

【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（2019年度）
Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Okayama Prefecture (FY2019)

河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋, 狩屋英明

KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki

要 旨

岡山県内で発生する腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）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に、2019年度に県内で分離されたヒト由来EHEC株を収集し、疫学調査を行った。収集したヒト由来EHEC株56株のうち、O血清群では、O157が36株（64.3%）と最も多く、次いでO26及びO103がともに6株（10.7%）と続いた。反復配列多型解析法によるクラスター解析では11種類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たが、これらの共通の感染源や感染経路は解明できなかった。そのため、より多くの疫学情報を収集・共有化し、これらの情報を用いて分子疫学解析結果と併せた解析を行う体制の構築が課題と考えられた。

[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 investigation, multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA), drug resistance]

1 はじめに

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）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」で三類感染症に分類される全数把握対象疾患である。主な臨床症状として腹痛、下痢、血便が挙げられ、軽い症状や無症状で終わる場合もあるが、溶血性尿毒症症候群（以下「HUS」という。）や脳症などの重篤な疾患を併発し、さらには死に至る場合もある。EHEC感染症の全国における報告数は、感染症サーベイランスシステム（NESID）によると、2018年で3,854件と依然として多く、岡山県でも年間約70件程度の報告が続いており、未だ予断を許すことができない状況にある。EHEC感染症は感染源や感染経路の特定が困難なケースが多いが、これは事例の多くが散发事例であることが要因である。しかし、食品流通が発達した近年では、一見散发事例のように見えても、広域流通食品を感染源とした多くの自治体をまたぐ食中毒事例（diffuse outbreak（散在的集団発生））であることもあり、大きな問題となっている。当センターでは、EHEC感染症の感染源や感染経路の究明、集団事例やdiffuse outbreakの早期探知、さらには本感染症の効果的な感染予防や拡大防止対策を講じることを目的に、県内で発生したEHEC感染症の分離菌株を収集し、疫学調査を継続して実施している^{1)~3)}。

今回、2019年度の県内におけるEHEC感染症の発生状況及び分離株の性状解析、そして反復配列多型解析法⁴⁾（multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis）（以下「MLVA法」という。）による分子疫学解析の結果から、県内での本感染症の発生動向をとりまとめたので報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び疫学情報

保健所、医療機関、検査機関で県内のEHEC感染者から分離されたヒト由来EHEC株56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（デンカ生研）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 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。

2.2.5 MLVA 法による分子疫学解析

O26, O103, O111 及び O157 株の MLVA 法による分子疫学解析は国立感染症研究所に依頼し、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1遺伝子座でのみ互いに異なる single locus variant 等、関連性が推測される MLVA 型をまとめた様式 (以下「MLVA コンプレックス」という。) の提供を受けた。

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、MLVA 型が一致又は MLVA コンプレックスが一致した株を同一クラスターとして分類した。

3 結果及び考察

ヒト由来 EHEC 株の月別検出状況を表1に示した。2019年度のヒト由来 EHEC 株は6月が最も多く検出され15株 (26.8 %) で、次いで9月の8株 (14.3 %), 5月の

表1 ヒト由来 EHEC 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 | 0 | 7 | 15 | 5 | 4 | 8 | 2 | 6 | 3 | 4 | 2 | 0 | 56 |
| % | 0.0 | 12.5 | 26.8 | 8.9 | 7.1 | 14.3 | 3.6 | 10.7 | 5.4 | 7.1 | 3.6 | 0.0 | |

表2 ヒト由来 EHEC 株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 | 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 | + | 6 | 10.7 | 6 | 5 | 83.3 | 0 |
| | | stx2a+stx2c | + | 2 | 3.6 | 2 | 2 | 100.0 | 0 |
| | | stx2c | + | 4 | 7.1 | 0 | 0 | — | 4 |
| O157:H- | Stx1&2 | stx1a+stx2a | + | 16 | 28.6 | 12 | 9 | 75.0 | 4 |
| | | stx2a | + | 1 | 1.8 | 0 | 0 | — | 1 |
| | | stx2a+stx2c | + | 2 | 3.6 | 2 | 2 | 100.0 | 0 |
| O26:H11 | Stx1 | stx1a | + | 5 | 8.9 | 4 | 1 | 25.0 | 1 |
| O26:H- | Stx1 | stx1a | + | 1 | 1.8 | 0 | 0 | — | 1 |
| O103:H2 | Stx1 | stx1a | + | 2 | 3.6 | 0 | 0 | — | 2 |
| | Stx1&2 | stx1a+stx2a | + | 4 | 7.1 | 1 | 1 | 100.0 | 3 |
| O111:H- | Stx1 | stx1a | + | 3 | 5.4 | 3 | 2 | 66.7 | 0 |
| O8:H19 | Stx2 | stx2e | - | 1 | 1.8 | 0 | 0 | — | 1 |
| O28ab:H25 | Stx2 | stx2a | - | 1 | 1.8 | 0 | 0 | — | 1 |
| O115:H10 | Stx1 | stx1a | - | 1 | 1.8 | 0 | 0 | — | 1 |
| O130:H- | Stx1 | stx1a | - | 1 | 1.8 | 0 | 0 | — | 1 |
| OUT:H- | Stx1 | stx1a | - | 1 | 1.8 | 0 | 0 | — | 1 |
| 計 | | | | 56 | | 34 | 23 | | 22 |

