

山口県における平成 26 年度の腸管出血性大腸菌感染症の発生状況 及び分離株の細菌学的・分子疫学的調査成績

山口県環境保健センター

亀山 光博, 矢端 順子*, 尾羽根 紀子, 大塚 仁, 野村 恭晴

*現 山口県周南健康福祉センター

Bacteriological and Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection, from April 2014 to March 2015 in Yamaguchi Prefecture

Mitsuhiro KAMEYAMA, Junko YABATA, Noriko OBANE, Hitoshi OTSUKA and Yasuharu NOMURA
Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

はじめに

腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)に規定される三類感染症であり、全数届出疾患となっている。平成 26 年(2014 年)の全国の届出総数は 4,153 例と、2009 年以降で最多となった¹⁾。

本報告では、山口県内における発生動向を把握することを目的とし、平成 26 年度の EHEC 感染症の発生状況及び分離菌株の性状を解析した。また、Multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA), IS-printing 法, パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による分子疫学的解析を行い、疫学的関連性を踏まえて分析・検討を加えた。

対象及び方法

1 供試菌株及び EHEC 感染症の発生状況

供試菌株は、平成 26 年度に EHEC 感染症の感染者 56 名から分離された株とした。

発生状況は、供試菌株の対象者について、管轄の各環境保健所等(山口環境保健所と防府支所については別々に集計)の実施した積極的疫学調査の結果及び菌株とともに提出された病原体検査依頼票などにより調査・分析した。

2 血清型別及びベロ毒素(VT)型別試験

血清型は、病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて、O 群及び H 抗原を検査して決定した。VT 型別検査は、CAYE broth で 37°C 1 夜振盪培養した培養液の遠

心上清を用いて、市販キット「VTEC-RPLA 生研(デンカ生研(株))」により実施した。

3 薬剤感受性試験

センシ・ディスク(日本 BD)を用いた Kirby-Bauer 法により実施した。供試薬剤は、アンピシリン(ABPC), セファロチン(CET), セフトキシム(CTX), ストレプトマイシン(SM), カナマイシン(KM), ゲンタマイシン(GM), テトラサイクリン(TC), クロラムフェニコール(CP), ナリジクス酸(NA), シプロフロキサシン(CPFX), ホスホマイシン(FOM)およびスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)の計 12 種類を用いた。

4 分子疫学的解析

分離株のうち、血清群 O157 については MLVA 及び IS-printing 法, 血清群 O26 については MLVA と PFGE 法による解析を実施した。

(1) DNA 抽出

菌株をミュラーヒントン寒天培地(OXOID)上で純培養後、市販キット「QIAamp DNA blood mini kit (キアゲン)」を用いて DNA を抽出した。

(2) MLVA

Izumiya, H. et al.²⁾の方法に従い、locus O157-10 を除く計 17 領域について解析を行った(O157-3W, O157-9M, O157-17Z, O157-19L, O157-25J, O157-34Y, O157-36AA, O157-37V, EHC-1Q, EHC-2C, EHC-5S, EHC-6U, EHC157-12N, EH26-7D, EH111-8O, EH111-11T, EH111-14BB). QIAGEN multiplex PCR plus kit (QI

表1 平成26年度に発生したEHEC感染症の概要

事例 No.	発生 時期	疫学的 関連性	管轄 保健所	感染者数			血清型(VT型)
				患者	保菌者	計	
血清群O157							
OB1	6月	家族事例	山口	2	0	2	O157:H7 (VT1&2)
OB2	8月	不明*	周南	2	0	2	O157:H7 (VT1&2)
OB3	9月	家族事例	岩国	3	0	3	O157:H7 (VT2)
S1	6月	散発	周南	1	0	1	O157:H7 (VT1&2)
S2	7月	散発	下関	1	0	1	O157:H7 (VT2)
S3	7月	散発	岩国	1	0	1	O157:H7 (VT1&2)
S4	8月	散発	下関	1	0	1	O157:H7 (VT1&2)
S5	10月	散発	防府	1	0	1	O157:H7 (VT2)
S6	10月	散発	山口	1	0	1	O157:H7 (VT1&2)
S7	11月	散発	周南	1	0	1	O157:H7 (VT1&2)
血清群O26							
OB4	8-9月	保育所	宇部	3	1	4	O26:H11 (VT1)
OB5	9-10月	家族事例	防府	1	1	2	O26:H11 (VT1)
OB6	10-11月	託児施設	岩国	5	3	8	O26:H11 (VT1)
OB7	11-12月	保育所	萩	6	14	20	O26:H11 (VT1)
OB8	11月	家族事例	下関	2	0	2	O26:H11 (VT1)
S8	8月	散発	周南	1	0	1	O26:H11 (VT1)
その他のO血清群							
OB9	9月	老人保健施設	山口	2	0	2	O121:H19 (VT2)
S9	8月	散発	宇部	1	0	1	O145:NM (VT1&2)

