

山口県における平成 25(2013)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
矢端順子, 亀山光博, 野村恭晴, 富永潔

Bacteriological and Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection, from April 2013 to March 2014 in Yamaguchi Prefecture

Junko YABATA, Mitsuhiro KAMEYAMA, Yasuharu NOMURA, Kiyoshi TOMINAGA
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 25(2013)年の全国の届出数は 4,046 例で、生肉や生レバーによる感染は減少したと考えられるものの、過去の届出数と比較しても特段減少傾向にはない¹⁾。そこで、県内における本感染症の発生動向を把握するため、平成 25 年度の山口県における EHEC 感染症の発生状況及び分離菌株の性状等を分析した。また、血清群 O157 については、IS-printing 法と MLVA 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 25 年度に、EHEC 感染症の感染者 42 名から分離された 43 株(1 株は同一人の再感染)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 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℃ 1 夜振盪培養した培養液の遠心上清を用いて、RPLA 法(デンカ生研)により実施した。

3 薬剤感受性試験

血清群 O157 42 株, O26 1 株の計 43 株について、センシ・ディスク(BD)を用いて 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 O157:H7 の分子疫学的解析

O157:H7 の菌株 42 株(再感染例の株を含む)について、以下のとおり実施した。

1) IS-printing 法

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 の数値を付与し、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。

2) MLVA 法

国立感染症研究所細菌第一部作成の MLVA プロトコル(2008 年 7 月現在)にしたがって、9 か所の locus (25,3,34,9,17,19,36,37,10)について解析を行った。Fragment 解析は、3500 Genetic Analyzer および Gene Mapper ver.4.1 [Applied Biosystems]を使用した。Fragment size marker は、GeneFlo 625 DNA Ladder(ROX Label)[コスモバイオ]を使用した。解析結果を検証するため、代表的な fragment について、Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit[Applied Biosystems]を用いて

シーケンスを実施し、各 locus のリピート数を確認した。なお、Flagment 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「null」と表記した。

結果

1 EHEC 感染症の発生状況

県内の平成 25 年度の届出数は、45 例と過去 3 年間の状況²⁾とほぼ同様で、集団感染事例も 2 例認められた。

これらの事例から分離され、当センターに菌株の搬入された EHEC の感染者数は 43 例で、このうち 1 例は、同一人による再感染であったため、この一例を除いた 42 例について集計した。

(1) 月別発生状況

月別の発生状況を図 1 に示す。最も発生の多かった月は 8 月の 18 例で、次いで 7 月の 11 例、9 月の 8 例と続き、5 月及び 6 月はそれぞれ 2 例、11 月に 1 例の発生があった。

(2) 保健所別発生状況

管轄保健所別の発生状況で最も多かったのは、宇部の 22 例(52.4%)で、次いで下関 11 例(26.2%)、周南 5 例(11.9%)、山口 4 例(9.5%)で、他の保健所管内での発生はなかった。

(3) 性・年齢群別発生状況

性・年齢群別発生状況を図 2 に示す。性別では、男性が 23 例(54.8%)、女性が 19 例(45.2%)であった。年齢群別では、0～9 歳が最も多く 22 例(52.4%)で、次いで、10～19 歳の 7 例(16.7%)で、その他の年齢群は、それぞれ 3 例以下であった。

(4) 血清型及び VT 型からみた分離菌株年度別推移

分離菌株の血清型は、O157:H7 が 41 例(97.6%)で、そのほかは O26:H11 が 1 例(2.3%)のみであった。VT 型は、O157:H7 のうち、VT1&2 型のものが 38 例、VT2 型が 3 例であった。O26 は、VT1 型であった。

(5) 症状発現状況

42 例の分離事例のうち、症状があったのは 29 例(69.0%)であった。有症状者に対する各症状の割合は、下痢が 29 例(100.0%)、血便が 18 例(62.1%)、腹痛が 14 例(48.3%)、発熱及び嘔気嘔吐がそれぞれ 7 例(24.1%)であった。また、2 名の患者(5 歳及び 3 歳)が、溶血性尿毒症症候群(HUS)を発症した。(複数の症状が認められた場合は各々 1 例として集計)。

(6) 集団感染事例及び感染者が 2 名以上の事例の概要

表 1 に示すように、集団感染事例は 2 事例、家族内の感染事例が 3 例あり、いずれも O157:H7(VT1&2)に

よるものであった。このうち、事例 1 のステーキ店を原因とするものは、系列店 2 店舗で発生したもので、同店で提供された成形加工された牛肉が感染源であった。事例 2 は、保育園の園児とその家族が感染し、一旦終息をした後に、新たに患者の届出があり、その後の検査で再感染を含む 4 名の保菌者の存在が判明した。

