

腸管出血性大腸菌（EHEC）の感染疫学解明に関する調査研究

八柳 潤 齊藤志保子 今野 貴之

2001年から2003年にかけて市販輸入牛肉、県内でと殺されている牛のヒト型 EHEC 汚染・保菌実態を調査し、ヒト由来株と牛由来株の分子疫学的性状を比較した。県内でと殺されている牛や畜産農家における飼育牛がヒト型 EHEC を保菌していること、及び市販食肉がヒト型 EHEC により汚染されている事実が明らかとなった。また、感染源全体に占める割合は小さいと考えられるものの、飼育牛自体も県内における EHEC 感染事例における感染源としての意義を持つものと考えられた。O121、O91、O157、O111抗原特異検出用 PCR を導入し、O26、O103抗原特異検出用 PCR の開発に着手した。これらの PCR は、今後、県内における EHEC 感染者の診断精度の向上と感染源調査の迅速化・精度向上に大きく寄与すると考えられた。本研究により県内における EHEC 感染源の多様性が示され、県内における EHEC の感染源対策を構築する際には、この感染源の多様性を考慮する必要があるものと考えられた。

キーワード：腸管出血性大腸菌、飼育牛、市販輸入牛肉、*eaeA*、*saa*、PFGE

I はじめに

腸管出血性大腸菌（EHEC）はベロ毒素（VT）を産生する大腸菌であり、ヒトに下痢、激しい腹痛、出血性大腸炎を、また、時に致命的となる溶血性尿毒症症候群（HUS）をも惹起する。EHEC には多彩な血清型が報告されているが、患者からの分離例が特に多い血清型は O157:H7 である。EHEC O157:H7 は 1996 年に全国的に食中毒を惹起して大きな社会問題となった。秋田県においては、1991 年に初めて EHEC O157:H7 による感染者が確認された¹⁾。その後、今日まで 15 年が経過したが、この間、1996 年に EHEC 感染症が指定伝染病となり、EHEC 感染症の感染源、家族内感染の有無などが詳細に調査される体制が整った。また、給食従事者の定期検便が法制化され、その検査対象が VT 産生菌すべてとされたことにより、秋田県総合保健事業団に VT を対象としたスクリーニング検査体制が構築された。さらに、秋田県においては 1996 年にパルスフィールド電気泳動（PFGE）による EHEC 分離株の分子疫学的性状の比較を実施可能な体制が確立され、また、市販の型別用血清では型別できない EHEC の血清型を決定するために、国際大腸菌型別センターとのコンタクトも確保した。EHEC の分離同定技術もこの間、大幅に改良されており、EHEC の検査技術は 1991 年当時と比較して長足の進歩を遂げたといえる。

EHEC 感染症対策がこのように充実してきたことにより、この 15 年間で秋田県における EHEC 感染症の発生状況、HUS 患者の発生状況、O157 以外の EHEC 感染症発生状況、給食従事者の EHEC 感染状況などは次第に明らかになってきた。しかしながら、EHEC の感

染源に関する知見は EHEC 感染症対策においてとりわけ重要であるにもかかわらず、ほとんど集積されていないのが現状である。実際、秋田県で 15 年間に発生した EHEC 感染事例のなかで、感染源が判明した事例は極めて少ない。牛は EHEC を腸管内に保菌していることから、EHEC 感染症の感染源として重要であると考えられている²⁾。しかし、県内の肉牛の EHEC 保菌率や県内で発生する EHEC 感染事例に牛が実際にどの程度関与しているかについては、これまで全く明らかにされていない。さらに、県内で市販されている輸入牛肉の EHEC 汚染実態、及び感染源としての意義を示す具体的データも得られていない。従って、EHEC 感染源対策に関する科学的根拠は乏しい。

ヒトから分離される EHEC は腸管定着因子と考えられる *eaeA* 遺伝子³⁾、あるいは *saa* 遺伝子⁴⁾ を保有しているのに対して、牛から分離される株の大半はこれらの遺伝子を保有せずこれらの株のヒトに対する病原性には議論がある。このため、EHEC 感染源の解明を試みる場合、*eaeA* あるいは *saa* 遺伝子を保有する、「ヒト型 EHEC」の存在を指標とする必要がある。

本研究は、2001 年から 2003 年に市販輸入牛肉、県内でと殺されている牛のヒト型 EHEC 汚染・保菌実態を解明するとともに、ヒト由来株と牛由来株の分子疫学的性状を比較検討することにより、県内における EHEC 感染症の感染源としての意義を明らかにすることを目的として実施した。

Ⅱ 方 法

1. 牛便からのヒト型 EHEC の分離

1) 供試検体

秋田県中央食肉衛生検査所の多大な協力により、と殺された牛の直腸便の提供を受けた。検体数は2001年：126検体、2002年：150検体、2003年：176検体、合計452検体であった。

