

【調査研究】

志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査（平成30年度） Epidemiological Investigation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (FY2018)

森本晃司, 仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明（細菌科）

Koji Morimoto, Atsushi Naka, Hisahiro Kawai, Hiroshi Nakajima, Hideaki Kariya (Bacteriology Section)

要 旨

岡山県内で発生する志賀毒素産生性大腸菌（以下「STEC」という。）感染症の感染源及び感染経路の究明、また発生予防対策及び感染拡大防止対策の一助とすることを目的として、平成30年度にヒトから分離されたSTEC菌株を疫学情報とともに収集し、性状解析を実施した。その結果、ヒト由来株70株のうち、O血清群（以下「O」という。）157が34株（48.6%）、O26が28株（40.0%）であり、例年よりもO26株の検出率が高かった。反復配列多型解析法によるクラスター解析では、41株が14種類のクラスターに分類された。また、薬剤感受性試験では、STEC感染症治療の第一選択薬の一つであるホスホマイシンに対する耐性株が3株確認され、1株からホスホマイシン不活化酵素が検出されたが、他の2株は別の耐性機構が疑われた。

[キーワード：志賀毒素産生性大腸菌，疫学調査，反復配列多型解析法，パルスフィールドゲル電気泳動法，薬剤耐性]

[Key words : shiga toxin-producing *Escherichia coli*, epidemiological investigation, multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed field gel electrophoresis, drug-resistance]

1 はじめに

志賀毒素産生大腸菌（以下「STEC」という。）感染症は、時に生命を脅かす重篤な症状に至る場合があり、また多くの自治体に渡る広域的な感染拡大を示すこともあるなど、保健衛生上注目すべき感染症である。例年、全国的に多くの患者が報告されており、県内でも毎年約70件程度の散発事例が発生している。しかしながら、感染源や感染経路の特定が困難なため、効果的な感染予防や拡大防止対策を講じることが難しい現状にある。そこで、当センターではこれらの対策の一助とすることを目的として、県内で発生したSTEC感染症について、分離菌株の性状を詳細に解析し、疫学情報を加えたデータベースを構築している。これまでも反復配列多型解析法¹⁾ (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, 以下「MLVA法」という。)及びIS-printing system (以下「IS法」という。)によるDNA解析結果や薬剤耐性試験結果の蓄積を行ってきたが^{2)~4)}、今年度はパルスフィールドゲル電気泳動法（以下「PFGE法」という。）による解析結果も一部の株で追加し、データベースの更なる充実化を図ったので報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び疫学情報

県内の保健所、医療機関、検査機関等でSTEC感染者から分離されたヒト由来株70株を対象とした。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（デンカ生研）を用いて血清型別試験を実施し、O血清群（以下「O」という。）及びH血清型（以下「H」という。）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、井口らの報告した方法⁵⁾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らの報告した方法⁶⁾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 MLVA法、PFGE法及びIS法によるDNA型別

O26、O111及びO157株のDNA型別については、MLVA法による解析（以下「MLVA型」という。）を実施した。

他の株については、PFGE法による解析を国立感染症研究所に依頼した。また、一部の O26株については、当センターでPFGE法による解析を実施した。制限酵素は *Xba* I を使用し、マーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812株を用いた。

O157株については、更にIS法によってDNA型（以下「IS型」という。）を決定した。PCR法による目的遺伝子増幅後、まずは2種類のプライマーセット（1st set primer及び2nd set primer）について、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」として数値化した。次に、各プライマーセットについて、この数値を高分子量側から並べ、3バンド毎に「1」、「2」、「4」の係数を順に乘じた。最後に、1st set primerから2nd set primerの順に、3バンド毎の加算値を並べてIS型（12桁の文字列）とし、菌株間の解析を実施した。

2.2.5 ヒト由来STECのクラスター解析

MLVA型が一致したものを同一クラスターとして分類した。なお、リピート数が1遺伝子座で異なる single locus variant等、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。）が一致した場合も同一クラスターに分類した。また、O157株についてはIS型、O26株の一部はPFGE法の結果を加えて解析した。