* 重症者：HUS、急性腎不全、血便を呈した有症者とした。

(内訳：HUS+血便：1名、急性腎不全+血便：1名、血便：21名)

7株（12.5 %）の順で、梅雨の時期から夏季の一般的なEHEC感染症流行時期に多い傾向が見られた。

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、*eae*の有無及びEHEC感染者の症状を表2に示した。ヒト由来EHEC株の検出数についてO血清群別で見ると、O157が36株（64.3 %）と最も多く、次いでO26及びO103がともに6株（10.7 %）であった。O157の検出数は例年どおり多かったが、O26は多数検出された昨年以外の近年とおおむね同様であった（2018年度28株、2017年度5株、2016年度9株）。その他のO血清群は、O8、O28ab、O111、O115、O130、O血清群別不能（以下「OUT」という。）が検出された。血清型及びStx型の組み合わせでは、O157: H7 (Stx1 & 2) が最も多く16株（28.6 %）、以下、O157: H7 (Stx2) が12株（21.4 %）、O157: H- (Stx1 & 2) 及びO26: H11 (Stx1) が5株（8.9 %）、O103: H2 (Stx1 & 2) が4株（7.1 %）と続いた。*stx*サブタイプは、Stx1型では14株すべてが*stx1a*であった。Stx2型の17株は、*stx2a*が8株、*stx2a+2c*が4株、*stx2c*が4株、*stx2e*が1株であった。さらに、Stx1 & 2型の25株では*stx1a+stx2a*が20株、*stx1a+stx2c*が5株であった。*eae*は51株（91.1 %）が保有しており、このうち有症者から分離された株は34株で、*eae*保有株中で66.7 %と約7割程度を占めた。一方、*eae*を保有しない残り5株は有症者からの分離株はなく、すべて無症状病原体保有者からの分離株であった。

2019年度に菌株を収集したEHEC感染者56名の内訳は、有症者が34名、無症状病原体保有者は22名であった。有症者のうち、HUS、HUS症状の一つと思われる急性腎不全、又は血便を呈した重症の有症者（以下「重症者」という。）は、23名（血便：21名、血便+HUS：1名、血便+急性腎不全：1名）で有症者の67.6 %を占めた。重症化について各EHECの有症者数に対する重症者の比率を算出すると、O157: H7 (Stx2; *stx2a+stx2c*)、O157: H- (Stx2; *stx2a+stx2c*)、及びO103: H2

(Stx1&2; *stx1a+stx2a*)が100.0 %、O157: H7 (Stx2; *stx2a*)が83.3 %、そしてO157: H7 (Stx1&2; *stx1a+stx2a*)が75.0 %と高く、これらの共通点としてはすべて*stx2a*を保有していた。

*eae*はEHECの腸管付着に関与する重要な病原因子で、HUSのリスク因子とされており⁷⁾、発症や重症化に関与すると考えられる。また、*stx*サブタイプでは、*stx2a*保有株が他のサブタイプ保有株に比べて病原性が高い可能性を示唆する報告⁸⁾がある。今回、有症者からの分離株の多くが*eae*を保有していたこと、そして*stx*サブタイプでは、*stx2a*を保有するEHECで重症者が多く見られたことから、これらにおおむね一致していた。この傾向はこれまでの当センターでの調査^{1)~3)}でも示されており、ヒト由来EHEC株の*eae*保有や*stx*サブタイプの確認や把握は、感染防止対策や重症化を防止するためには重要であると考えられる。

ヒト由来EHEC株の薬剤感受性試験結果を表3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が、56株中11株（耐性率：19.6 %）確認された。O血清群別での内訳は、O157は6株、O26は3株、O111及びO103は各1株であった。当センターでは2016年度からヒト由来EHEC株の薬剤感受性試験を継続的に実施しているが、耐性率は2016年度（28.1 %）、2017年度（10.4 %）、2018年度（17.1 %）と例年10~30 %付近で

