

【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2年度）

Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Okayama Prefecture  
(FY2020)

岡田達郎, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明

OKADA Tatsurou, KAWAI Hisahiro, NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki

### 要 旨

腸管出血性大腸菌感染症の感染源や感染経路の究明、そして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2年度に岡山県内でヒトから分離されたEHEC株を収集し疫学調査を実施した。収集した70株のO血清群は、O157が56株（80.0%）と最も多く、次いでO26が6株（8.6%）、O111、O103、O81が2株（2.9%）、O55とO91が1株（1.4%）であった。反復配列多型解析（以下「MLVA」という。）及び疫学情報によるクラスター解析では、10種のクラスターが形成された。複数事例が同一クラスターに分類され、グループ事例以外にもMLVA型や居住地の一致等から疫学的な関連を疑う事例が認められた一方で、MLVA型が一致したにもかかわらず、疫学的な関連が不明の事例も多かった。今後は、更に多くの疫学情報を収集し、分子解析情報と併せた解析を継続することで、少しでも多くの感染源や感染経路の究明に繋げたい。

[キーワード：腸管出血性大腸菌, 疫学調査, 反復配列多型解析 (MLVA), 薬剤耐性]

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

Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA), Drug resistance]

## 1 はじめに

腸管出血性大腸菌感染症は、志賀毒素を産生する腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）を起因菌とする感染性胃腸炎で、激しい腹痛、水様性下痢及び血便を主症状とし、嘔吐や発熱を伴う場合もある。EHECは牛等の家畜や鹿等の野生動物の腸内に保菌されることがあるため、これらの糞便に汚染された食品や水から感染する可能性がある。また、感染力が強いことから、しばしば集団感染を引き起こし、広域物流の発達した現代では、汚染された食品が製造された地域から遠く離れた地域に運ばれ喫食されることで、広域的な集団感染となることもある。しかしながら、EHECの感染菌量は、100個以下と推定されており<sup>1)</sup>、少量汚染であっても感染源となる可能性があるため、感染源や感染経路の特定はもとより、効果的な発生予防対策や感染拡大防止対策を講じることが困難なことが多い。当センターでは、これらの問題の解決の一助とするため、県内で得られたヒト由来株の性状や遺伝的情報などを解析し、疫学情報と合わせたデータベースを構築してきた<sup>2)~5)</sup>。令和2年度は、これまでの解析手法に加え、複数のクラスターが発生したO157については反復配列多型解析<sup>6)</sup>（以下「MLVA」と

いう。）法で得られたデータを基にMinimum Spanning Tree（以下「MST」という。）を作成し、菌株間の疫学的関連性を解析したので報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 菌株及び疫学情報

保健所、医療機関及び民間検査機関において、県内のEHEC感染者から分離されたヒト由来EHEC株70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>7)</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>8)</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。

### 2.2.5 MLVA法による分子疫学解析

O26, O103, O111及びO157株については、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コンプレックス (以下「MLVAコンプレックス」という。) の情報提供を受けた。他の株については、PFGE法による解析を感染研に依頼した。

### 2.2.6 ヒト由来EHEC株のクラスター解析

O26, O103, O111及びO157株については、MLVA法による反復配列のリピート数の相違が2遺伝子座以内となる株を同一クラスターとして分類した。O81については、PFGE型が一致した株を同一クラスターとして分類した。また、患者の疫学情報から、居住地を市町村別、事例を散発事例又はグループ事例に分類し、クラスター分類と併せて解析した。

### 2.2.7 MST解析

O157については、MLVA情報集計・可視化システムMLVA-mateによりMSTを作成し、クラスター分類の結果と併せて菌株間の関連性を解析した<sup>9)</sup>。

## 3 結果及び考察

ヒト由来EHECの月別検出状況を図1に示した。ヒト由来EHECの検出数は、6月と9月の各18株が最も多

く、次いで10月の16株、7月の10株の順であった。夏季に多い傾向は例年どおりであったが、8月は4株と少なく、一方で9月～10月の秋季に検出数が多かった点は例年と異なっていた<sup>2)~4)</sup>。

