

【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5年）

Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Okayama Prefecture (2023)

池田和美, 梶原知博, 河合央博

IKEDA Kazumi, KAJIHARA Tomohiro, KAWAI Hisahiro

要 旨

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）感染症について、感染源や感染経路の究明により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5年1月から12月までに県内のEHEC感染症患者から分離されたヒト由来EHEC株を収集し、発生動向調査を実施した。収集した94株のO血清群は、O157が69株（73.4 %）と最も多く、次いでO26, O103が各7株（各7.4 %）、O111及びOgN6が各2株（各2.1 %）と続いた。O157及びO26の反復配列多型解析（以下「MLVA」という。）法を用いた分子疫学解析では、異なる事例間でMLVA型又はMLVAcomplex（以下「MLVA型等」という。）が一致するクラスターが形成された。また、本県の事例と同じMLVA型等が他県でも多数認められた。現状では、事例間で同一のMLVA型等になっても関連性が解明できないことが多いが、EHEC感染症の拡大防止や感染予防のためには、MLVA法による分子疫学解析結果等を保健所等関係機関へ還元し、事例間の関連性等の疫学調査のサポートを継続することで、少しでも多くの感染源や感染経路の究明につなげることが重要であると考えます。

[キーワード：腸管出血性大腸菌，発生動向調査，反復配列多型解析（MLVA）]

[Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Epidemiological study, Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)]

1 はじめに

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）感染症は、志賀毒素を産生する大腸菌による、激しい腹痛、水様性下痢、血便、嘔吐、発熱を主症状とする感染症である。重症化すると血小板減少、溶血性貧血、急性腎不全等の症状を示す溶血性尿毒症症候群（以下「HUS」という。）や脳症を併発し、死亡例も認められることから、特に食品衛生分野では注意が必要とされている。しかしながら、EHEC感染症の多くは散発的に発生するため、感染源や感染経路の特定は困難であり、食品の広域流通が進んだ現代では、自治体をまたぐ潜在的な集団発生（以下「diffuse outbreak」という。）も問題視されている。当センターではこれらの問題解決の一助とするため、県内で分離されたヒト由来EHEC株を収集し、性状試験、薬剤感受性試験及び反復配列多型解析（以下「MLVA」という。）法¹⁾を用いた分子疫学解析等により、県内のEHEC感染症の発生動向調査を継続的に行っている。今回、令和5年1月から12月までの期間におけるEHEC感染症の発生動向調査について報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び疫学情報

令和5年1月から12月までの期間に県内で発生したEHEC感染症患者104名のうち、保健所、医療機関及び民間検査機関において94名から分離されたEHEC株94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²⁾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³⁾

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), セフォタキシム (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。判定は、BD センシ・ディスクの基準に従った。

2.2.5 MLVA法による分子疫学解析

収集したO157, O26及びO111株について、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complex (以下「MLVAcomplex」という。) の情報提供を受けた。また、食中毒調査支援システム (以下「NESFD」という。) 内の全国のMLVA情報を参考に、他県の検出状況と比較した。

3 結果及び考察

EHEC感染症の月別発生件数を図1に示した。発生件数は、8月の22件が最も多く、次いで6月の16件、7月の14件、9月の12件の順で、例年どおり夏季に多く発生した。