2) ヒト型 EHEC 分離方法

ヒト型 EHEC 分離・同定方法の概要は図1のとおりである。

2. 市販食肉からのヒト型 EHEC の分離

1) 供試検体

小売店で購入した牛肉、計341検体を供試した。その内訳は表1のとおりである。

2) ヒト型 EHEC 分離方法

牛便からのヒト型 EHEC 分離方法に準じた。検体量は25 g、Buffered Peptone Water (BPW) 量は225 mlとした。

3. 分離株の分子疫学的性状比較

1) 供試菌株

2002年に分離された EHEC O157牛由来株5株とヒト由来株9株（図2）、2003年に分離された EHEC O157牛由来株2株とヒト由来株5株（図3）、及び EHEC O103牛由来株2株とヒト由来株3株（図4）を供試した。

2) 分子疫学的性状比較

分離株の分子疫学的性状比較は、国立感染症研究所が示した環太平洋パルスネット用のプロトコールに従い、パルスフィールド電気泳動により行った。得られたパターンのクラスター解析と系統樹作成には Fingerprinting II ソフトウェアを使用した。

4. 牛が感染源と考えられた EHEC感染事例、その他特記すべき事例の解析

2003年5月29日に本荘保健所管内で発生した畜産農家の EHEC O26散発感染事例において、飼育牛7頭の糞便、飲用水2検体を対象として感染源調査を実施した。また、6月24日に秋田市保健所管内で発生した焼肉店を原因施設とする EHEC O157食中毒事例について、患者・保菌者由来株の PFGE パターンを比較した。

図1 牛便からのヒト型 EHEC 分離方法

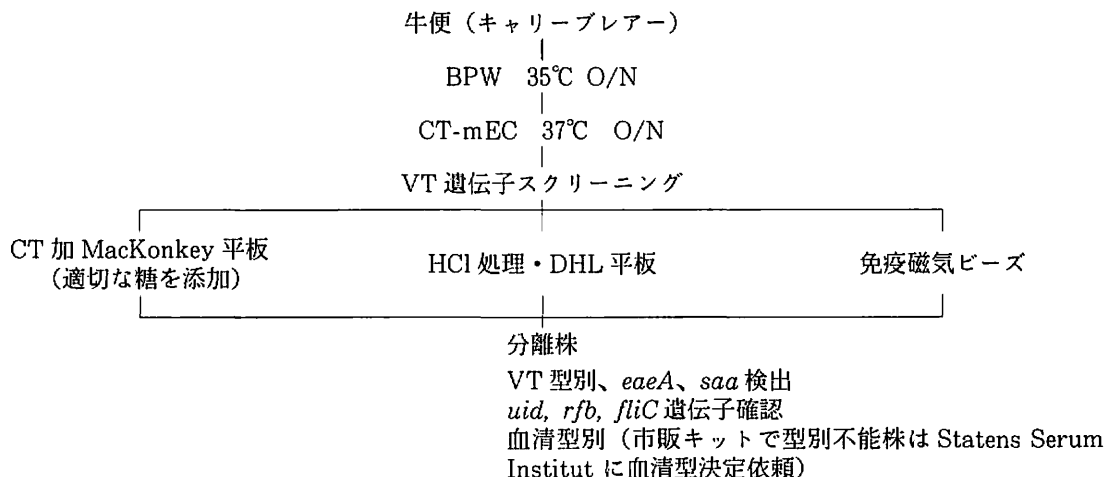
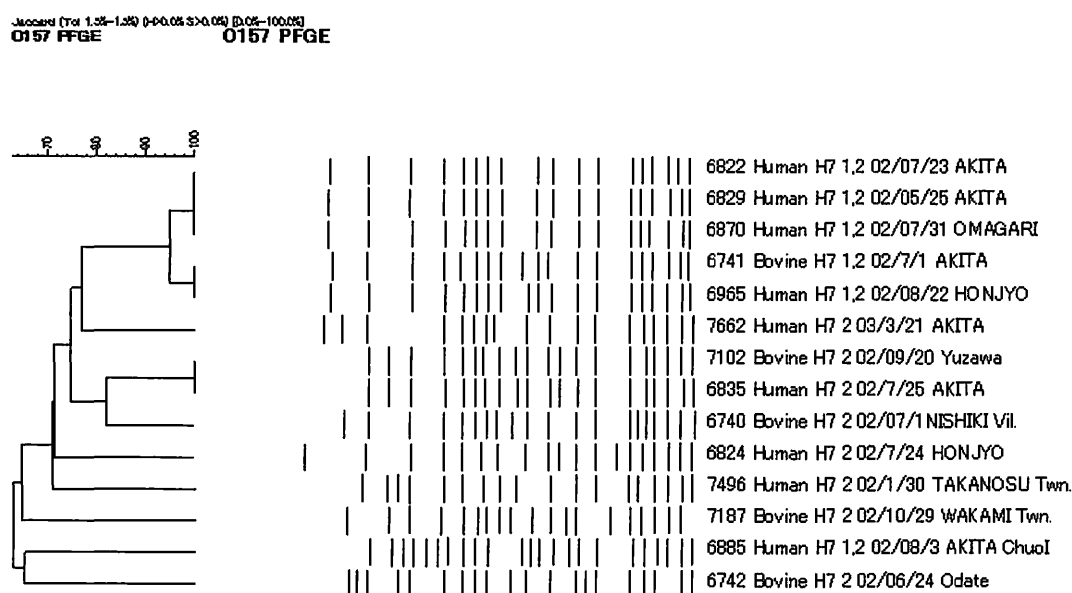