2 薬剤感受性試験結果

耐性パターンを表 2 に示す。このうち、事例 2 の集団発生事例の 18 株については、3 パターンの感受性結果が得られ、その内訳は、ABPC、CET、CTX の 3 剤耐性が 3 株、ABPC の 1 剤耐性が 2 株で、その他は 12 薬剤すべてに感受性(再感染の株を含む)であった。また、事例 4 の家族事例の 4 株については、1 株が ABPC、SM、TC、CP、ST の 5 剤耐性で、他の 3 株は SM、TC、CP の 3 剤耐性であった。事例 1、事例 3 及び事例 5 については、耐性株は認められなかった。散发事例株については、9 株のうち、4 株に耐性が認められ、ABPC、CET、CTX の 3 剤耐性が 1 株、ABPC、SM、ST の 3 剤耐性が 1 株、ST 耐性が 1 株及び SM 耐性が血清群 O26 の 1 株であった。

3 血清群 O157 の分子疫学的解析結果

(1) 集団感染事例及び感染者が 2 名以上の事例

表 3 に解析結果を示す。

事例 1 の 8 菌株の IS-printing 法の結果は一致しており、MLVA 法については、6 株と 2 株の 2 パターンに分かれたものの、locus3 が異なるのみであった。事例 2 についても、IS-printing 法では一致し、MLVA 法については、18 株のうち 15 株は同一パターンで、他の 3 株は、15 株のパターンとそれぞれ 1 locus 異なるのみであった。再感染事例の株は、両方の検査で一致した。

家族事例の 3 事例は、IS-printing 法及び MLVA 法とも一致した。

事例 3 については、IS-printing 法は、事例 2 と一致したものの、MLVA 法では主流のパターンと 1 locus しか一致しなかった。

(2) 散发事例

他と疫学的に関連のなかった 8 株の解析結果を表 4 に示す。9 月発生の宇部保健所管内の 1 株については、IS-Printing 法及び MLVA 法の解析結果が、事例 2 の主流パターンと一致した。

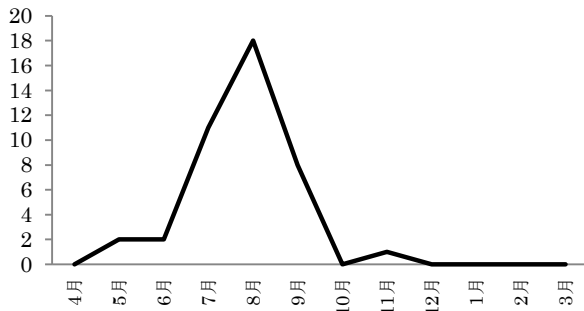


図1 EHECの月別分離数 平成25(2013)年度

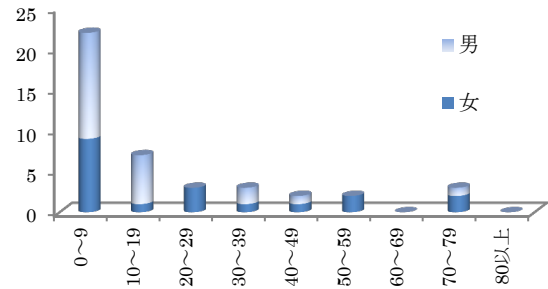


図2 EHECの性・年齢群別分離数
平成25(2013)年度

表 1 集団感染事例及び 2 名以上の感染者が認められた事例

事例番号	発生時期	管轄保健所	感染者数	疫学的関連性	血清型 (VT 型)
1	7 月	下関 宇部	8	ステーキ店	O157:H7 (VT1&2)
2	8-9 月	宇部	17 (1)	保育園	O157:H7 (VT1&2)
3	5 月	周南	2	家族事例	O157:H7 (VT1&2)
4	7-8 月	周南・山口	4	家族事例	O157:H7 (VT1&2)
5	8 月	下関	2	家族事例	O157:H7 (VT1&2)

() 再感染者別掲

表 2 薬剤感受性試験結果

血清型	検査数	耐性パターン	耐性株数
O157:H7	42	ABPC SM TC CP ST	1
		ABPC CET CTX	4
		ABPC SM ST	1
		SM TC CP	3
		ABPC	2
		ST	1
O26:H11	1	SM	1
計	43		13