表3 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 | 36 | 6 | O157:H7 (Stx2) | ABPC・TC (1) |
| | | | O157:H7 (Stx2) | ABPC・CEZ・TC (1) |
| | | | O157:H7 (Stx2) | ABPC (1) |
| | | | O157:H7 (Stx1,2) | ABPC (1) |
| | | | O157:H7 (Stx1,2) | ABPC・ST (1) |
| | | | O157:H7 (Stx1,2) | TC (1) |
| O26 | 6 | 3 | O26:H11 (Stx1) | ABPC・CEZ・KM・TC・CP・ST (1) |
| | | | O26:H11 (Stx1) | ABPC・KM・CP・ST (1) |
| | | | O26:H11 (Stx1) | TC (1) |
| O111 | 3 | 1 | O111:H- (Stx1) | ABPC・CEZ・TC・CP (1) |
| O130 | 1 | 1 | O130:H- (Stx1) | ABPC・TC (1) |
| O103 | 6 | 0 | | |
| O8 | 1 | 0 | | |
| O28ab | 1 | 0 | | |
| O115 | 1 | 0 | | |
| OUT | 1 | 0 | | |
| 計 | 56 | 11 | | |

あり2019年度もこの範囲内であった。耐性は6種の薬剤 (ABPC, TC, CEZ, ST, CP, KM) で確認されたが、そのうちABPC耐性は9株で確認され最も多く、次いでTC耐性が7株、CEZ, ST及びCP耐性がそれぞれ3株の順であった。EHEC感染症治療の第一選択薬とされるFOM, NFLX, KM, ニューキノロン系抗菌薬では、O26の2株がKM耐性であった。これまでの当センターの調査でもFOM及びKMの耐性株が少数であるが検出されている^{1), 3)}。FOMをはじめとする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、耐性株の動向を把握する必要がある。また、近年、EHECにおいても基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (以下「ESBL」という。) 産生株の報告がある^{9), 10)}。本県では2019年度はESBL産生が

疑われる株はなかったが、過去には検出されている^{1), 2)}。ESBL産生菌が起因菌となった場合、治療に苦慮することはもとより、ESBL産生遺伝子は同一菌種間だけでなく異なる菌種間でも伝達される等の問題があるため、ESBL産生株の発生動向にも注視していく必要がある。

ヒト由来EHEC株O26, O103, O111及びO157のMLVA法によるクラスター解析結果を表4に示した。MLVA法による解析では同一MLVA型に分類される菌株が見られ、O157 36株は22種類のMLVA型に分類され、O26 6株は5種類、O103 6株は4種類、O111 3株は3種類に分類された。そして、クラスターは、O157では9種類 (A～I)、O26及びO103は各1種類 (それぞれ J, K) 形成されたが、O111では見られなかった。2019年度は食中毒事例のような大きな集団事例は発生しなかったが、家族内感染等、疫学的関連性を認めたグループ事例が8件 (グ

表4 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 |
|-------|------------------|-------|---------|------------|---------|---------|-----------------|
| A | O157:H7 (Stx2) | 1 | 2019.5 | a | グループ事例① | 19m0074 | |
| | | 2 | 2019.5 | a | | | |
| B | O157:H7 (Stx2) | 3 | 2019.9 | b | 散発事例 | 19m0251 | |
| | | 4 | 2019.8 | b | 散発事例 | | |
| C | O157:H7 (Stx2) | 5 | 2020.1 | c | 散発事例 | 19m0046 | |
| | | 6 | 2020.1 | c | 散発事例 | | |
| | | 7 | 2020.2 | c | 散発事例 | | |
| D | O157:H7 (Stx1,2) | 8 | 2019.5 | c | グループ事例② | 19m0050 | |
| | | 9 | 2019.5 | c | | | |
| E | O157:H7 (Stx1,2) | 10 | 2019.6 | d | グループ事例③ | 19m0145 | |
| | | 11 | 2019.6 | d | | | |
| | | 12 | 2019.6 | d | | | |
| | | 13 | 2019.6 | d | | | |
| F | O157:H7 (Stx1,2) | 14 | 2019.8 | d | 散発事例 | 19m0427 | |
| | | 15 | 2019.9 | b | 散発事例 | | |
| G | O157:H7 (Stx1,2) | 16 | 2019.9 | c | グループ事例④ | 19m0427 | |
| | | 17 | 2019.10 | c | | | |
| H | O157:H7 (Stx1,2) | 18 | 2020.1 | e | 散発事例 | 20m0005 | |
| | | 19 | 2020.2 | c | 散発事例 | | |
| I | O157:H7 (Stx1,2) | 20 | 2019.7 | f | グループ事例⑤ | 19m0146 | |
| | | 21 | 2019.7 | f | | | |
| J | O157:H7 (Stx1,2) | 22 | 2019.6 | b | グループ事例⑥ | 19m0147 | 19c015 |
| | | 23 | 2019.6 | b | | 19m0148 | |
| | | 24 | 2019.6 | b | | | |
| K | O26:H11 (Stx1) | 25 | 2019.5 | d | グループ事例⑦ | 19m2021 | |
| | | 26 | 2019.5 | d | | | |
| K | O103:H2 (Stx1,2) | 27 | 2019.9 | g | グループ事例⑧ | 19m4032 | 19c404 |
| | | 28 | 2019.9 | g | | 19m4033 | 19c404p |
| | | 29 | 2019.9 | g | | | |
| | | 30 | 2019.9 | g | | | |