表1 EHEC 検索に供した市販牛肉一覧

年	検 体 数				計
	USA	オーストラリア	外国(不明)	国産	
2001	46	6	3	—	55
2002	41	18	—	18	77
2003	77	51	45	36	209
計	164	75	48	54	341

図2 ヒト、および牛由来 EHEC O157 分子疫学解析結果と供試株一覧（2002年）



菌株番号	血清型	VT 型	検体受領年月日	由来	管轄保健所・産地
6741	O157 : H7	VT-1&2	2002/7/1	牛	秋田市
6822	O157 : H7	VT-1&2	2002/7/23	散発	秋田市
6829	O157 : H7	VT-1&2	2002/5/25	散発	秋田市
6870	O157 : H7	VT-1&2	2002/7/31	散発	大曲
6885	O157 : H7	VT-1&2	2002/8/3	散発	秋田中央
6965	O157 : H7	VT-1&2	2002/8/22	家族内	本荘
6740	O157 : H7	VT-2	2002/7/1	牛	西木村
6742	O157 : H7	VT-2	2002/6/24	牛	大館
7102	O157 : H7	VT-2	2002/9/20	牛	湯沢
7187	O157 : H7	VT-2	2002/10/29	牛	若美町
6824	O157 : H7	VT-2	2002/7/24	家族内	本荘
6835	O157 : H7	VT-2	2002/7/25	散発	秋田市
7496	O157 : H7	VT-2	2003/1/30	業態者	鷹巣
7662	O157 : H7	VT-2	2003/3/21	散発	秋田市

5. EHEC の同定に係る検査技術の導入・開発

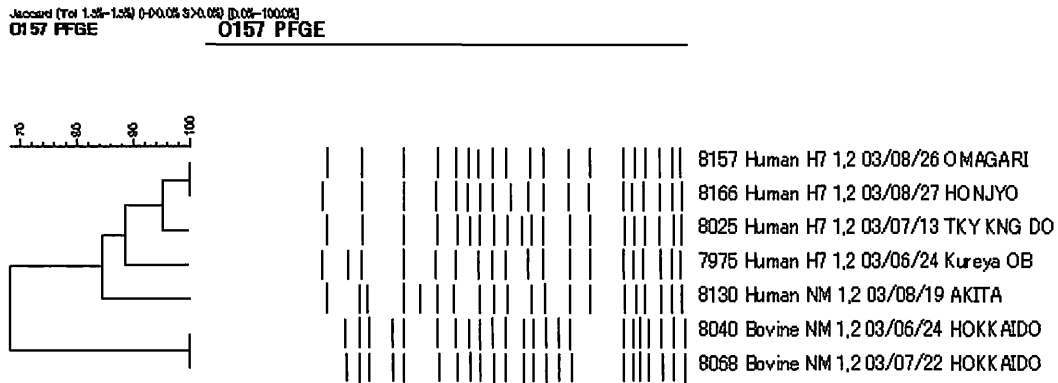
1) O 抗原合成遺伝子群を標的とした O 抗原特異検出 PCR

秋田県で散発患者からの検出頻度が高い EHEC O157⁵⁾、O26、O121⁶⁾、O91⁷⁾、O111⁸⁾ の分離・同定の効率化と高精度化、及び血清型別検査精度の向上を目的として、O 抗原合成遺伝子群を標的とした O 抗原特異検出 PCR を導入した。

2) 2001年に報告された EHEC の付着因子 *saa* (STEC autoagglutinating adhesin) 遺伝子検出用 PCR の導入

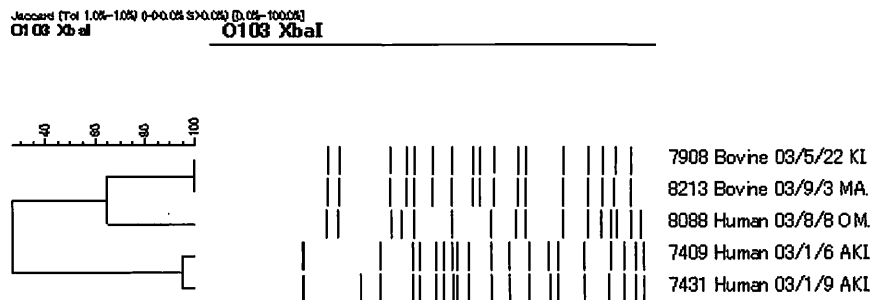
HUS 患者から分離され、既知付着遺伝子を保有しない EHEC O113 : H21 から新たな腸管付着因子として同定された *saa* 遺伝子の同定用 PCR⁴⁾ を導入した。

