区分のうち、マイナスに対応する推定 MIC が得られた場合に、耐性と判定した。

(7) プラスミドプロファイル

分離 EHEC のプラスミドファイルは Kado らの方法¹³⁾の変法¹⁴⁾により測定した。プラスミド標準株には、E. coli K-12 W-677 NR-1 (95Kb), E. coli V-517 (2.2 Kb, 2.8Kb, 3.1Kb, 4.0Kb, 5.2Kb, 5.7Kb, 7.4Kb, 60 Kb), E. coli K-12 J53 R-478 NCTC 50038 (250Kb) を使用した。なお、E. coli K-12 W-677, および E. coli V-517 株は、東京医科歯科大学微生物学教室、堀内三吉博

士から分与していただいた。

(8) EHEC の生物型別

分離 EHEC の生物型別は、伊藤らが述べている Kakhria らの型別法⁹⁾により行った。培地には、Dulcitol, Sucrose, Rhamnose をそれぞれ 1% 添加した Andrade ペプトン水を使用し、14 日間観察した。

III 結果及び考察

表 1 に EHEC の月別検査数、検査成績を示した。EHEC は 6 月、7 月に県北でそれぞれ 1 株、8 月に本荘由利で 1 株、10 月に仙北で 1 株、計 4 株分離されたが、これらの株は全て菌株として同定依頼されたものであった。糞便材料からは、EHEC は分離されなかったが、C. jejuni および Salmonella 08 が分離された。C. jejuni は、EHEC 感染疑い患者の便から比較的高頻度に分離されたことから、EHEC と C. jejuni の臨床像がお互いに類似していることが推察された。分離された EHEC の血清型は全て 0157 : H7 であった。なお、表 1 には示していないが、5 月に血清型 0157 : NM の株 (EC-13) が分離されたが、当該株は Vero 毒素を産生せず、Vero 毒素産生遺伝子も保有しなかったことから EHEC とは同定しなかった。

表 2 に、EHEC 感染者の臨床症状を示した。感染者は高齢者と幼児であった。症状は、溶血性尿毒症症候群が発症した重篤なものから比較的軽症なものまで様々であったが予後は全員良好であった。

分離された EHEC の Vero 毒素産生性を表 3 に、また生化学的性状を表 4 に示した。4 株の EHEC のうち、1 株が VT-2 のみを産生し、3 株が VT-1 および VT-2 を共に産生する株であった。また、これらの株は全て、通常の大腸菌が 1 日以内に分解する Sorbitol を運れて分解するか、分解しないという性状を示したが、その他は

表 1 腸管出血性大腸菌の月別検査数、及び検査成績

月	糞便材料 (件数)	菌株 (件数)	検出 EHEC 数	血清型	分離地域	その他の病原細菌
4	1	4	0			
5	2	2	0			
6	5	5	1	0157 : H7	県北	
7	5	5	1	0157 : H7	県北	C. jejuni UT
8	4	4	1	0157 : H7	本荘由利	C. Jejuni L-10, Salmonella
9	2	1	0			C. Jejuni L-49
10	2	9	1	0157 : H7	仙北	
11	4	2	0			C. jejuni UT
12	4	4	0			
合計	27	36	4			

表2 腸管出血性大腸菌感染者の臨床症状

感染月	地域	患者年齢	性別	臨床症状
6	県北	80才	女	腹痛、血性下痢、発熱 37~38℃ 予後：回復
7	県北	1才	男	出血性大腸炎、急性腎不全、溶血性貧血、溶血性尿毒症症候群 予後：回復
8	本荘由利	1才	女	出血性腸炎、下痢、発熱 38.1℃ 予後：回復
10	仙北	1才	男	下痢、若干の血便、微熱 予後：回復

表3 腸管出血性大腸菌のVERO毒素産生性

分離月	分離地域	血清型	VERO細胞 CPE	VT 型	菌株番号
6	県北	O157:H7	陽性	VT-1, VT-2	EC-16
7	県北	O157:H7	陽性	VT-2	EC-20
8	本荘由利	O157:H7	陽性	VT-1, VT-2	EC-21
10	仙北	O157:H7	陽性	VT-1, VT-2	EC-35

