

資

料

平成8年度に秋田県内で発生した 腸管出血性大腸菌感染事例について

八柳 潤 齊藤志保子 鈴木 陽子 木内 雄 佐藤 宏康

平成8年（1996年）7月1日から平成9年（1997年）3月31日までの間に、225件の大腸菌菌株のベロ毒素（VT）検査、548件の下痢患者便からの腸管出血性大腸菌（EHEC）検索を含む、総数1409件のEHEC検査を実施した。秋田県では平成8年に14事例のEHEC散発感染事例が発生し、そのうち最も多かった事例はEHEC O26：H11による6事例であった。また、EHEC O157：H7による事例は4事例発生した。14事例中9事例に家族内感染が認められ、感染源は1事例を除き不明であった。6事例から分離されたEHEC O26：H11のパルスフィールド電気泳動（PFGE）パターンを比較したところ、家族内感染がみられた事例においては患者と家族が共通起源に由来する株に感染していることが明らかとなり、また、多様な起源に由来するEHEC O26：H11が我々の周辺に侵淫していることが示された。

VT遺伝子を標的としたPCR法により医療機関から提出された下痢患者糞便を対象としてEHECの検索を実施した結果、市販血清キットによるスクリーニングでは検出できないEHEC O103：H2とO150：H8が検出、分離・同定された。国内におけるEHEC感染実態を究明するために、地方衛生研究所は今後もPCR法により患者糞便を対象としたEHECの検索を実施する必要があると考えられた。

キーワード：腸管出血性大腸菌、Polymerase Chain Reaction、O26：H11、パルスフィールド電気泳動、O103：H2、O150：H8

I はじめに

平成2年（1990年）に埼玉県の某幼稚園で腸管出血性大腸菌（EHEC）O157：H7による集団感染事例が発生し、園児2名が死亡した。この事例を契機として、県内においてもEHECに対する関心が高まり、翌平成3年に県内で初めてEHEC O157：H7感染者が確認され^{1) 2)}、その後平成7年までの間に県内で確認されたEHEC感染者の総数は7名であった。平成8年に入ると、突然、国内でEHEC集団食中毒が多発して社会的問題となり、県民、そして医療、行政関係者のEHEC感染症に対する意識がいまだかつてない程に高まり、さらに、EHEC感染症が指定伝染病に指定され、患者発生に際して詳細な調査が実施されるようになった。このような背景から、秋田県内でも平成8年度の1年間に14事例という未曾有の件数のEHEC感染事例が確認されるに至った。

秋田県では平成8年度に血清群O157以外の、いわゆるNon-O157 EHECによる感染事例が多数発生し、O103：H2やO150：H8など、国内での分離報告がほとんどない珍しい血清型のNon-O157 EHECも分離された。これらの事例も含めて、平成8年度、秋田県におけるEHEC感染事例の発生状況について報告する。

- ① 医療機関：患者糞便採取 ⇨ 民間検査機関
菌分離 VT 検査
- ② 医療機関：患者糞便採取 ⇨ 秋田県総合保健事業団
菌分離
(VT 検査 ⇨ 衛研)
- ③ 医療機関：患者糞便採取、検査室で菌分離
(VT 検査 ⇨ 衛研)
- ④ 医療機関：患者糞便採取 ⇨ 衛研、EHEC 検索

図1 秋田県におけるEHEC初発感染者の検査経路

II 材料と方法

1. 検体

秋田県では図1に示す4つのルートにより下痢患者からEHECが検索される。当所においては、それらのうち、医療機関の細菌検査室や財団法人秋田県総合保健事業団で分離された大腸菌菌株のVT検査と、医療機関で採取した下痢患者便からのEHECの検索（3つのルート）を実施している。表1に示すように1996年7月1日から1997年3月31日までの間に、大腸菌菌株のVT検査を225件、下痢患者便からのEHEC検索を548件実施した。平成8年度7月から3月の間に実施したEHEC検索総数は1409件であった。

表1 EHEC 検索を実施した検体内訳

医療機関		行政依頼					一般依頼			合計
糞便	菌株	糞便	菌株	食品	水	他	糞便	食品	水	
548	225	361	3	135	17	28	67	13	12	1409

2. EHEC の検索、同定

既報³⁾に従い検索を実施し、Non-O157 EHEC の検索には EC 培地と DHL、EHEC O157 の検索にはノボピオシン加 mEC 培地と CT-SMAC を使用した。なお、EHEC O157 の検索には一部免疫磁気ビーズ法を併用した。Polymerase chain reaction (PCR) による Vero 毒素 (VT) 遺伝子、eaeA 遺伝子の検出は既報²⁾に従い実施した。

分離された EHEC 菌株のうち、凝集反応が市販の型別用血清キットの判定基準と一致しない株は The International Escherichia and Klebsiella Centre (WHO) (Statens Serum Institut、Copenhagen、Denmark) の Flemming Scheutz 博士に送付し、血清型の決定を依頼した。

3. パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

(1) 菌体包埋アガロースブロックの調製と染色体 DNA の制限酵素消化

菌体包埋アガロースブロックは、ジーンパス[®]試薬キット 2 (バイオラッド) を使用し、ゲルブロックのアガロース濃度を 0.5% とした以外は取り扱い説明書に従い調製した。制限酵素には XbaI を使用して、酵素消化の反応条件は 1 プラグ当たり 30U、37°C 4 時間とした。

(2) 泳動

泳動装置には CHEF-DRII[®] システム (バイオラッド) を使用した。泳動用バッファーには 0.5×TBE を、ゲルには 1% PFC アガロース (バイオラッド) を使用した。泳動のパラメーターは国立感染症研究所が示したとおり、Block 1 : 電圧 6 V/cm、泳動時間 11 時間、パルスタイム 4-8 秒、Block 2 : 電圧 6 V/cm、泳動時間 9 時間、パルスタイム 8-50 秒とした。泳動が終了したゲルは常法によりエチジウムブロマイドで染色した後、泳動像を写真撮影した。

III 結果および考察

表 2 に平成 8 年度に発生した EHEC 感染 14 事例の一覧を示した。14 事例はすべて散発事例であり、集団事例は発生しなかった。家族内感染は 9 事例に認められた。

また、感染源は事例 2⁴⁾ 以外すべて不明であった。血清型別にみると O26 : H11 による事例が最も多く発生し、6 事例から 9 株の EHEC O26 : H11 が分離された。EHEC O26 : H11 による感染 6 事例はいずれも感染源が不明であったが、事例間の関連について検討する目的で分離株の PFGE パターンを比較した。図 2 に示すとおり、家族内感染がみられた事例において家族から分離された EHEC O26 : H11 の PFGE パターンは同一であることが判明した。このことから、家族が共通起源の株に感染したと考えられたが、家族が共通の食品を介して感染したのか、家族間で 2 次感染をしたのかは不明であった。また、異なる事例間では分離株の PFGE パターンは異なっており、このことから、EHEC O157 と同様に EHEC O26 : H11 も多様な起源に由来する株が我々の周辺に侵淫しているものと推察された。

分離された EHEC は O150 : H8 を除きすべて eaeA 遺伝子を保有していた。また、事例 2 では eaeA 遺伝子を保有している EHEC 菌株のみがヒトに感染したことが示唆され⁴⁾、eaeA 遺伝子が EHEC のヒトに対する感染成立機構の中で重要な役割を果たしていると考えられた。一方、EHEC の中で、EHEC O113 : H21⁵⁾ などは eaeA 遺伝子を保有しないがヒトに下痢症や HUS を惹起し、動物実験によって腸管定着能があることが示されている。今回、県内で発生した EHEC 感染者のうち、EHEC O150 : H8 に感染した患者は抗生物質の投与を繰り返して受けても容易に EHEC が陰性化しなかった。このことは、当該株が EHEC O113 : H21 と同様に eaeA 遺伝子を保有していないにもかかわらずヒトの腸管に定着能を有することを示していると考えられる。EHEC のヒトに対する感染成立機構を理解する上で EHEC O150 : H8 や O113 : H21 の腸管定着能を解明することが重要であると考えられる。

事例 2 の分離株は生菌では市販の型別用血清キットのいずれとも反応せず、加熱後洗浄することにより O63 群血清で弱い凝集が認められた。また、事例 5 の分離株は、加熱菌のみ O28ac 群血清で凝集が認められた。これらの成績は、いずれも血清の取り扱い説明書に示され

表2 平成8年度に秋田県内で発生した腸管出血性大腸菌感染事例一覧

事例番号	種別	発生日	患者性別・年齢	血清型	ベロ毒素型	症状
1	散発	4月	男 21才	O26 : H11	VT-1	軽症(詳細不明)
2	散発	7月	男 5才	O103 : H2 ¹⁾	VT-1	粘性下痢
			男 2才	O103 : H2	VT-1	下痢 兄弟
			男 11ヵ月	O103 : H2	VT-1	水様下痢 兄弟
3	散発	8月	女 6才	O26 : H11	VT-1	水様下痢、腹痛、発熱39.2℃
			男 83才	O26 : H11	VT-1	無症状 家族
4	散発	8月	男 42才	O25 : NM	VT-1	下痢、詳細不明、輸入事例?
5	散発	8月	男 46才	O150 : H8 ²⁾	VT-2	水様下痢、腹痛、発熱37.0℃
			女 15才	O150 : H8	VT-2	軟便、腹痛 家族
6	散発	8月	男 1才	O26 : H11	VT-1	下痢、軽症
			女 36才	O26 : H11	VT-1	無症状 家族
7	散発	9月	女 31才	O26 : H11	VT-1	水様下痢、腹痛、発熱37.2℃
8	散発	9月	男 2才	O26 : H11	VT-1	下痢
			男 10才	O26 : H11	VT-1	無症状 家族
9	散発	10月	男 1才	O26 : H11	VT-1	血便
10	散発	10月	女 2才	O157 : H7	VT-1 & 2	水様下痢、血便
			男 67才	O157 : H7	VT-1 & 2	無症状 家族
11	散発	10月	女 80代	O157 : H7	VT-1 & 2	軟便、腹痛(詳細不明)
			男 66才	O157 : H7	VT-1 & 2	無症状 家族
12	散発	10月	男 12才	O157 : H7	VT-2	血便(詳細不明)
			男 7才	O157 : H7	VT-2	無症状 兄弟
			男 3才	O157 : H7	VT-2	無症状 兄弟
13	散発	11月	女 不明	O157 : H7	VT-2	詳細不明
			女 5才	O157 : H7	VT-2	無症状 姉妹
14	散発	12月	男 38才	O111群	不明	下痢、腹痛、輸入事例?