* 同一飲食店での喫食歴あり

表2 薬剤感受性試験結果

O血清群	供試 株数	耐性株数 (%)	耐性パターン (株数)
O26	37	7 (18.9)	ABPC-SM (6) ABPC-CET-CTX (1)
O157	14	6 (42.9)	ABPC-TC (2) CP (4)
O121	2	0	
O145	1	0	
計	54	13 (24.1)	

AGEN)を用いた PCR 反応後, 3500 Genetic Analyzer および Gene Mapper software ver.4.1 (Applied Biosystems)を使用してフラグメント解析を実施した. Fragment size marker は, GeneScan 600 LIZ size standard ver. 2.0 (Applied biosystems)を用いた. なお, フラグメント解析でピークが認められず, かつアガロースゲル電気泳動でバンドの増幅のなかった locus については「-2」と表記した.

(3) PFGE 法

既報³⁾に従い実施した. 制限酵素は *Xba*I (Roche) を用い, 泳動装置は CHEF-Mapper (Bio-Rad) を使用した. 得られた PFGE パターンは BioNumerics

ver. 7.1 (Applied Maths)により解析し, UPGMA 法により dendrogram を作成した。

(4) IS-printing 法

O157 IS-printing system (Toyobo)を用いて実施した。解析は, 1st set, 2nd set とともに陽性コントロールに含まれる 18 本のバンドの増幅を調べ, 増幅された場合は 1, されない場合は 0 と表記して得られた 18 桁の数字の列を, 3 つ区切りの 6 グループに分け, 各グループの 3 つの数字のうち, 1 の数字には左から順に 1, 2, 4 の数字を付与し, さらにそれを合計したものを順番に並べた 6 桁の数値コードをプロファイルとした。

結果

1 EHEC 感染症の発生状況

県内の平成 26 年度の届出数は 59 例であった。これらの事例から分離され, 当センターに菌株が搬入された EHEC 感染者数は 56 例で, このうち 2 例は同一人による再感染であったため, この 2 例を除いた 54 例について集計した(表 1)。

(1) 月別発生状況

最も発生の多かった月は 12 月の 14 例で, 次いで 11 月の 11 例, 10 月の 9 例であった。

(2) 保健所別発生状況

最も発生が多かったのは, 萩の 20 例(37%)で, 次いで岩国の 12 例(22.2%), 周南と山口, 宇部の各 5 例(9.3%), 下関の 4 例(7.4%)及び防府の 3 例(5.6%)であった。

(3) 性・年齢群別発生状況

性別では, 男性が 25 例(46.3%), 女性が 29 例(53.7%)であった。年齢群別では, 0~9 歳が最も多く 34 例(63%)で, 次いで 30~39 歳の 6 例(11.1%), 20~29 歳の 5 例(9.3%)で, その他の年齢群はそれぞれ 3 例以下であった。

(4) 分離株の血清型及び VT 型

分離株の血清型は, O26:H11 が 37 例, O157:H7/NM が 14 例, O121:H19 が 2 例, O145:NM が 1 例であった。VT 型は, O26:H11 はすべて VT1 型であり, 血清群 O157 計 14 株のうち, VT2 型が 5 例, VT1&2 型が 9 例であった。また, O121:H19 は 2 株とも VT2 型, O145:NM は VT1&2 型であった。