表4 腸管出血性大腸菌の生化学的性状

Tests	EC-16	EC-20	EC-21	EC-35	Tests	EC-16	EC-20	EC-21	EC-35
TSI	A/A G+	A/A G+	A/A G-	A/A G+	O/F (glucose) F	F	F	F	F
Motility	+	+	+	+	NO ₃ -reduction	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Oxidase	-	-	-	-	Catalase	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
VP	-(2)	-(2)	-(2)	-(2)	Acid from:				
H ₂ S (TSI)	-	-	-	-	Glucose	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Citrate					Mucate	+(2)	+(3)	+(2)	+(3)
Christensen	+(3)	+(3)	+(3)	+(1)	Lactose	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Simmons	-(7)	-(7)	-(7)	-(7)	Mannitol	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Acetate	+(2)	+(2)	+(2)	+(1)	Sucrose	+(2)	+(1)	+(1)	+(1)
Malonate	-(2)	-(2)	-(2)	-(2)	Salicin	-(14)	-(14)	-(14)	-(14)
Indole	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	Dulcitol	+(2)	+(1)	+(2)	+(8)
Urease	-(4)	-(4)	-(4)	-(4)	Inositol	-(14)	-(14)	-(14)	-(14)
IPA	-(1)	-(1)	-(1)	-(1)	Adonitol	-(14)	-(14)	-(14)	-(14)
PPA	-(1)	-(1)	-(1)	-(1)	Raffinose	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Decarboxylase					Sorbitol	+(4)	-(14)	+(6)	+(9)
Lysine	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	Arabinose	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Arginine	-(4)	-(4)	-(4)	-(4)	Rhamnose	+(2)	+(1)	+(2)	-(14)
Ornithine	+(1)	+(4)	+(1)	+(1)	Xylose	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
ONPG	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	Trehalose	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Tartrate	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	Cellobiose	-(14)	-(14)	-(14)	-(14)

() : 観察期間 (日)

定型的な大腸菌の性状を示した。なお、これらの株の中に、表5に示した抗生物質に対して耐性を獲得しているものは認められなかった。

表5 腸管出血性大腸菌の薬剤感受性

薬 剤	EC-16	EC-20	EC-21	EC-35
Gentamisin	S	S	S	S
Streptomycin	S	S	S	S
Tetracycline	S	S	S	S
Ampicillin	S	S	S	S
Chloramphenicol	S	S	S	S
Kanamycin	S	S	S	S
Cephalexin	S	S	S	S
Nalidixic acid	S	S	S	S
Sulfamethoxazole	S	S	S	S
+ Trimethoprim	S	S	S	S

S : 感受性

これらのEHECの感染源を明らかにすることは、今後EHEC感染者の発生を予防する処で極めて重要であると考えられるが、今回の事例は全て散発例であるなどの理由により、感染源に関する具体的な情報は得られなかった。このため、これらのEHECの疫学指標を比較し、株の起源の異同について検討した。EHECの疫学指標としては、生物型⁹⁾、プラスミドプロファイル¹⁰⁾、ファージ型¹⁶⁾が有用であることが示されている。このうち、ファージ型別法は、未だ普及するに至っておらず、今回は分離株の生物型とプラスミドプロファイルについて検討した。表6に示すように、今回分離したEHECの生物型は、3株がI型、1株がIII型であった。一方、分離株のプラスミドプロファイルは4株とも全て異なっていたことから、今回分離されたEHECはそれぞれ異なる起源に由来するものと考えられた。

表6 腸管出血性大腸菌の生物型、プラスミドプロファイル

菌株番号	分離地域	生物型 (Khakhria)	プラスミドプロファイル
EC-16	県北	I	95 Kb, 3.5 Kb
EC-20	県北	I	95 Kb, 70 Kb
EC-21	本荘由利	I	3.5 Kb
EC-35	仙北	III	95 Kb

以上の結果から、秋田県内においてEHEC感染が発生していたことが初めて確認された。これらのEHECは、異なる起源から散発的に発生したものと推定されたが、具体的な感染源は不明であった。北米における出血性大腸炎では、ハンバーガーなどの肉製品が原因食品となっていることが多く¹⁾、さらに、健康牛からもEHECが分離されること^{15,17)}から、EHECの感染源として肉製