1) : 市販型別用血清キットでは O63 : H2

1) : 市販型別用血清キットでは O28ac : Hut

1)、2) 共に The International Escherichia and Klebsiella Centre (WHO) で血清型を決定

た判定基準に明らかに適合しなかった。さらに、説明書には、当該キットを使用して得られる成績は被検株の O 群の推定の域を出ないことが明記されている。このような理由から、我々は事例2、および事例5の分離株を大腸菌の国際レファレンスセンターである The International Escherichia and Klebsiella Centre (WHO) に送付して血清型の決定を依頼した。その結果、事例2の分離株の血清型は O103 : H2、事例5の分離株の血清型は O150 : H8であることが明らかとなった。なお、O103、O150共に市販血清キットには含まれていない血清群である。このように、我々は VT 遺伝子を指標にして分離した EHEC の血清型を決定する場合、市販血清キットの性能に限界があることを経験した。しかし、国際レファレンスセンターから成績が送付されるまでには、菌株送付後1カ月から2カ月を要するため

に、行政対応は市販の血清キットにより得られた成績に基づかざるを得ない。

O103 : H2 や O150 : H8 のような EHEC は市販の病原大腸菌スクリーニング用血清キットでは検出することが不可能であることから、このような EHEC による感染者の発生状況は、従来、全く不明であったと推察される。しかし、EHEC の感染実態を究明するためには、血清キットを使用した従来法では検出できない EHEC も確実に検出、分離・同定することが必要である。地方衛生研究所は1991年以降、VT 遺伝子を標的とした PCR 法を導入しており、PCR 法によれば従来法では検出できない EHEC も VT 遺伝子を標的として迅速に分離・同定することが可能である。実際、EHEC O103 : H2 と O150 : H8 はいずれも EHEC 感染疑いで医療機関より提出された患者便から当所において PCR 法により検

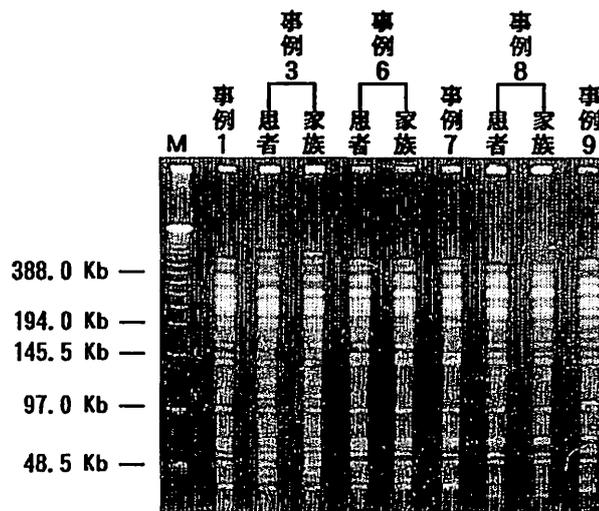


図2 平成8年に分離された EHEC O26 : H11 の XbaI PFGE パターン

出、分離・同定された。厚生省は、平成8年7月17日に各自治体等に宛てた「病原性大腸菌 O157 による食中毒について、保健所・地方衛生研究所の対応強化に関する通知」の中で医療機関に対して日本医師会等を通じ、O157感染が疑われる臨床例については地方衛生研究所に検体検査を迅速に依頼するよう指導している。地方衛生研究所は、今後も国内における EHEC 感染実態究明のために、医療機関の依頼を受け、その専門的技術を活用しながら患者糞便を対象としたEHECの検索を実施する必要があると考えられる。

IV 文 献

- 1) 八柳 潤, 他. 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. 秋田県衛生科学研究所報, 1992 ; 36 : 43-47.
- 2) 八柳 潤, 他. 秋田県で散発下痢症から分離された Vero 毒素産生性大腸菌の性状. 感染症学雑誌, 1997 ; 71 : 598.
- 3) 八柳 潤, 他. 水系感染集団事例から分離された毒素原性大腸菌および腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン-1 (EAST-1) 遺伝子保有大腸菌の性状. 感染症学雑誌, 1996 ; 70 : 215-223.
- 4) 八柳 潤, 他. 子牛が原因と考えられた腸管出血性大腸菌 O103 : H2 による家族内感染事例について—秋田県. 病原微生物検出情報, 1997 ; 18 : 132-133.
- 5) Dytoc, M. T. et. al, Distinct Binding Properties of eaeA-Negative Verocytotoxin-Producing Escherichia coli of Serotype O113 : H21., Infect. Immun., 1992 ; 60 : 3953-3961.