(5) 症状発現状況

54 例のうち, 有症者は 35 例(64.8%)であった。有症者に対する各症状の割合は, 下痢が 27 例(77.1%), 腹痛が 23 例(65.7%), 血便が 13 例(37.1%), 発熱が

10 例(28.6%), 軟便が 5 例(14.3%), 嘔吐が 4 例(11.4%)及び嘔気が 2 例(5.7%)であった。

(6) 各事例の概要

表 1 に示すとおり, 平成 26 年度は, 家族内感染事例を含む集団感染事例が 9 例(OB1~OB9), 散发事例が 9 例(S1~S9)認められた。集団感染事例の内訳は, 血清群 O157 によるものが 3 例, O26 によるものが 5 例及び O121 によるものが 1 例であった。保育所あるいは託児施設での集団事例が 3 例あり, いずれも血清群 O26 によるものであった。

2 薬剤感受性試験結果

54 株のうち, 13 株(24.1%)が供試した 1 剤以上に耐性を示した(表 2)。耐性を示した株は血清群 O26(7 株)及び O157(6 株)のみであり, O26 の 6 株は ABPC と SM に, 別の 1 株は ABPC, CET, CTX の 3 剤に耐性を示した。また O157 の 2 株は ABPC と TC に, 別の 4 株は CP に耐性を示した。このうち, CTX に耐性を示した O26 の 1 株は感染者 8 名の集団事例(OB6)由来株であり, 他の 7 株はすべて感受性であった。

3 血清群 O157 及び O26 の分子疫学的解析結果

(1) 血清群 O157

IS-printing 法及び MLVA による解析結果を表 3 に示す。血清群 O157 14 株は, IS-printing 法で 7 パターン(IS-1~7), MLVA で 8 パターン(ML-1, 2, 3a, 3b, 4~7)に型別された。このうち, 集団 1 事例(OB1)及び散发 2 事例(S1, S3)由来の計 4 株は, IS パターン, MLVA パターンともに一致した(IS-1 及び ML-1)。また別の散发 2 事例(S4, S6)由来 2 株の IS パターン, MLVA パターンが一致した(IS-5 及び ML-5)。なお, 集団 1 事例(OB3)由来 3 株について, IS パターンは一致したが, MLVA では 2 株は一致(ML-3b), 1 株は locus EH111-80 でリピート数が異なっていた(ML-3a)。

(2) 血清群 O26

MLVA による解析結果を表 4 に, PFGE パターンに基づき作成した dendrogram を図 1 に示す。

血清群 26 は, MLVA で 11 パターン(ML26-1, ML26-2a~2c, ML26-3a~3c, ML26-4a~4c, ML26-5), PFGE で 6 パターン(P1~P6)に型別された。集団 5 事例のうち, OB4(4 株)と OB8(2 株)は, それぞれの事例で MLVA 及び PFGE パターンは一致した。OB5(2 株)と OB7(20 株)では, それぞれの事例で

表3 血清群O157のISパターン及びMLVAパターン

事例 No.	株数	ISパターン			MLVAパターン														MLVA type			
		1st	2nd	IS type	O157-34Y	EHC-1Q	EHC-2C	O157-9M	EHC-5S	O157-3W	O157-25J	EH111-8O	EH157-12N	EH111-14BB	EH111-11T	O157-17Z	O157-36AA	O157-19L		EHC-6U	O157-37V	EH26-7D
OB1	2	317475	611756	IS-1	13	6	4	11	-2	10	5	1	4	-2	2	10	6	7	12	11	-2	ML-1
OB2	2	517557	201657	IS-2	12	7	4	9	14	13	5	1	4	-2	2	6	4	6	16	9	-2	ML-2
OB3	1	305457	211642	IS-3	9	11	5	12	-2	11	5	1	6	-2	2	4	9	7	-2	6	-2	ML-3a
	2				9	11	5	12	-2	11	5	2	6	-2	2	4	9	7	-2	6	-2	ML-3b
S1	1	317475	611756	IS-1	13	6	4	11	-2	10	5	1	4	-2	2	10	6	7	12	11	-2	ML-1
S2	1	145047	301443	IS-4	5	8	7	11	-2	-2	6	1	1	-2	2	3	6	7	-2	7	-2	ML-4
S3	1	317475	611756	IS-1	13	6	4	11	-2	10	5	1	4	-2	2	10	6	7	12	11	-2	ML-1
S4	1	717557	611657	IS-5	12	5	4	12	-2	8	8	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2	ML-5
S5	1	215557	111043	IS-6	8	12	4	13	-2	14	3	1	7	-2	2	5	10	7	-2	7	-2	ML-6
S6	1	717557	611657	IS-5	12	5	4	12	-2	8	8	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2	ML-5
S7	1	215457	311656	IS-7	6	7	5	15	2	16	2	2	4	-2	2	12	4	7	-2	7	-2	ML-7