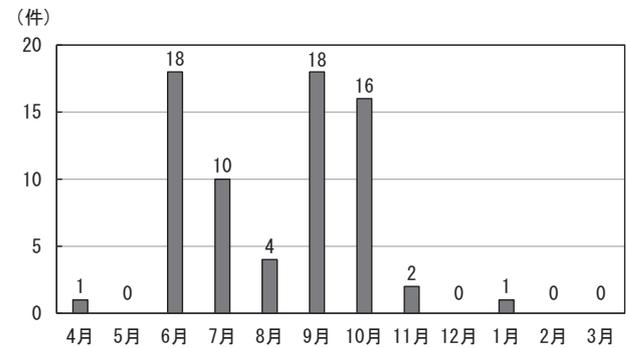


図1 ヒト由来EHEC株の月別検出状況

ヒト由来EHECの血清型、志賀毒素 (以下「Stx」という。) 型、stxサブタイプ及びeaeの有無並びに感染者の症状を表1に示した。ヒト由来EHECは、O157が56株 (80.0%), 次いでO26が6株 (8.6%), O111, O103, O81が各2株 (各2.9%), O55とO91が各1株 (各1.4%) であった。例年と同様に、O157及びO26の検出数が多く、この2つのO血清群で全体の88.6%を占めた<sup>2)~5)</sup>。Stx1型のサブタイプは、9株全てがstx1aであった。Stx2型のサブタイプは、5株のうち2株がstx2a, 2株がstx2c, 1株がstx2a+stx2cであった。Stx1&2型のサブタイプは、56株のうち52株がstx1a+stx2a, 4株がstx1a+stx2cであった。eaeは、66株 (O157, O26, O103, O111) が保有しており、このうち54株 (81.8%) が有症者由来株であったが、eae非保有の4株における有症者由来株は、1株 (25.0%) のみであった。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>1)</sup>。本調査でも、eae保有株における有症率は高く、その病原性との関連性を裏付ける結果であった。

令和2年度に収集したEHEC感染者70名の内訳は、有症者が55名 (78.6%), 無症状病原体保有者が15名 (21.4%) であった。有症者のうち、急性腎不全を呈した者は1名、血便を呈した者は31名、急性腎不全及び血便を呈した者は1名であり (これらの症状のいずれかを呈した者を以下「重症者」という。), 重症者の割合は60.0%であった。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の割合は、O103:H2 (Stx1;stx1a) 及びO81:H- (Stx1&2;stx1a+stx2a) がそれぞれ100%,

O157:H7 (Stx1&2;stx1a+stx2a) が70.3 %, O26:H11 (Stx1;stx1a) 及びO111:H- (Stx1&2;stx1a+stx2a) がそれぞれ50.0 %であり, 全ての株がstx1a又はstx1a+stx2aを有していた。また, 他の血清型及びstxサブタイプの組合せに重症者はなかった。stx2a保有株は, 他のサブタイプ保有株と比較して病原性が高い可能性を示唆する報告<sup>10)</sup>があり, 当センターにおける過去の調査でも同様の傾向が見られた<sup>2), 3), 5)</sup>。令和2年度の調査では, stx1a+stx2a保有株による有症者数が最も多く, また重症者の割合も高かったが, stx2aの単独保有株及びstx2a+stx2c保有株による重症者がいない点で, 例年の傾向と異なっていた<sup>2)-5)</sup>。この原因として, 収集した菌株数が病原性の評価には不十分であった可能性があるため,

今後も引き続き調査が必要であると考え。

ヒト由来EHEC株の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, 70株のうち10株(14.3 %)であり, 平成30年度(17.1 %)及び令和元年度(19.6 %)と同程度であった<sup>2), 3)</sup>。O血清群別での内訳は, O157は4株, O26は4株, O111は2株であった。耐性を示した薬剤は, ABPC, KM, TC, CP, NA及びSTの6剤で, TCが8株で最も多く, 次いでNAが6株, KM及びCPがそれぞれ4株, ABPC及びSTがそれぞれ2株であった。FOM, NFLX, KM及びニューキノロン系抗菌薬はEHEC感染症治療の第一選択薬であり, 临床上極めて重要な抗菌薬である。令和2年度は4株がKM耐性であった。近年では, 令和元