2.2.6 薬剤感受性試験

センシ・ディスク（日本バクトン・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）、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。

2.2.7 ホスホマイシン不活化酵素の検出

薬剤感受性試験の結果、FOMに耐性を示した菌株については、Nakamuraらの方法⁷⁾に準拠し、ホスホマイシン不活化酵素（以下「GST」という。）の阻害剤であるホスホノギ酸を含有するディスクによるGST産生試験を実施

した。

3 結果及び考察

ヒト由来STECの月別検出状況を表1に示した。ヒト由来STECの検出数は、8月が最も多く13株（18.6%）であったが、6月から11月にかけて平均10.2株とあまり大きな増減は認められなかった。

ヒト由来STECの血清型、志賀毒素（以下「Stx」という。）型、*stx*サブタイプ、*eae*の有無及び感染者の症状を表2に示した。ヒト由来STECは、O157が34株（48.6%）、O26が28株（40.0%）と、例年と同様にこの2つの型が多く、全体の88.6%を占めた。特にO26は、例年よりも高い検出数及び検出率であった^{2)~4)}。これら以外の型では、O111が3株、O115、O137及びO174がそれぞれ1株、またO型別不能（以下「OUT」とする。）が2株検出された。Stx1型の32株は、全て*stx*サブタイプ*stx1a*であった。Stx2型の5株は、*stx2a*、*stx2b*、*stx2c*、*stx2d*及び*stx2a* + *stx2c*がそれぞれ1株であり、Stx1、2型の33株は、*stx1a* + *stx2a*が28株、*stx1a* + *stx2c*が5株であった。*eae*は66株（94.3%）が保有しており、保有していない4株は、全て無症状病原体保有者からの分離株であった。*eae*は、STEC感染症の発症及び重症化に関与するとされているが⁸⁾、本調査の結果は、*eae*保有株に感染した無症状病原体保有者が一部に認められたものの、おおむねこれに一致するものと考えられた。

今年度に菌株を収集したSTEC感染者数70名の内訳は、患者（有症者）が46名、無症状病原体保有者が24名であった。患者のうち、血便を呈した者（以下「重症者」という。）は28名であったが、溶血性尿毒症症候群を発症した者はいなかった。患者の60.9%が重症者であり、検出されたSTECは、O157:H7（Stx1、2、*stx1a* + *stx2a*）が12株（42.9%）と最も高く、次いでO26:H11（Stx1、*stx1a*）が7株（25.0%）であった。*stx1a*及び*stx2a*の両サブタイプ保有株は、全体的に有症者から検出される傾向が認められた。

ヒト由来STECのMLVA法等によるクラスター解析結果を表3に示した。STEC70株のうち41株が14種類（A～N）のクラスターに分類された。家族内感染や食中毒等、菌株間に疫学的関連性があるグループ事例は13件（グループ事例①～⑬）であった。O157株によるグループ事例5

表1 ヒト由来株の月別検出状況

月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
株数	3	0	12	9	13	7	9	11	2	0	1	3	70
%	4.3	0	17.1	12.9	18.6	10.0	12.9	15.7	2.9	0	1.4	4.3	

件（事例①，③，④，⑤及び⑥）ではMLVA型及びIS型が、O26株によるグループ事例5件（事例⑦，⑧，⑨，⑩及び⑪）及びO111株によるグループ事例1件（事例⑬）ではMLVA型が、各事例内の菌株間でそれぞれ完全に一致した。また、グループ事例②では、MLVA型は一致しなかったが、MLVAコンプレックス及びIS型が一致した。一般的に、疫学的関連性が強い場合、MLVAコンプレックスの一致は、菌株間に密接な関連性を有するものとして解釈される⁹⁾。グループ事例⑫については5株中1株のみがMLVA型及びMLVAコンプレックスが異なっていた。しかしながら、MLVAコンプレックスが「18c220」のサブコンプレックスである「18c220p」であったこと、また家族内感染を疑う事例であったことから、同一由来株又は近縁株であると考えられた。そのため、その株も同一クラスターに分類した。クラスターJ及びKでは、異なる事例間で同一のMLVA型又はMLVAコンプレックスとなった。特にクラスターJからは、グループ事例⑨及び⑩を含む9菌株が検出され、MLVA型及びPFGE型が一致した。