表 3 集団感染事例及び家族感染事例の IS-printing 法と MLVA 法の結果

事例 NO	菌株数	IS-printing				MLVA						
		1 st	2nd	L25	L3	L34	L9	L17	L19	L36	L37	L10
1	6	717557	611657	5	11	9	8	10	6	11	7	18
	2			5	12	9	8	10	6	11	7	18
2	15	717577	611657	3	10	9	14	7	7	11	8	26
	1			3	10	9	14	7	7	11	9	26
	1			3	10	9	14	7	7	11	8	27
	1			3	11	9	14	7	7	11	8	26
3	2	717577	611657	5	13	11	7	7	6	12	11	21
4	4	116577	211757	5	9	10	3	7	6	6	7	42
5	2	613577	610646	4	12	9	19	7	4	13	6	22

表 4 散発事例の IS-printing 法と MLVA 法の結果

発 生 時 期	管 轄 保 健 所	血 清 型 (VT 型)	IS-printing				MLVA						
			1st	2nd	L25	L3	L34	L9	L17	L19	L36	L37	L10
6 月	山口	O157:H7 (VT2)	155047	343443	5	null	8	8	3	6	9	7	25
6 月	下関	O157:H7 (VT2)	145047	103443	4	null	7	10	3	5	7	7	22
7 月	山口	O157:H7 (VT1&2)	317477	611756	5	10	11	13	12	7	6	8	45
8 月	下関	O157:H7 (VT1&2)	317577	611756	5	11	9	12	8	6	6	8	33
9 月	下関	O157:H7 (VT2)	205457	611642	5	19	7	14	4	7	10	7	19
9 月	下関	O157:H7 (VT1&2)	713577	600657	5	12	10	6	6	6	5	7	24
9 月	宇部	O157:H7 (VT1&2)	717577	611657	3	10	9	14	7	7	11	8	26
9 月	宇部	O157:H7 (VT1&2)	155045	743447	4	4	7	10	3	6	7	6	25

考察

平成 25 年度の県内の EHEC 感染症の発生は、8 月を中心とした夏期に多く、例年と同様の傾向を示し²⁾、全国の傾向¹⁾とも同様であった。

保健所別にみると、感染者の最も多かったのは、宇部で、下関がこれに続いていた。これには各々において集団発生事例が認められたことが影響しているものと考えられた。しかしながら、過去 3 年間に於いても、この 2 保健所管内での発生が県内の事例の多くを占める傾向が認められており、平成 25 年度においても 8 割近くを占めたが、その原因を明らかにすることはできなかった。これを明らかにするためには、食品の流通実態調査を含めた、詳細な疫学調査を行う必要性が示唆された。

年齢群別には、0～9 歳が最も多く、全体の半分以上を占めており、これも例年と同様かつ全国と同様の傾向¹⁾を示した。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上に、保育所などで集団生活をしている場合は、ヒト-ヒト感染を起こしやすいと考えられる。2013 年度の全国における EHEC 感染症の発生状況の特徴として、保育所での集団発生の頻発が挙げられる¹⁾。また、保育所等の施設での発生では、おむつ交換場所などでの二次感染が問題となることも指摘されている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。県内でも、集団感染事例のひとつは、保育園での事例で、ヒト-ヒトの接触感染が主たる感染経路と考えられた。この事例は、8 月の初旬に初発患者の報告があり、その後最終的に終息するまでに、1 ヶ月程度を要した上に、園児の再感染も認められていることから、保育園内のおむつ交換場所など、ヒト-ヒト感染の危険が予測される場所の衛生管理を徹底す

る等、園内での感染防止対策を強力に指導する必要があると考える。また、この事例では、園児の家族等にも感染者がおり、家庭における感染防止についても同様に指導することが必要と考えられた。

もう一つの集団感染事例は、飲食店の提供した成形肉が原因となった食中毒であった。牛肉や牛の肝臓の生食による感染は、生食用食肉の規格基準の見直し(2011 年 10 月、告示 321 号)や牛の肝臓の生食用販売の禁止(2012 年 7 月、告示第 404 号)などにより、減少していると推察されるが、消費者の要望により、十分加熱されずに提供される牛肉による感染にも留意する必要がある。

血清型及び VT 型については、O26:H11 の 1 例を除けばすべて O157:H7 で、VT 型は VT1&2 のものが全体の 9 割を占めた。全国的にもこのタイプが多く¹⁾、この傾向は、過去数年間変化していない⁷⁾⁸⁾⁹⁾。ただし、県内の菌株では、平成 22 年度及び 23 年度については、VT2 型のみ産生する O157:H7 の割合の方が高く²⁾、平成 24 年度から全国と同様の傾向となった。