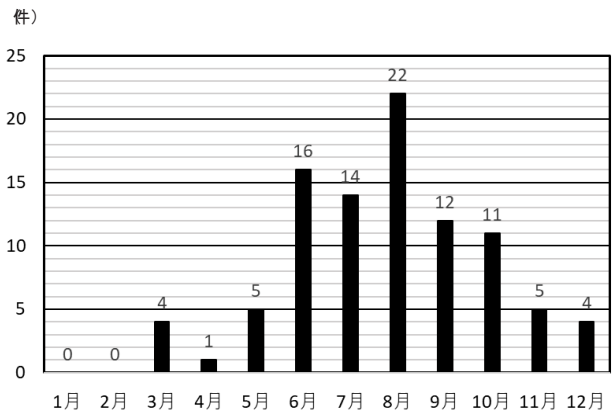


図1 岡山県におけるEHEC感染症の月別発生件数

表1 ヒト由来EHEC株の生物学的性状及び患者の症状

血清型	Stx型	<i>stx</i> サブタイプ	<i>eae</i>	株数	分離率 (%)	症状			
						有症者数		無症状 病原体 保有者数	
						有症者	重症者*		
O157:H7	Stx2	<i>stx2a</i>	+	6	6.4	5	2	40.0	1
		<i>stx2c</i>	+	2	2.1	2	1	50.0	0
		<i>stx2a+stx2c</i>	+	21	22.3	21	11	52.4	0
	Stx1&2	<i>stx1a+stx2a</i>	+	28	29.8	18	12	66.7	10
		<i>stx1a+stx2c</i>	+	1	1.1	1	0	0.0	0
O157:H-	Stx1	<i>stx1a</i>	+	3	3.2	2	1	50.0	1
	Stx2	<i>stx2a</i>	+	1	1.1	1	1	100.0	0
		<i>stx2c</i>	+	3	3.2	2	1	50.0	1
	Stx1&2	<i>stx1a+stx2c</i>	+	4	4.3	3	1	33.3	1
O26:H11	Stx1	<i>stx1a</i>	+	3	3.2	3	2	66.7	0
O26:H-	Stx1	<i>stx1a</i>	+	3	3.2	3	1	33.3	0
	Stx2	<i>stx2a</i>	+	1	1.1	1	1	100.0	0
O111:H-	Stx1	<i>stx1a</i>	+	1	1.1	1	0	0.0	0
	Stx1&2	<i>stx1a+stx2a</i>	+	1	1.1	1	1	100.0	0
O103:H2	Stx1	<i>stx1a</i>	+	5	5.3	4	0	0.0	1
O103:H-	Stx1	<i>stx1a</i>	+	2	2.1	1	1	100.0	1
O5:H-	Stx1&2	<i>stx1c+stx2b</i>	-	1	1.1	0	0	-	1
O8:H-	Stx2	<i>stx2e</i>	-	1	1.1	0	0	-	1
O63:H-	Stx2	<i>stx2f</i>	+	1	1.1	0	0	-	1
O128:H2	Stx1&2	<i>stx1c+stx2b</i>	-	1	1.1	0	0	-	1
O145:H-	Stx2	<i>stx2a</i>	+	1	1.1	1	1	100.0	0
O148:H18	Stx2	<i>stx2g</i>	-	1	1.1	1	0	0.0	0
O159:H19	Stx2	<i>stx2a</i>	-	1	1.1	0	0	-	1
OgN6:H19	Stx2	<i>stx2a</i>	-	2	2.0	1	1	100.0	1
計				94		72	38	52.8	22

* 重症者：血便を呈した有症者とした。

ヒト由来EHEC株の血清型、志賀毒素 (以下「Stx」という。) 型、*stx*サブタイプ及び*eae*の有無並びに患者の症状を表1に示した。O血清群別ではO157が69株 (73.4 %) と最も多く、次いでO26及びO103が各7株 (各7.4 %), O111及びOgN6が各2株 (各2.1 %), O5, O8, O63, O128, O145, O148及びO159が各1株 (各1.1 %) であった。Stx1型のサブタイプは、17株全てが*stx1a*であった。Stx2型のサブタイプは、41株のうち*stx2a* + *stx2c*が21株、*stx2a*が12株、*stx2c*が5株、*stx2e*, *stx2f*及び*stx2g*がいずれも1株であった。Stx1&2型のサブタイプは、36株のうち*stx1a* + *stx2a*が29株、*stx1a* + *stx2c*が5株、*stx1c* + *stx2b*が2株であった。*eae*は、全てのO157, O26, O111, O103, O63及びO145の計87株が保有しており、このうち70株 (80.5 %) が有症者由来株であった。*eae*非保有の7株における有症者由来株は2株 (28.6 %) 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性遺伝子であり、発症や重症化に関与すると考えられている⁴⁾。今回の調査でも、これまでの調査^{5)~7)}と同様、*eae*保有株における有症率は高く、病原性への関与が認められた。

EHEC感染症患者94名の内訳は、有症者が72名 (76.6 %), 無症状病原体保有者が22名 (23.4 %) であった。HUSを発症した者はいなかったが、血便を呈した者 (以下「重症者」という。) は38名で、有症者の52.8 %を占

めた。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、O157:H- (Stx2; $stx2a$)、O26:H- (Stx2; $stx2a$)、O111:H- (Stx1&2; $stx1a+stx2a$)、O103:H- (Stx1; $stx1a$)、O145:H- (Stx2; $stx2a$) 及び OgN6:H19 (Stx2; $stx2a$) がいずれも100 %、O157:H7 (Stx1&2; $stx1a+stx2a$) 及びO26:H11 (Stx1; $stx1a$) がいずれも66.7 %と高く、 $stx1a$ 及び $stx2a$ 保有株で重症者の割合が高くなった。これまでの調査^{5)・6)}で、 $stx2a$ 保有株は他のサブタイプと比較して、重症化との関連が高い傾向が示されているが、今回の調査でも同様であった。