表1 ヒト由来EHEC株の血清型等及び感染者の症状

血清型	Stx型	stxサブタイプ	eae	株数	分離率(%)	症状			
						有症者			無症状病原体保有者数
						有症者数	重症者数	重症者数/有症者数(%)	
O157:H7	Stx2	stx2a	+	1	1.4	1	0	0.0	0
		stx2a+stx2c	+	1	1.4	1	0	0.0	0
		stx2c	+	2	2.9	2	0	0.0	0
	Stx1&2	stx1a+stx2a	+	48	68.6	37	26	70.3	11
		stx1a+stx2c	+	1	1.4	0	0	—	1
O157:H-	Stx1&2	stx1a+stx2c	+	3	4.3	3	0	0.0	0
O26:H11	Stx1	stx1a	+	6	8.6	6	3	50.0	0
O103:H2	Stx1	stx1a	+	2	2.9	2	2	100.0	0
O111:H-	Stx1&2	stx1a+stx2a	+	2	2.9	2	1	50.0	0
O55:H12	Stx1	stx1a	-	1	1.4	0	0	—	1
O81:H-	Stx1&2	stx1a+stx2a	-	2	2.9	1	1	100.0	1
O91:H-	Stx2	stx2a	-	1	1.4	0	0	—	1
計				70		55	33		15

\* 重症者: HUS、急性腎不全、血便のいずれかを呈した有症者とした。  
(内訳: 急性腎不全+血便: 1名、血便: 31名、急性腎不全: 1名)

表2 ヒト由来EHEC株の薬剤感受性試験結果 (O血清群別)

O血清群	株数	耐性株数	血清型 (Stx型)	薬剤耐性パターン (株数)
O157	56	4	O157:H7 (Stx1, 2)	KM・CP (2), TC (2)
O26	6	4	O26:H11 (Stx1)	TC・NA (4)
O111	2	2	O111:H- (Stx1, 2)	ABPC・KM・TC・CP・NA・ST (2)
O81	2	0		
O103	2	0		
O91	1	0		
O55	1	0		
計	70	10		

年度にKM耐性菌が2株、平成30年度にFOM耐性菌が3株、平成28年度にFOM耐性菌が1株と、断続的に耐性菌が検出されている<sup>2)~5)</sup>。第一選択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ため、今後も継続して調査を行い、薬剤耐性化の傾向を把握する必要がある。なお、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（以下「ESBL」という。）産生EHECについては、令和2年度は疑われる事例がなかったが、過去には検出されており、今後も注視が必要と考える<sup>4), 5)</sup>。

ヒト由来EHECのO26、O81、O103、O111及びO157のクラスター解析の結果を表3に示した。O157によるグループ事例5件（グループ事例②、④、⑤、⑥、⑦）及びO111によるグループ事例1件（グループ事例⑨）は各事例内の菌株間でMLVA型が一致した。また、O81によるグループ事例1件（グループ事例⑧）はPFGE型が一致した。そのため、グループ事例②、④、⑤、⑥、⑦、⑧及び⑨は、それぞれ同一由来株に起因すると推定された。O157によるグループ事例2件（グループ事例①、③）は、同一事例内で1株のMLVA型が一致しなかったが、MLVAコンプレックスが一致しているため、株間には関連性があるものと考えられた。

O157の56株は23種類のMLVA型に分類され（データ示さず）、46株が6種類（A～F）のクラスターを形成した。クラスターAは県南部で発生し、グループ事例①及び②を含む12株から形成された。12株のうち11株は6月から7月にかけて検出され、MLVAコンプレックス「20c006」に分類された。MST解析の結果、MLVA型の異なるグループ事例①の2株「20m0067及び20m0093」には2遺伝子座の相違があり、同クラスターに属する散发事例2株「20m0081」は、その中間（グループ事例①の2株と1遺伝子座のみ異なる）に位置していた（図2）。「20m0093」については、グループ事例①で1株、グループ事例②で4株、散发事例で3株が確認され、グループ内のMLVA型で最も多かった。「20m0352」の1株は10月に検出され、他株の検出月（6～7月）と大きく離れていることから、事例間の疫学的な関連は低いと考えられた。クラスターBは県南部で発生し、グループ事例③を含む4株から形成され、全て同じMLVAコンプレックス「20c022」に分類された。「20c022」は、複数の自治体で検出される広域流行株として感染研による調査が行われたが、感染源の究明には至っていない。クラスターCは県南部で発生し、グループ事例④及び⑤を含む22株から形成された。全ての株は8月から10月にかけて検出