図3 ヒト、および牛由来 EHEC O157分子疫学解析結果と供試株一覧（2003年）



菌株番号	血清型	VT型	検体受領年月日	由来	管轄保健所・産地
8040	O157 : NM	VT-1, 2	2003/6/24	牛	北海道
8068	O157 : NM	VT-1, 2	2003/7/22	牛	北海道
8130	O157 : NM	VT-1, 2	2003/8/19	散発	秋田市
7975	O157 : H7	VT-1, 2	2003/6/24	集団	大館・秋田市
8025	O157 : H7	VT-1, 2	2003/7/13	集団	秋田市
8157	O157 : H7	VT-1, 2	2003/8/26	家族内	大曲
8166	O157 : H7	VT-1, 2	2003/8/27	散発	本荘

図4 ヒト、および牛由来 EHEC O103分子疫学解析結果と供試株一覧（2003年）



菌株番号	血清型	VT型	検体受領年月日	由来	管轄保健所・産地
7908	O103	VT-1	2003/5/22	牛	北海道
8213	O103	VT-1	2003/9/3	牛	増田町
7409	O103	VT-1	2003/1/6	散発	秋田市
7431	O103	VT-1	2003/1/9	業態者	秋田市
8088	O103	VT-1	2003/8/8	業態者	大曲

Ⅲ 結 果

1. 牛便からのヒト型 EHEC の分離

秋田県中央食肉衛生検査所の協力により提供を受けた牛の直腸便、合計452検体から分離されたヒト型 EHEC の一覧を表2に示した。2001年の検討では大雄村産牛1頭から EHEC O26 VT-1が1株分離されたが、EHEC O157、他のヒト型株は分離されなかった。2002年には県内各地産の牛5頭から EHEC O157：H7が分離され、また、北海道産牛2頭から付着遺伝子として *saa* を保有する EHEC O178：H19が分離された。2003年には北海道産牛2頭から EHEC O157、北海道産牛と増田町産牛各1頭から EHEC O103 VT-1、北海道産牛各1頭から EHEC O165 VT-1&2、EHEC O156：H25 VT-1、そして *saa* 遺伝子を保有する O113 VT-2が分離された。これらのうち、県内でヒトから分離例がある血清型は、O26、O157：H7、O103、O156：H25である。ただし、

O156：H25は無症状保菌者からのみの分離である。なお、O165は大阪で HUS 患者から分離されている EHEC の血清型であり、O113はオーストラリアで HUS 患者からの分離報告がある血清型である。一方、O178：H19は県内においてヒトからの分離報告がなく、国内においても分離例がほとんど無い血清型である。今回、EHEC O157：H7の保菌率は0.4%であった。以上の結果は、県内で食肉生産のためにと殺されている牛が実際にヒト型 EHEC を保菌していることを示していた。

2. 市販食肉からのヒト型 EHEC の分離

市販牛肉から分離されたヒト型 EHEC、及び VTEC の一覧を表3に示した。341検体のうち、2002年に検討したオーストラリア産牛肉の1検体から *saa* 遺伝子を保有するヒト型株である EHEC O113：H21 VT-2+が分離された。しかし、今回検討した範囲では EHEC O157、EHEC O26など、*eaeA* 遺伝子を保有し、県内で

表2 県内のと殺牛の直腸便から分離されたヒト型 EHEC 分離株一覧（2001－2003年）

受領年月日	血清型	VT 型	付着遺伝子	産地	菌株番号
2001/7/13	O26	VT-1	<i>eaeA</i>	大雄村	EC5337
2002/7/1	O157：H7	VT-1&2	<i>eaeA</i>	秋田市	EC6741
2002/7/1	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	西木村	EC6740
2002/6/24	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	大館市	EC6742
2002/9/20	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	湯沢	EC7102
2002/10/29	O157：H7	VT-2	<i>eaeA</i>	若美町	EC7187
2002/10/29	O178：H19	VT-1&2	<i>saa</i>	北海道	EC7188
2002/11/12	O178：H19	VT-1&2	<i>saa</i>	北海道	EC7242
2003/5/21	O113	VT-2	<i>saa</i>	北海道	EC7907
2003/5/21	O103	VT-1	<i>eaeA</i>	北海道	EC7908
2003/6/24	O165	VT-1&2	<i>eaeA</i>	北海道	EC8042
2003/6/24	O157：H7	VT-1&2	<i>eaeA</i>	北海道	EC8040
2003/7/22	O157：NM	VT-1&2	<i>eaeA</i>	北海道	EC8068
2003/9/3	O103	VT-1	<i>eaeA</i>	増田町	EC8213
2003/11/25	O156:H25	VT-1	<i>eaeA</i>	北海道	EC8359