表2 ヒト由来EHEC株の薬剤耐性 (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	69	22	O157:H7 (Stx2)	TC・CP・ST (21) , ABPC (1)
		1	O157:H- (Stx1&2)	CP (1)
O26	7	1	O26:H- (Stx1)	NA (1)
		1	O26:H- (Stx2)	TC・CP (1)
O111	2	0		
O103	7	3	O103:H2 (Stx1)	ABPC・TC (3)
O5	1	0		
O8	1	0		
O63	1	0		
O128	1	0		
O145	1	0		
O148	1	0		
O159	1	0		
OgN6	2	0		
計	94	28		

* 「TC・CP・ST」はTC、CP及びSTの3剤に、「TC・CP」はTC及びCPの2剤に、「ABPC・TC」はABPC及びTCの2剤にそれぞれ耐性を示すことを表す。

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、94株のうち28株 (29.8 %)であった。昨年 (令和4年) の薬剤耐性率は、38.0 %と高い傾向を示したが、令和5年は、例年どおり10~30 %の範囲内であった^{5)~7)}。O血清群別では、O157は23株、O26は2株、O103は3株が耐性を示し、薬剤はTCが25株で最も多く、次いでCPが23株、STが21株、ABPCが4株、NAが1株であった。FOM、KM及びフルオロキノロン系抗菌薬はEHEC感染症治療の第一選択薬とされ、臨床上極めて重要な抗菌薬であるが、これまでの調査でFOM及びKMに対する耐性株が検出されている^{6)~8)}。また、近年、EHECにおいても第三世代セファロsporin系抗菌薬やフルオロキノロン系抗菌薬が無効である基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (以下「ESBL」という。) 産生株の報告があり、本県でも過去に確認されている⁸⁾。ESBL

産生大腸菌は、年々増加傾向にあるとされ⁹⁾、ESBL産生遺伝子はプラスミドを介し菌種を超えて広がる危険性があることから、EHECの感染制御でも注意が必要である。今回の調査では薬剤感受性検査の結果から第一選択薬耐性株及びESBL産生株は確認されなかったが、今後も継続して調査を行い、これら耐性株の動向に注視することが必要と考える。

次に、O157、O26及びO111のEHEC事例44件 (O157:36件、O26:6件、O111:2件) について、MLVA法を用いた分子疫学解析の結果を表3に示した。グループ事例は10件 (O157:9件、O26:1件)、散发事例は34件 (O157:27件、O26:5件、O111:2件) で、グループ事例の内訳は、食中毒事例1件 (事例No.13)、集団感染事例1件 (事例No.20) 及び家族内事例8件であった。全てのグループ事例で菌株間のMLVA型又はMLVAcomplex (以下「MLVA型等」という。) が一致したことから、各事例とも同一由来株によるものと推察された。一方で、異なる事例間でMLVA型等が一致するクラスターが形成された。その内訳は、No.1~3のO26散发事例3件のクラスターI (MLVA型17m2110, MLVAcomplex23c201)、No.8~10のO157散发事例3件のクラスターII (MLVA型22m0444及び23m0494, MLVAcomplex23c062)、No.12~16のO157の散发事例3件、食中毒事例1件及び家族内事例1件のクラスターIII (MLVA型20m0148及び20m0185, MLVAcomplex23c011)、No.19及び20のO157の散发事例1件及び集団感染事例1件のクラスターIV (MLVA型22m0449, 23m0358, 23m0359及び23m0360, MLVAcomplex23c043 (23c043p含む)) 並びにNo.37~40のO157の家族内事例1件及び散发事例3件のクラスターV (MLVA型23m0447) であった。クラスターIII、IV及びVの事例には、管轄保健所が同一かつ発生日が近く、関連を疑う組み合わせが認められた。また、NESFDにより、全国のMLVA検出状況を確認したところ、本県と同一のMLVA型等が他県でも多数認められた (2024年2月26日時点)。その中でも、O157のMLVAcomplex23c011は、本県では食中毒事例 (事例No.13) を含む17株で構成される最大のクラスター (クラスターIII) が形成され、本県を含む12都道府県で検出されたことから、広域にわたる共通の感染源の存在 (diffuse outbreak) が疑われた。