品が関与している可能性が考えられている。わが国においても、田中らがオーストラリア産の牛肉およびカナダ産の豚肉からそれぞれVTECを検出しており¹⁸⁾、輸入食肉がEHECのキャリアーとなっている可能性が考えられる。

今回県内で発生したEHEC感染者は、いずれも高齢者、もしくは幼児であったことから、EHECの感染力は比較的弱いものと推察されるが、一旦EHECに感染すると、溶血性尿毒症症候群を続発し、感染者が重篤な症状を呈する場合がある。このため、今後EHECによる出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群の発生を予防する目的で、秋田県内においてもEHECの感染源、分布に関する知見を得る必要があるものと考えた。

IV 謝 辞

E. coli EDL-931株を分与下さいました、東京都立衛生研究所微生物部の工藤泰雄先生、E. coli V-517株、E. coli K-12 W-677 NR-1株を分与下さいました東京医科歯科大学微生物学教室の堀内三吉先生、およびEC-13、EC-16、EC-20株のVero毒素産生性、産生Vero毒素の型について検査していただきました、国立予防衛生研究所細菌部の渡辺治雄先生に深謝します。

文 献

- 1) L. W. Riley et. al. : Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare Escherichia coli Serotype., N. Engl. J. Med., 308, 681-685 (1983)
- 2) W. R. Gransden et. al. : Vero Cytotoxin-producing Escherichia coli 0157 : H7 Diarrhea., Ann. Intern. Med., 103, 160 (1985)
- 3) J. G. Wells et. al. : Laboratory Investigation of Hemorrhagic Colitis Outbreaks Associated with a Rare Escherichia coli Serotype., J. Clin. Microbiol., 18, 512-520 (1983)
- 4) A. D. O'Brien et. al. : Escherichia coli 0157 : H7 Strains Associated with Hemorrhagic Colitis in the United States Produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin., Lancet. i 702 (1983)
- 5) 伊藤武たち : 新しく認識されたVerocytotoxin産生大腸菌による感染と本菌の病原性に関する研究の現況, モダンメディア, 34, 12-23 (1988)
- 6) M. A. Karmali et. al. : Sporadic Cases of Haemolytic-Uremic-Syndrome Associated with Faecal Cytotoxin and Cytotoxin-Producing Escherichia coli in stools., Lancet, i, 619-620 (1983)
- 7) 小林一寛たち : Escherichia coli 0157 : H7 による出

- 血性大腸炎の「さかのぼり」調査, 感染症学雑誌, 59, 1056-1060 (1985)
- 8) 小川正之たち: 川崎市における下痢患者由来大腸菌の Shiga-like Toxin の産生について, 感染症学雑誌, 59 (臨時増刊), 176-177 (1985)
- 9) 病原微生物検出情報, 11, 214 (1990)
- 10) 厚生省 (監修): 微生物検査必携-細菌検査第3版, 日本公衆衛生協会 (1987)
- 11) W. H. Ewing: Identification of Enterobacteriaceae (Fourth Edition), Elsevier Science Publishing (1986)
- 12) 小林一寛: VT 産生性 E. coli 0157: H7 の検査法について, 病原微生物検出情報, 12, 3-4 (1991)
- 13) C. I. Kado et. al.: Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids., J. Bacteriol., 145, 1365-1373 (1981)
- 14) 中谷林太郎たち: R プラスミドの分子遺伝学的実験法, 菜根出版, 60 (1983)
- 15) J. G. Wells et. al.: Isolation of Escherichia coli Serotype 0157: H7 and Other Shiga-Like-Toxin Producing E. coli from Daily Cattle., J. Clin. Microbiol., 29, 985-989 (1991)
- 16) 病原微生物検出情報, 11, 38 (1990)
- 17) C. R. Dorn et. al.: Serotype 0157: H7 Escherichia coli from Bovine and Meat Sources., J. Clin. Microbiol., 29, 1225-1231 (1991)
- 18) 田中博たち: Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の輸入食肉からの分離, 感染症学雑誌, 65, 175-180 (1991)