ヒト由来STECの薬剤感受性試験結果を表4に示した。15種類の薬剤のうちいずれかの薬剤に対して耐性を示し

た菌株が、70株中12株（17.1%）確認され、平成29年度（10.4%）と比較して高い検出率となった。このうち、O157は8株、O26は2株、O115及びOUTは各1株であった。昨年度はCTXに耐性を有するESBL産生O26が検出されたが⁴⁾、今年度は検出されなかった。他方、今年度はO157:H7（Stx2）1株及びO26:H11（Stx1）2株でFOM耐性が確認された。FOMは、NFLX、KM及びニューキノロン系抗菌薬とともにSTEC感染症治療の第一選択薬の一つとされ¹⁰⁾、臨床で極めて重要な抗菌薬である。そこで、FOM耐性の3株について、FOM不活化酵素であるGSTの産生試験を実施したところ、O26:H11（Stx1）の1株のみが陽性となった。このことから、他の2株については、別の機構による耐性を持つものと考えられる¹¹⁾。FOMをはじめとする第一選択薬に対する耐性菌は、STEC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う予定である。

広域的な食中毒事案の早期探知には、自治体、保健所等における詳細な病原体情報の共有が不可欠となっている。そのため、当センターでは、収集したSTECについて、DNA型、血清型、薬剤耐性等の菌株性状と疫学情報を併

表2 ヒト由来STECの性状及び感染者の症状

血清型	Stx型	stx サブタイプ	eae	株数(%)	患者数 (有症者 数)	重症者数		無症状 病原体 保有者数
						HUS*+血便	血便	
O26:H11	Stx1	stx1a	+	25(35.7)	16	0	7	9
	Stx1,2	stx1a+stx2a	+	3(4.3)	1	0	1	2
O111:H-	Stx1	stx1a	+	1(1.4)	0	0	0	1
	Stx1,2	stx1a+stx2a	+	2(2.9)	1	0	1	1
O115:H10	Stx1	stx1a	-	1(1.4)	0	0	0	1
O137:H41	Stx1	stx1a	+	1(1.4)	1	0	0	0
O157:H7	Stx1	stx1a	+	3(4.3)	2	0	2	1
	Stx2	stx2c	+	1(1.4)	1	0	1	0
	Stx1,2	stx1a+stx2a	+	23(32.9)	18	0	12	5
O157:H-	Stx1	stx1a	+	1(1.4)	1	0	0	0
	Stx2	stx2a+stx2c	+	1(1.4)	1	0	1	0
	Stx1,2	stx1a+stx2c	+	5(7.1)	4	0	3	1
O174:H21	Stx2	stx2d	-	1(1.4)	0	0	0	1
OUT:H25	Stx2	stx2a	-	1(1.4)	0	0	0	1
OUT:H45	Stx2	stx2b	-	1(1.4)	0	0	0	1
計				70	46	0	28	24