現在実施している調査手法では、事例間や菌株間で同一のMLVA型等が認められたとしても関連性が解明できないことが多い。しかし、EHEC感染症の拡大防止や

表3 ヒト由来EHEC株事例のMLVA法による分子疫学解析結果

事例No.	発生月	事例	管轄 保健所	血清型	Stx型	患者数	MLVA型 (MLVAcomplex)	他県での 同一MLVA型 検出状況			
1	3月	散発事例	F	O26:H11	Stx1	1	17m2110	23c201	有	}	クラスターⅠ
2	3月	散発事例	A	O26:H11	Stx1	1	17m2110				
3	3月	散発事例	B	O26:H11	Stx1	1	17m2110				
4	4月	散発事例	C	O157:H7	Stx2	1	23m0037				
5	5月	散発事例	F	O157:H-	Stx1&2	1	23m0074	23c062	有	}	クラスターⅡ
6	5月	散発事例	C	O157:H-	Stx1&2	1	23m0075				
7	5～6月	家族内事例	F	O157:H-	Stx2	3	23m0076				
8	5月	散発事例	G	O157:H7	Stx2	1	22m0444				
9	6月	散発事例	F	O157:H7	Stx2	1	23m0494	23c011	有	}	クラスターⅢ
10	10月	散発事例	E	O157:H7	Stx2	1	23m0089				
11	6月	散発事例	C	O157:H7	Stx2	1	23m0089				
12	6月	散発事例	C	O157:H7	Stx2	1	20m0148				
13	6～7月	食中毒事例	C	O157:H7	Stx2	12	20m0148	23c043	有	}	クラスターⅣ
14	7月	散発事例	C	O157:H7	Stx2	1	20m0185				
15	7月	家族内事例	C	O157:H7	Stx2	2	20m0148				
16	10月	散発事例	C	O157:H7	Stx2	1	20m0148				
17	7月	散発事例	G	O157:H7	Stx1&2	1	23m0391	23c043p	有	}	クラスターⅣ
18	7月	散発事例	G	O157:H-	Stx1&2	1	23m0172				
19	8月	散発事例	H	O157:H7	Stx1&2	1	22m0449				
20	8月	集団感染事例	H	O157:H7	Stx1&2	12 1 1	23m0358 23m0359 23m0360				
21	8月	散発事例	F	O157:H7	Stx1&2	1	23m0357	23c072	有		
22	8月	家族内事例	F	O157:H7	Stx1&2	3	23m0361				
23	8月	散発事例	F	O157:H7	Stx1&2	1					
24	8月	散発事例	H	O26:H-	Stx2	1	23m2047				
25	9月	散発事例	C	O157:H7	Stx1&2	1	21m0035				
26	9月	散発事例	H	O157:H-	Stx1	1	22m0001	23c049	有		
27	9月	散発事例	C	O157:H-	Stx1	1	23m0405	23c064	有		
28	9月	散発事例	F	O157:H-	Stx1	1	22m0193		有		
29	9月	散発事例	H	O157:H-	Stx1&2	1	23m0452				
30	9月	家族内事例	G	O26:H-	Stx1	1 1	23m2067 23m2054	23c206	有		
31	9月	散発事例	C	O111:H-	Stx1	1	23m3037				
32	10月	家族内事例	H	O157:H7	Stx1&2	2	22m0093		有		
33	10月	散発事例	H	O157:H7	Stx1&2	1	23m0541				
34	10月	家族内事例	D	O157:H7	Stx1&2	2	20m0320		有		
35	10月	散発事例	F	O157:H-	Stx2	1	23m0173	23c021	有		
36	10月	散発事例	C	O111:H-	Stx1&2	1	22m3018		有		
37	10～11月	家族内事例	F	O157:H7	Stx2	2			有	}	クラスターⅤ
38	11月	散発事例	F	O157:H7	Stx2	1	23m0447				
39	11月	散発事例	F	O157:H7	Stx2	1					
40	11月	散発事例	F	O157:H7	Stx2	1					
41	11月	散発事例	C	O26:H-	Stx1	1	23m2087				
42	12月	散発事例	F	O157:H7	Stx2	1	23m0637				
43	12月	散発事例	C	O157:H7	Stx2	1	23m0363	23c055	有		
44	12月	家族内事例	H	O157:H7	Stx1&2	2	23m0636				

感染予防のためには、MLVA法による分子疫学解析結果等を保健所等関係機関へ還元し、事例間の関連性等の疫学調査のサポートを継続することで、少しでも多くの感染源や感染経路の究明につなげることが重要であると考ええる。

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御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) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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, 2009
- 5) 岡田達郎, 河合央博, 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 (令和3年度), 岡山県環境保健センター年報, 46, 43-48, 2022
- 6) 岡田達郎, 梶原知博, 河合央博 : 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4年度), 岡山県環境保健センター年報, 47, 25-29, 2023
- 7) 岡田達郎, 河合央博, 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 (令和2年度), 岡山県環境保健センター年報, 45, 29-34, 2021
- 8) 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
- 9) 藤谷好弘 : 近年問題になっている新興・再興感染症・One Healthとしての感染症 近年問題となっている耐性菌感染症, 北海道医報, 1262, 22-25, 2023