され、MLVAコンプレックス「20c038」に分類された。MLVA型は、22株のうち21株は「20m0245」であり、1株は1遺伝子座のみ異なる「20m0335」であった。5自治体の散发事例18株が「20m0245」であったことから、疫学的関連性は不明ながらも何らかの県内拡大要因があったと推察された。また、図1に示した例年と異なる秋季の検出数の増加は、「20m0245」の9月～10月の集中的な発生が要因であると考えられた。クラスターDは散发事例4株から形成された。このうち2株のMLVA型が「19m0145」であり、検出時期も近く、居住地区も一致していたことから、疫学的な関連が疑われた。クラスターE及びFは、それぞれ単一のMLVA型のグループ事例⑥⑦の各2株から形成された。

O26の6株は3種類のMLVA型に分類され（データ示さず）、このうち「20m2052」の4株がクラスターGを形成した。しかしながら、これらの疫学的関連性は不明であり、散发事例に分類された。また、O81の2株、O103の2株及びO111の2株はそれぞれ同じMLVA型又はPFGE型であり、それぞれクラスターH、I及びJを形成した。クラスターH及びJはグループ事例であったが、クラスターIを形成したO103の2株についても、MLVA型が同一の「19m4016」であり、検出時期も近く、居住地区も一致していたことから、疫学的な関連が疑われた。

集団事例や広域的な食中毒事案の早期探知には、自治体、保健所等の関係機関の情報共有が不可欠である。そのため、当センターでは収集したヒト由来EHEC株について、分子疫学解析等を行い、疫学情報と併せた菌株データベースの構築を進めてきた。しかしながら、現時点では菌株間の分子解析情報と患者の疫学情報の間に関連性が見出せないことも多い。今後は、更に多くの疫学情報を収集し、分子解析情報と併せた解析を継続することで、少しでも多くの感染源や感染経路の究明に繋げたい。

表3 ヒト由来EHEC株のクラスター解析結果

クラスター	血清型 (Stx型)	菌株No.	菌検出月	居住地 (市町村別)	事例種	MLVA型	MLVA コンプレックス	PFGE型	
A	O157:H7 (Stx1,2)	1	2020.6	a	散発事例	20m0081	20c006		
		2	2020.6	b	散発事例	20m0067			
		3	2020.6	c	グループ事例①				
		4	2020.6	c	グループ事例②	20m0093			
		5	2020.6	b					
		6	2020.6	b					
		7	2020.7	b					
		8	2020.7	b	散発事例	20m0352			
		9	2020.7	b					
		10	2020.7	b					
		11	2020.7	b	散発事例	20m0352			
		12	2020.10	b	散発事例				
B	O157:H7 (Stx1,2)	13	2020.9	c	グループ事例③		16m0039	20c022	
		14	2020.8	c					
		15	2020.9	c	20m0234				
		16	2020.10	b	散発事例				
C	O157:H7 (Stx1,2)	17	2020.8	c	散発事例	20m0245	20c038		
		18	2020.9	c	散発事例				
		19	2020.9	d	グループ事例④				
		20	2020.9	d					
		21	2020.10	d	グループ事例⑤				
		22	2020.10	d					
		23	2020.9	b	散発事例				
		24	2020.9	b	散発事例				
		25	2020.9	b	散発事例				
		26	2020.9	b	散発事例				
		27	2020.9	b	散発事例				
		28	2020.10	e	散発事例				
		29	2020.9	f	散発事例				
		30	2020.9	c	散発事例				
		31	2020.9	c	散発事例				
		32	2020.10	c	散発事例				
		33	2020.10	b	散発事例				
		34	2020.10	b	散発事例				
		35	2020.10	b	散発事例				
		36	2020.10	c	散発事例				
37	2020.10	g	散発事例						
38	2020.10	c	散発事例	20m0335					
D	O157:H7 (Stx1,2)	39	2020.4	b	散発事例	20m0045			
		40	2020.6	b	散発事例	19m0145			
		41	2020.6	b	散発事例	20m0271			
		42	2020.10	b	散発事例				
E	O157:H7 (Stx1,2)	43	2020.9	b	グループ事例⑥	15m0385			
		44	2020.9	b					
F	O157:H7 (Stx1,2)	45	2020.10	h	グループ事例⑦	20m0366			
		46	2020.10	h					
G	O26:H11 (Stx1)	47	2020.6	i	散発事例	20m2052			
		48	2020.7	c	散発事例				
		49	2020.7	c	散発事例				
		50	2020.6	h	散発事例				
H	O81:H- (Stx1,2)	51	2020.9	j	グループ事例⑧			同一バンド パターン	
		52	2020.9	j					
I	O103:H2 (Stx1)	53	2020.6	b	散発事例	19m4016			
		54	2020.6	b	散発事例				
J	O111:H- (Stx1,2)	55	2020.6	b	グループ事例⑨	20m3009			
		56	2020.6	b					