症状については、有症者 29 例のすべてに下痢が認められ、その他の症状としては、血便が 6 割程度、腹痛は 5 割弱に認められ、保育園での集団感染事例においては、5 歳と 3 歳の 2 名の患者が HUS を発症した。HUS 発症率が高いのは、0～9 歳と報告¹⁰⁾されており、特に注意が必要である。また、HUS の発症例では、血便や腹痛などの症状の出現率が高いことも報告されており¹⁰⁾、今後、原因菌について、高病原性との関連が示唆される遺伝系統¹¹⁾や、保有している病原因子との関連を検討する必要があると考えられた。

薬剤感受性試験の結果、事例 2 の一部の感染者の株及び散発事例の 1 株から、ABPC、CET 及び CTX に耐性の菌が検出された、県内の平成 22 年度～平成 24 年度の調査結果では、ABPC や CET に耐性の菌株は検出されていたものの、CTX に耐性の菌は検出されていなかった²⁾。EHEC においても、近年、ESBL 産生菌などの薬剤耐性菌の検出報告¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾があり、今後の動向を注視していく必要がある。

血清群 O157 の分子疫学的解析において、IS-printing 法を実施した結果、集団感染事例 1 事例、家族感染事例の 1 事例及び散発事例株 1 株の 3 事例で、同一プロファイルである 717577-611657 となった。このプロファイルの菌株は過去に県内で分離されている¹⁵⁾ほか、2011 年及び 2012 年に中四国地域の他県でも多数分離されており¹⁶⁾、比較的多いプロファイルタイプであると考えられた。

IS プロファイルの一致した 3 事例のうち 2 事例については、MLVA 法の結果で異なる由来の菌株であると判断された。ただ、保育園での集団感染事例と散発事例 1 株については、MLVA 法でも同じ遺伝子タイプに識別された。この散発事例については、発生時期も保育園の事例と近く、同一の感染源があった可能性が示唆された。

IS-printing 法は、簡便かつ迅速に結果を得られるという利点があり、集団感染を疑うような事例などで、疫学的な根拠のもとに、判断する場合には、非常に有効な解析方法であると考ええる。全国的にも、IS-printing 法を主体としたデータベースの構築体制¹⁷⁾が進んでおり、今後、広域散発事例などへの迅速な対応に向けて、体制整備を強化していく必要がある。また、MLVA 法の識別能は、従来から EHEC の遺伝子型別法として実施されているパルスフィールド電気泳動法と同等とも言われている¹⁸⁾。さらに、MLVA 法のデータは IS-printing 法と同様に、数値データで得られるため、データベース化しやすいという利点がある。MLVA 法を IS-printing 法と併用することにより、迅速かつ高い精度のデータベースシステムを構築出来ると考えられた。

文献

- 1) IASR. 35(5), 117-120(2014)
- 2) 矢端順子ほか:山口県環境保健センター所報. 55, 51～55(2013)
- 3) 酒井由美子ほか:IASR. 35(5), 123-124(2014)
- 4) 郡山洋一郎ほか:IASR. 35(5), 124-125(2014)

- 5) 中森愛ほか:IASR. 35(5), 126-127(2014)
- 6) 水田渉子:IASR. 35(5), 127-128(2014)
- 7) IASR. 34(5), 123-125(2013)
- 8) IASR. 33(5), 115-117(2012)
- 9) IASR. 32(5), 125-127(2011)
- 10) 齋藤剛仁ほか:IASR. 35(5), 131-132(2014)
- 11) Shannon D. Manning, et al. : Proc Natl Acad Sci USA 105(12), 4868-73(2008)
- 12) Yoshikazu Ishii, et al: J. Clin. Microbiol 43(3) 1072-1075(2005)
- 13) 近真理奈ほか:感染症学雑誌. 79, 161-168(2005)
- 14) 今野貴之ほか:IASR. 28(6), 166-167(2007)
- 15) 矢端順子ほか:山口県環境保健センター所報. 55, 56～61(2013)
- 16) 中嶋洋ほか:病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究(課題番号:H24-新興-一般-005)平成 24 年度総括・研究分担報告書. 101-128(2013)
- 17) 寺嶋淳ほか:病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究(課題番号:H24-新興-一般-005)平成 24 年度総括・研究分担報告書. 13-20(2013)
- 18) 石原朋子ほか:IASR. 35(5), 129-130(2013)