表4 血清群O26のMLVAパターン

事例 No.	株数	MLVAパターン														MLVA type	PFGE パターン			
		O157-34Y	EHC-1Q	EHC-2C	O157-9M	EHC-5S	O157-3W	O157-25J	EH111-8O	EH157-12N	EH111-14BB	EH111-11T	O157-17Z	O157-36AA	O157-19L			EHC-6U	O157-37V	EH26-7D
OB4	4	1	7	17	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	ML26-1	P3
OB5	1	1	8	13	10	8	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	ML26-2a	P2
	1	1	8	13	10	8	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	6	4	3	ML26-2b	P2
OB6	6	1	7	15	10	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	9	1	-2	ML26-3a	P4/P5
	1	1	7	15	10	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	10	1	-2	ML26-3b	P5
	1	1	7	15	10	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	12	7	-2	ML26-3c	P4
OB7	17	1	7	12	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	5	ML26-4a	P1
	2	1	7	12	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	14	5	5	ML26-4b	P1
	1	1	7	13	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	5	ML26-4c	P1
OB8	2	1	8	19	10	8	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	9	-2	3	ML26-2c	P2
S8	1	1	3	16	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	ML26-5	P6

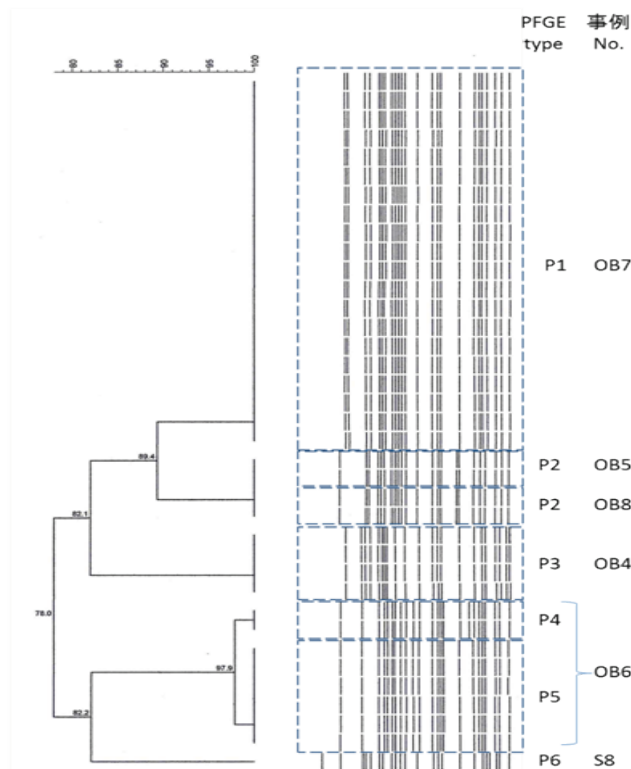


図1 血清群O26のPFGEパターンに基づき作成したデンドログラム

PFGE パターンは一致し、MLVA では 3-2 領域異なる株が見られた。また、OB6 由来 8 株は、PFGE 法で 2 パターン(P4, P5)、MLVA で 3 パターン(ML26-3a~3c)認められた。なお、OB5 と OB8 由来の 4 株については、PFGE パターンは完全に一致し(P2)、MLVA では OB8 由来 2 株のパターン(ML26-2c)は、OB5 由来 1 株(ML26-2a)と 2 領域異なるのみであった。