表3 市販牛肉から分離された EHEC/VTEC 分離株一覧（2001－2003年）

購入年月日	菌種	血清型	VT型	付着遺伝子	由来	菌株番号
2002/11/5	EHEC	O113：H21	VT-2	<i>saa</i>	オーストサイクロスステーキ	EC7206
2003/11/4	VTEC	O2：H25	VT-2	—	牛ホルモン	EC8304
2003/11/4	VTEC	O2：H25	VT-2	—	牛ホルモン	EC8305
2003/12/1	VTEC	O168：H8	VT-2	—	牛ホルモン	EC8360
2003/12/8	VTEC	Out	VT-2	—	牛ホルモン	EC8400

散発患者から高頻度に分離される血清型の EHEC は検出されなかった。一方、冷凍牛ホルモンは購入したロットのほとんどすべてが米国産であり、VT 遺伝子保有株が比較的高頻度に検出されたが、分離株はすべて *eaeA*、*saa* 遺伝子のいずれをも保有せず、ヒト型 EHEC とは遺伝子型が異なっていた。これらの株はヒト型 EHEC と区別して VTEC と呼称することとした。

3. 分離株の分子疫学的性状比較

図 2 に 2002 年に分離された EHEC O157 牛由来株 5 株とヒト由来株 9 株の PFGE パターン比較結果を系統樹として示した。2002 年 7 月 1 日に秋田市産牛から分離された EHEC O157 : H7 VT-1&2+ 6741 株と 2002 年 8 月 22 日に本荘保健所管内で発生した家族内感染事例から分離された EHEC O157 : H7 VT-1&2+ 6965 株が同一パターンを示し、2002 年 9 月 20 日に湯沢産牛から分離された EHEC O157 : H7 VT-2+ 7102 株と 2002 年 7 月 25 日に秋田市保健所管内で発生した散発患者から分離された EHEC O157 : H7 VT-2+ 6835 株が同一パターンを示した。また、ヒト由来株のうち 2002 年 5 月 25 日に秋田市保健所管内で発生した散発患者、7 月 23 日に秋田市保健所管内で発生した散発患者、2002 年 7 月 31 日に大曲保健所管内で発生した散発患者から分離された EHEC O157 : H7 VT-1&2+ 6829 株、6822 株、及び 6870 株のパターンが同一であった。なお、これら 3 株のパターンと 6741 / 6965 株のパターンの相同性が 94% であり、これらの 5 株が同一起源に由来する株のグループに属すると考えられた。その他の株のパターンの相同性は最大でも 82% であった。

一方、図 3 に示すとおり、2003 年に分離された EHEC O157 の患者由来株と牛由来株に同一パターンを示す株は認められなかった。また、図 4 に示すように、EHEC O103 のヒト由来株と牛由来株にも同一パターンを示す株は認められなかった。

4. 牛が感染源と考えられた EHEC 感染事例、その他特記すべき事例の解析

事例 1 : 2003 年 5 月 29 日に本荘保健所管内で発生した畜産農家の EHEC O26 散発感染事例

本荘保健所管内在住の 60 代女性が 2003 年 5 月 29 日に EHEC O26 VT-1+, *eaeA*+ に感染していることが判明した。感染源調査として、飲用水 2 検体、飼育牛 7 頭の糞便を採取して EHEC の検索を実施した。その結果、飲用水はいずれも EHEC 陰性であったが、飼育牛 7 頭のうち下痢症状を示していた子牛の糞便 1 検体から EHEC O26 VT-1+, *eaeA*+ が分離された。患者由来株と子牛由来株の PFGE パターンを比較した結果、両者のパターンが同一であることが明らかとなった。以上の結果から、本事例は飼育牛を感染源とする EHEC O26

VT-1+, *eaeA*+ 散発感染事例であると考えられた。

事例 2 : 2003 年 6 月 24 日に秋田市保健所管内で発生した、焼肉店を原因施設とする EHEC O157 : H7 食中毒事例

大館保健所管内、秋田中央保健所管内、秋田市保健所管内に在住する患者、計 4 名が 2003 年 6 月に相次いで EHEC O157 : H7 VT-1&2+ に感染していることが判明した。患者の行動調査結果から、患者がいずれも秋田市内にある某焼肉店を利用していたことが判明した。患者の家族や患者と共通行動をとっていた知人などを調査した結果、2 名の無症状保菌者が確認された。分離された 6 株の EHEC O157 : H7 VT-1&2+ の PFGE パターンがすべて同一であったことから、これらの患者・保菌者はいずれも同一の感染源に由来する EHEC O157 : H7 VT-1&2+ に感染していることが明らかとなり、感染者の行動調査結果と併せて、共通利用施設である某焼肉店が本事例の原因施設と考えられた。