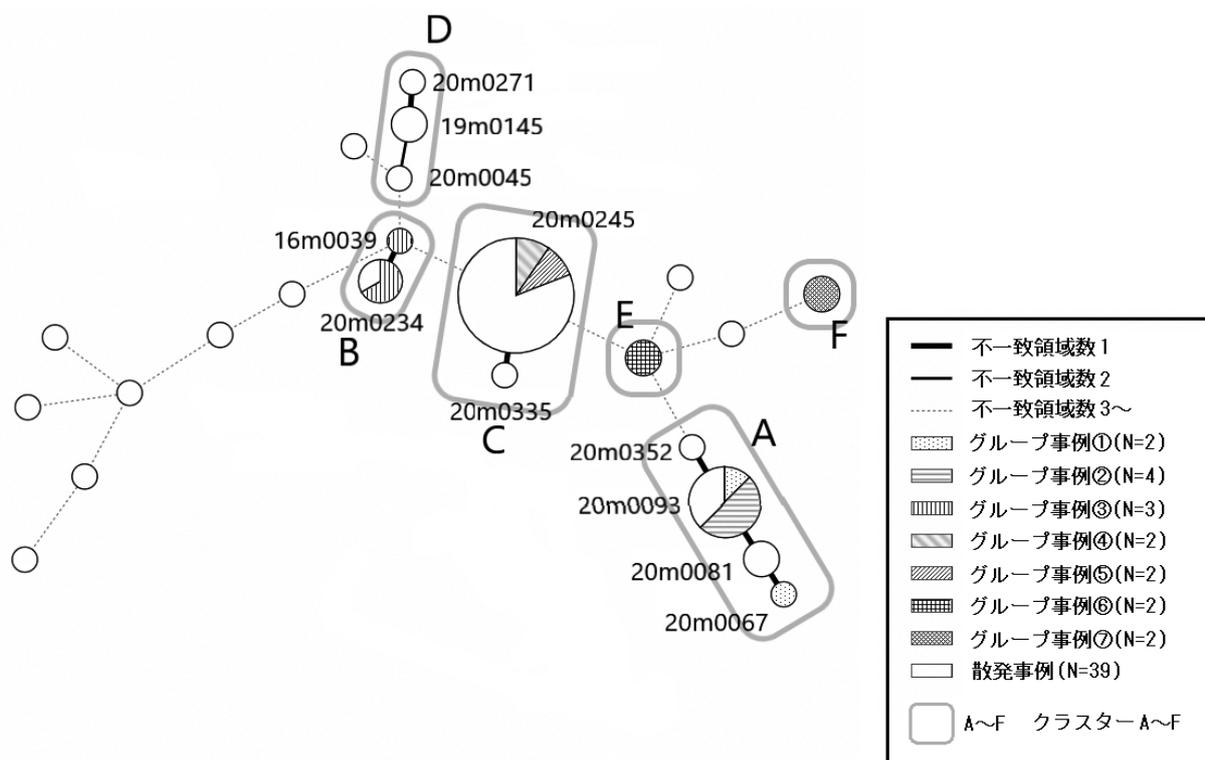


図2 O157 Minimum Spanning Tree (MST)

## 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) 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
- 2) 河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 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 (2019年度), 岡山県環境保健センター年報, 44, 55-60, 2020
- 3) 森本晃司, 仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明: 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成30年度), 岡山県環境保健センター年報, 43, 73-78, 2019
- 4) 仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明: 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成29年度), 岡山県環境保健センター年報, 42, 35-42, 2018
- 5) 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
- 6) 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

- 7) 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
- 8) 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
- 9) 南須原 亮, 灘岡陽子, 草深明子, 石川貴敏, 安中めぐみ ら: MLVA (VNTR) 情報の集計・可視化システムMLVA-mate の開発, *東京都健康安全研究センター年報*, 69, 279-284, 2018
- 10) 永井佑樹, 小林隆司, 小林章人, 赤地重宏: 三重県における腸管出血性大腸菌感染症について Stxバリエーション解析とO157株のクレード解析, *三重県保健環境研究所年報*, 第18号, 44-50, 2016