ループ事例①～⑧) 確認された。これらグループ事例では、O157によるグループ事例5件(グループ事例①～⑤)及びO26によるグループ事例1件(グループ事例⑦)は、各事例内の菌株間でMLVA型は完全に一致し、同一由来株に起因するものと考えられた。O157によるグループ事例⑥は、事例内でMLVA型が一致しない株が1株あったが、MLVAコンプレックスが一致しているため、株間には関連性を有しているものと考えられた。また、O103によるグループ事例⑧では、4株のMLVA型及びMLVAコンプレックスは、2株が「19m4032」及び「19c404」、残り2株が「19m4033」及び「19c404p」と異なったが、「19c404p」は「19c404」のサブコンプレックスであることや、グループ事例⑧は家族内感染を疑う事例であったことから、これら4株は同一由来株又は近縁株であると考えられた。一方で、複数の散発事例又は散発事例とグループ事例が同一クラスターに分類されたものが5種類見られた(クラスターB, C, E, F, G)。これらのクラスターの中には、異なる事例であっても菌検出時期が近く、かつEHEC感染者の居住地が同一の市町村である等、何らかの関連性が疑われるものもあったが、他に手がかりとなる疫学情報は得られず、いずれのクラスターにおいても事例間での関連性は解明できなかった。また、2019年度中に分離されたO26, O103, O111及びO157株について、食中毒調査支援システム(NESFD)(2020年3月27日時点)及び国立感染症研究所から提供された全国のMLVA型の情報を基に調査を行ったところ、本県分離EHECのMLVA型全34種類のうち12種類(35.3%)が、本県でEHECが分離された約1か月以内に他自治体でも分離されていた。その内訳は、本県分離O157のMLVA型22種類のうち10種類(45.5%)が他自治体でも分離され、O103は4種類のうち1種類(25.0%)、O111は3種類のうち1種類(33.3%)が分離されたが、O26は同一のMLVA型はなかった。他自治体分離EHECとMLVA型が一致した本県分離EHECについて、広域的なdiffuse outbreakを視野に入れ、得られた疫学情報を基に調査したが、いずれも関連性は不明であった。

集団事例や広域的なdiffuse outbreakの早期探知には、自治体、保健所等における詳細な疫学情報の収集及び共有が不可欠である。当センターでは収集したヒト由来EHEC株について、血清型、薬剤耐性等の菌株性状、MLVA法等による分子疫学解析結果、そして保健所等から得られた疫学情報を菌株データベースとしてまとめて一括管理し、このデータベースを活用することで感

源や感染経路の究明に繋げることができないか検討しているが、現状では菌株間で同一のMLVA型になっても関連性が解明できず不明であることが多い。そのため、菌株収集後極力速やかに国立感染症研究所へ菌株送付することで、事例発生から保健所等関係機関に対するMLVA法検査結果還元までのタイムラグを少しでも減少させ、見えなかった感染源や感染経路の探索のための早期の追加調査等の実施に結びつけることを図った。新たな有益な疫学情報は得ることはできなかったが、引き続き早期の情報還元に努めることとしている。

今後は、自治体、保健所、そして食品衛生部門及び感染症部門との情報共有をはじめとして、疫学情報を更に多く網羅的に収集できる体制を構築し、さらに、分子疫学解析結果と疫学情報を併せた解析を継続して行うことで感染源や感染経路を1つでも多く究明することが、EHEC感染症感染拡大防止や感染予防のためには重要であり課題と考える。

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) 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
- 2) 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
- 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) 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
- 5) 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

- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 山口友美, 木村葉子, 矢崎知子, 後藤郁男, 畠山敬ら : 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼを産生する腸管出血性大腸菌O15の遺伝子解析, 宮城県保健環境センター年報, 30, 27-30, 2012
- 10) 相原義之, 川又祐子, 増子京子 : ESBL産生性腸管出血性大腸菌O26感染症分離菌株の薬剤耐性遺伝子について, 茨城県衛生研究所年報, 54, 39-42, 2016