5. EHEC の同定に係る検査技術の導入・開発

1) O 抗原合成遺伝子群を標的とした O 抗原特異検出 PCR

既報に従い、O157⁵⁾、O26、O121⁶⁾、O91⁷⁾、O111⁸⁾ 抗原の特異検出用 PCR 法を導入し、県内でこれまでに分離された株や血清型参照株を使用して文献に記載されたとおりの結果が実際に得られることを確認した。一方、O26 については GenBank に報告されている O26 抗原合成遺伝子群 (accession no. AF529080) のうち、O-Antigen polymerase 遺伝子 (*wzy* 遺伝子) 領域にプライマーを設計し、県内分離株を使用して O26 抗原保有大腸菌が設計とおりの陽性反応を示すことを確認した。この PCR 系については検査精度の更なる検討が今後の課題である。また、O103 については O 抗原合成遺伝子群の塩基配列が報告されていなかったためにその解説を試み、約 12Kb におよぶ O103 抗原合成遺伝子群の塩基配列の解説に成功した。

2) *saa* (STEC autoagglutinating adhesin) 遺伝子検出用 PCR の導入

Paton らが報告⁴⁾した *saa* 遺伝子検出用 PCR を導入した。1991 年以降に県内で散発患者から分離された EHEC のほとんどすべてが *eaeA* 遺伝子を保有しているが、1997 年に本荘保健所管内で発生した家族内感染事例において、比較的重篤な症状を示した患者から分離された EHEC O150 : H8 VT-2+ は *eaeA* を保有していなかった。この株について *saa* 遺伝子の有無を検討した結果、この株は *saa* を保有することが明らかとなった。本研究においても牛便、及び牛肉由来 VT 遺伝子保有株について *eaeA* と共に *saa* 遺伝子の保有の有無を検討した。

IV 考 察

秋田県では1998年以降、年間約40事例の EHEC 感染事例が発生しているが、これまでに感染源や原因施設が特定された事例は極めて少ない。1989年の Karmali の総説²⁾のなかで既に、EHEC の Reservoir は牛であることが指摘されており、と殺過程で EHEC により汚染された牛肉が EHEC の感染源として重要であると考えられていた。このような知見に基づいて、我々は1992年に市販輸入牛肉を対象とした EHEC の汚染調査を実施し、オーストラリア産牛肉から VT-2遺伝子を保有する株を分離し、秋田市内で市販されている牛肉が実際に VTEC に汚染されていることを示した。また、県内で飼育されている牛の直腸便を対象として EHEC の検索を実施し、県内で飼育されている牛が VTEC を保菌していることも示した⁹⁾。その後、患者から分離される O157、O26、O103などの EHEC が腸管定着に関与する *eaeA* 遺伝子³⁾を保有していることが知られるようになり、また、患者から分離されるにもかかわらず *eaeA* 遺伝子を保有しない O113:H21などの EHEC が、2001年に Patton らにより *saa* という新たな腸管定着遺伝子¹⁾を保有していることが示され、EHEC のヒトに対する病原性とこれらの腸管定着因子の存在が密接に関連していると考えられるようになった。これまでの国内外の報告によると、牛や牛肉から分離される VT 遺伝子保有株の大半がこれらの腸管定着遺伝子を保有しない VTEC であり、これらの VTEC がヒトの病原菌としてどのような意義を持つかについては明らかではない。*eaeA* や *saa* を保有する EHEC を選択的に分離・同定する手法としては島根衛研の福島ら^{10) 11) 12)}が報告した塩酸処理法とセフィキシム・テルライト (CT) 選択剤の使用などが有効であり、当所においても感染源調査などに応用してその有用性を確認している。従って、今回、2001年から実施した調査ではこれらの選択分離技術を応用し、市販牛肉と県内でと殺される牛の糞便中の *eaeA* や *saa* 保有 EHECを検索した。なお、1992年当時は *eaeA* や *saa* 遺伝子の意義が十分認識されるに至らず、かつ、これらの遺伝子を保有する EHEC の選択的な分離方法が開発されていなかったために、県内で実施した調査において使用した分離方法は極めてプリミティブな手法であり、実際に牛肉や牛便から分離された VT 遺伝子保有株はすべて腸管定着遺伝子を保有しない VTEC であった。

今回の調査により、県内で食肉生産目的でと殺されている牛がヒトの下痢症から分離されている EHEC O26、O157:H7、O103、及び無症状保菌者から分離されている EHEC O156:H25を実際に保菌していることが初めて示され、大阪府で HUS 患者から分離されている EHEC O165とオーストラリアで HUS 患者から分離さ