* 溶血性尿毒症症候群

せた菌株データベースの構築を進めている。今後は、食品衛生部門及び感染症部門との情報共有化をはじめとし

た網羅的な疫学情報を収集できる体制の構築が必要と考える。

表3 ヒト由来STECのクラスター解析結果

クラスター	血清型 (Stx型)	菌株No.	事例種	MLVA型	MLVA コンプレックス	IS型	PFGE型
A	0157:H7 (Stx1,2)	1	グループ事例①	16m0039	18c016	717557611657	
		2					
B	0157:H7 (Stx1,2)	3	散発事例	17m0258		317575611657	
		4	散発事例				
C	0157:H7 (Stx1,2)	5	グループ事例②	18m0080	18c015	717577211657	
		6		18m0137			
D	0157:H7 (Stx1,2)	7	グループ事例③	18m0274		317577611657	
		8					
E	0157:H7 (Stx1,2)	9	グループ事例④	18m0451	18c051	317577611657	
		10					
F	0157:H7 (Stx1,2)	11	グループ事例⑤	18m0530		317577611657	
		12					
G	0157:H7 (Stx2)	13	グループ事例⑥	13m0285	18c008	305457211442	
		14					
H	026:H11 (Stx1)	15	グループ事例⑦	16m2062			
		16					
		17					
I	026:H11 (Stx1,2)	18	グループ事例⑧	18m2013			
		19					
		20					
J	026:H11 (Stx1)	21	グループ事例⑨	18m2024			同一バンドパターン
		22					
		23	グループ事例⑩				
		24					
		25	散発事例				
		26	散発事例				
		27	散発事例				
		28	散発事例				
29	散発事例						
K	026:H11 (Stx1)	30	散発事例	18m2051	18c210		
		31	散発事例	18m2064			
L	026:H11 (Stx1)	32	グループ事例⑪	18m2089			
		33					
M	026:H11 (Stx1)	34	グループ事例⑫	18m2113	18c220		
		35					
		36					
		37		18m2153	18c220p		
		38					
39							
N	0111:H- (Stx1,2)	40	グループ事例⑬	18m3045			
		41					

表4 ヒト由来STECの薬剤感受性試験結果 (O血清群別)

O血清型	株数	耐性株数	血清型 (Stx型)	薬剤耐性パターン (株数)
0157	34	8	0157:H- (Stx1)	CP (1)
			0157:H- (Stx1, 2)	ABPC・TC・ST (1)
			0157:H7 (Stx1, 2)	ABPC (2)
			0157:H7 (Stx1, 2)	CP (2)
			0157:H7 (Stx1, 2)	TC・ST (1)
			0157:H7 (Stx2)	ABPC・FOM (1)
026	28	2	026:H11 (Stx1)	FOM (2)
0115	1	1	0115:H10 (Stx1)	ABPC・KM・TC・ST (1)
OUT	2	1	OUT:H45 (Stx2)	TC・NA (1)
0111	3	0		
0137	1	0		
0174	1	0		
計	70	12		

謝 辞

本調査の実施に際して、MLVA型別等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、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感謝いたします。

文 献

- Izumiya, H., Yingxin, P., 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
- 河合央博, 大島律子, 檀上博子, 中嶋 洋, 井上 勝: 感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起炎菌の調査 (平成27年度), 岡山県環境保健センター年報, 40, 51-56, 2016
- 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
- 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
- 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
- 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, 2951-2963, 2012
- Nakamura, G., Wachino, J., Sato, N., Kimura, K., Yamada, K. et al. : Practical Agar-Based Disk Potention Test for Detection of Fosfomycin-Nonsusceptible *Escherichia coli* Clinical Isolates Producing Glutathione S-Transferases, *J. Clin. Microbiol.*, 52, 3175-3179, 2014
- 仲西寿男, 丸山 務監修: 食品由来感染症と食品微生物, 281-296, 中央法規出版, 東京, 2009
- 泉谷秀昌: 腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について, *獣医公衆衛生研究*, 20-2, 6-11, 2018
- 厚生労働省: 一次, 二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (O157等) 感染症治療の手引き改訂版 (平成9年8月),

<https://www.mhlw.go.jp/www1/houdou/0908/h0821-1.html> (2019.3.29 アクセス)

- 11) 小原康治, 橋本 一: 臨床分離株を中心としたホスホマイシンの耐性機序, *Jpn. J. Antibio.*, 49, 533-543, 1996