考察

本県における平成 26 年度の EHEC 感染症の特徴は、血清群 O26 による集団発生が続発したこと、及び血清群 O157 による感染症が例年に比べ少なかったことが挙げられる。

山口県内の EHEC 感染症の発生は、例年 8 月を中心とした夏季に多い^{4, 5)}。しかし、平成 26 年度は、血清群 O26 による集団発生の続発した秋から冬、特に 12 月に最も多く発生しており、例年とは異なる傾向を示した。

感染者の年齢群別では、0~9 歳が 63%と全体の過半数を占めており、これは例年と同様かつ全国と同様の傾向を示した^{1, 4, 5)}。県内及び全国においても、保育所、託児所等での集団発生は毎年発生している^{6, 7)}。乳幼児は、免疫力の獲得が十分でないことから

易感染状態にあるうえに、保育所等で集団生活をしている場合には、ヒト-ヒト感染を起こしやすいと考えられる。平成 26 年度には、保育所等での集団感染が 3 例発生しており、いずれも初発から終息までに 1 ヶ月あるいはそれ以上の期間を要している。施設内及び家族内でのヒト-ヒト感染により感染が拡大したものと考えられたことから、施設に対して衛生管理の徹底を強く指導する必要があると考えられた。

血清型別では、O26:H11 が約 7 割を占めており、O157:H7 が 98%を占めた昨年度⁴⁾とは大きく傾向が異なっていた。全国で 2014 年に分離された EHEC の血清群別では、O157 が 59%、O26 が 22%となっており¹⁾、全国とも異なる傾向を示した。集団発生を含めた O26 による事例が多発し、一方で、O157 の件数が 14 件と例年^{4, 5)}より少なかったことが影響している。

薬剤感受性試験の結果、O26:H11 による集団事例(OB6)の 1 株が第 3 世代セファロスポリンである CTX に耐性を示した。県内において、平成 22 年度以降に分離された EHEC の調査結果では、平成 25 年度に O157:H7 4 株で CTX 耐性株が認められており、いずれも CMY-2 AmpC β-ラクタマーゼ産生株であった⁸⁾。近年、EHEC においても基質特異性拡

張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)等産生株の報告があることから^{9,10)}、今後の動向を注視していくとともに、耐性遺伝子等の解析を進めていく必要がある。

O26の分子疫学的解析の結果、OB5とOB8の2事例についてはPFGEが一致し、MLVAも近似していることから、同一由来の可能性が高いと考えられた。しかしながら、他の事例のPFGE及びMLVAのパターンは、いずれも一致せず、平成26年度に県内で多発したO26は、同じ由来の株によるものではないと考えられた。O26が多発した原因は不明であるが、VT1のみを産生する菌株であることから、血便等の重篤な症状が出にくいいため、患者の発見が遅れ、感染拡大の一因となった可能性もある。

血清群O157については、3事例(OB1, S1, S2)由来4株と2事例(S4, S6)由来2株については、それぞれISパターン、MLVAパターンともに完全に一致したことから、疫学的関連は明らかになっていないものの、同一由来株による広域散発事例であった可能性が示唆された。今後、このような広域散発事例が疑われる事例を早期に探知するためにも、迅速に分子疫学解析結果を保健所等へ還元する体制を構築していく必要がある。

文献

- 1) IASR 36:73-74 (2015)
- 2) Izumiya H. et al. Microbiol. Immunol. 54:569-577. (2010)
- 3) 厚生労働科学研究補助金 新興・再興感染症研究事業「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」平成15～17年度総括・総合研究報告書
- 4) 矢端順子ほか. 山口県環境保健センター所報 56:45-49 (2015)
- 5) 矢端順子ほか. 山口県環境保健センター所報 55:51-55 (2014)
- 6) IASR.35, 134-135 (2013)
- 7) IASR.35, 124-125 (2014)
- 8) Kameyama M. et al. J. Infect. Chemother. 21:544-546. (2015)
- 9) 菊地孝司ほか. 感染症誌. 88:430-437. (2014)
- 10) Ishii Y. et al. J. Clin. Microbiol. 43:1072-1075. (2005)