れている EHEC O113の保菌も確認された。牛がこれらの EHEC を保菌している事実と県内における EHEC 患者発生との関連は必ずしも明白ではない。この点についてさらに検討するため、牛からこれらの菌が分離された時期に県内で発生した患者から分離された菌のうち、牛由来株と血清型、VT 遺伝子型が一致する株について PFGE パターンを比較した。その結果、2002年の 7 月 1 日に秋田市産牛から分離された EHEC O157:H7 VT-1&2+ 6741株と 8 月22日に本荘保健所管内で発生した家族内感染事例から分離された EHEC O157:H7 VT-1&2+ 6965株のパターンが同一であること、及び 9 月20日に湯沢産牛から分離された EHEC O157:H7 VT-2+ 7102株と 7 月25日に秋田市保健所管内で発生した散発患者から分離された EHEC O157:H7 VT-2+ 6835株のパターンが同一であることが明らかとなった。これらの 2 事例において、牛とヒトから同一 PFGE パターンを示す EHEC O157:H7が分離された時期が 1 か月以上、あるいは約 2 か月隔たっている点が注目される。このことから、以上の結果は県内でと殺された牛が EHEC 患者発生に関与していたことの直接証拠とは必ずしもなり得ず、むしろ、同一起源から派生した EHEC が県内でヒトと牛に侵淫している事実を示すものと考えることが妥当といえる。なお、EHEC O103については検討した範囲で牛由来株とヒト由来株に同一 PFGE パターンを示す株は認められなかった。一方、今回の結果は牛がと殺される過程で食肉が EHEC に 2 次汚染される可能性をあらためて示すものと考えられる。この点については、食肉生産現場における HACCP システムの励行が 2 次汚染の発生防止のために極めて有用であると考えられる。今回、検体の採取・提供に関して全面的に協力をいただいた秋田県中央食肉衛生検査所は、全国に先駆けて1999年 8 月から HACCP を導入しており、2 次汚染防止に係る衛生管理は万全の体制が既に構築されているといえる。

市販食肉については、ヒトの下痢症から分離されている EHEC O26、O157:H7、O103の汚染を直接証明し得なかったが、オーストラリア産牛肉から EHEC O113:H21 VT-2+, *saa*+が分離された。EHEC O113:H21は県内で患者からの分離例がないが、このことは O113の型別血清が市販されていないために医療機関の検査室で十分な検索が実施し得ないことに起因するとも考えられる。一方、今回の調査で冷凍ホルモンから VTEC が高頻度に分離された。このことは、輸入牛肉のなかでもホルモンが EHEC に汚染される可能性が高いことを示唆するものと推察される。なお、供試した冷凍ホルモンの産地は、判明した限りにおいて米国であった。一方、秋田県内においても焼肉店を原因施設とする EHEC 集団

感染事例が発生している。これまでに発生した最大規模の事例は1999年に横手保健所管内で発生した EHEC O157 : H7を原因とする事例であったが、今回の検討期間においても2003年 6 月24日に秋田市保健所管内で EHEC O157 : H7を原因とする食中毒事例が発生している。また、焼肉店が原因施設として疑われたものの、事例との関連を証明するには至らなかった事例としては、1997年に横手保健所管内で発生した EHEC O157 : H7 感染事例、及び2001年に秋田市保健所管内で発生した HUS 発症をともなう EHEC O157 : H7感染事例がある。焼肉店においては、コストなどの理由により、提供される牛肉のなかで輸入牛肉がかなりの比率を占めるであろうことを勘案すると、県内における EHEC 感染事例の感染源としての輸入牛肉の意義については今後とも注目する必要があると考えられる。なお、2004年は BSE 問題により米国からの牛肉の輸入が停止している。しかしながら、国立感染症研究所の感染症情報には2004年10月現在における全国の EHEC 感染者数が昨年以前の同時期における患者数とほぼ同数で推移していることが示されている。このことは、米国産牛肉の輸入停止が国内における EHEC 患者発生数に顕著な影響を及ぼしていないことを示しているものと考えられ、国内における EHEC 感染源の多様性を示唆しているものと推察される。

今回の検討期間中である2003年 5 月29日に本荘保健所管内で飼育牛を感染源とする畜産農家の EHEC O26散発感染事例が発生した。秋田県においてはこれまで、1996年に畜産農家における EHEC O103 : H2家族内感染事例¹³⁾、2000年に飼育牛が感染源と考えられた EHEC O121家族内感染事例¹⁴⁾ が発生している。これらの事例はいずれも牛由来株と患者由来株の PFGE パターンが一致したことにより、牛が感染源と特定された事例である。なお、飼育牛や観光牧場の牛が感染源と特定された EHEC 感染事例は全国的にも散見される。以上の結果は、感染源全体に占める割合は小さいと考えられるものの、飼育牛自体も県内における EHEC 感染事例における感染源としての意義を持つことを示していると考えられ、このことも県内における EHEC 感染源の多様性を示すものと考えられる。

本調査研究を遂行する過程で、EHEC の血清型決定に有用である O 抗原合成遺伝子群を標的とした PCR を導入した。現在 PCR 法が報告されている O 抗原は O157、O111、O121、O91、O113、O104であり、今回、これらのうち O157、O111、O121、O91用 PCR を導入した。これらの血清型の EHEC のうち、O121と O91を型別するための国産型別用血清は市販されていない。そのため、県内で発生した患者から分離された菌の血清型を決定する際には国際大腸菌クレブシエラセンターから輸入した

型別用血清を使用している。しかし、これらの輸入血清は非特異的凝集反応が強くみられ、検査精度が国産血清と比較すると相当低く、検査精度を確保するためには型別を実施する担当者に相当の経験が必要である点が問題であった。今回、O121、O91、O157、O111抗原特異検出用 PCR を導入したことにより、これら4種類の O 抗原については原理の異なる2種類の手法により血清型の決定が可能となったために、従来と比較して検査精度の向上が実現した。さらに、培養液や分離平板に生じた多数の菌の中にこれら4種の O 抗原を保有する菌を検出可能となったことから、感染源調査などにおいて少数の菌を分離平板上で検索することも可能となり、感染源調査などの菌検索についても精度の向上が実現した。これらに加えて、O26抗原合成遺伝子群を標的とした PCR を確立しつつある。また、O-Antigen polymerase 遺伝子や O-Antigen flipperse 遺伝子など、O103抗原に特異的な遺伝子を特定し、それらを標的とするプライマーを設計することにより PCR 反応系を確立することが今後の課題である。今回の調査研究遂行過程で導入したこれらの PCR は、今後も県内における EHEC 感染者の診断精度の向上と感染源調査の迅速化・精度向上に大きく寄与すると考えられる。

本調査研究により得られた成績は、県内における EHEC 感染源の多様性を示すものと考えられた。県内における EHEC の感染源対策に取り組む際には、この感染源の多様性を考慮する必要性があるものと考えられた。

V ま と め

- ・ 今回の調査研究により県内で食肉生産目的によりと殺されている牛や畜産農家における飼育牛がヒト型 EHEC を実際に保菌していること、及び市販食肉がヒト型 EHEC により汚染されている事実が明らかとなった。
- ・ 輸入牛肉と、と殺牛が実際の EHEC 感染事例の感染源であることは直接証明されなかったが、県内における EHEC 感染源の多様性が示唆された。
- ・ 県内における EHEC の感染源対策に取り組む際には、感染源の多様性を考慮する必要性があることが浮き彫りとなった。
- ・ 本研究の当初計画にはなかったが、研究遂行過程における必要性から O121、O91、O157、O111抗原特異検出用 PCR を導入した。また、O26、O103抗原特異検出用 PCR も開発中である。これらの PCR は、今後、県内における EHEC 感染者の診断精度の向上と感染源調査の迅速化・精度向上に大きく寄与すると考えられる。

VI 文 献

- 1) 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. 感染症誌, 1995 ; 69 : 1286-1293.
- 2) Karmali, M.A. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. Clin. Microb. Rev., 1989 ; 2 : 15-38.
- 3) McKee, M.L. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. Infect. Immun., 1995 ; 63 : 3739-3744.
- 4) Patton, A.W. et al. Characterization of *Saa*, a novel auto agglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect. Immun., 2001 ; 69 : 6999-7009.
- 5) Maurer, J.J. et al. Development of Primers to O-Antigen Biosynthesis Genes for Specific Detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl. Environ. Microbiol., 1999 ; 65 : 2954-2960.
- 6) Pina, M. et al. Sequence of the *Escherichia coli* O121 O-Antigen Gene Cluster and Detection of Enterohemorrhagic *E. coli* O121 by PCR Amplification of the *wzx* and *wzy* Genes. J. Clin. Microbiol. 2003 ; 41 : 3379-3383.
- 7) Perelle, S. et al. Identification of the O-antigen biosynthesis genes of *Escherichia coli* O91 and development of a O91 PCR serotyping test. J. Appl. Microbiol., 2002 ; 93 : 578-764.
- 8) Paton, A.W. and Paton, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, *rfb* O111, and *rfb* O157. J. Clin. Microbiol., 1998 ; 36 : 598-602.
- 9) 八柳 潤, 他. 県内産牛肉および牛からのベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離. 秋田県衛生科学研究所報, 1994 ; 38 : 27-32.
- 10) Fukushima, H. et al. An effective, rapid and simple method for isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces and food samples. Zentralbl Bakteriол., 1999 ; 289 : 415-428.
- 11) Fukushima, H. et al. Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces, food and environmental samples. Zentralbl Bakteriол., 1999 ; 289 : 285-299.
- 12) Fukushima, H. et al. Selective isolation of *eae*-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 2000 ; 38 : 1684-1687.
- 13) 齊藤志保子, 他. 牛が感染源と考えられ Vero 毒素産生性大腸菌 O103 : H2による家族内感染事例, 感染症誌, 1998 ; 72 : 703-713.
- 14) Yatsuyanagi, J. et al. A case of Hemolytic-uremic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. Jap. J. Infect. Dis., 2002 ; 55 : 174-176.