

# 1996年に千葉県で発生した腸管出血性大腸菌による 下痢症由来株の性状と分子遺伝学的解析

内村眞佐子, 小岩井健司, 岸田 一則, 依田 清江  
鶴岡 佳久, 水口 康雄

## Characteristics and Genotypic Analysis of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Isolated in Chiba Prefecture in 1996

Masako UCHIMURA, Kenji KOIWAI, Kazunori KISHIDA, Kiyoe YODA  
Yoshihisa TSURUOKA and Yasuo MIZUGUCHI

### I はじめに

1996年5月28日, 給食が原因と推定される腸管出血性大腸菌 (EHECと略) O157:H7による食中毒が岡山県の小学校において発生し, その後次々と, 西日本を中心に全国で多発した。7月に堺市において発生した事例は, 小学校児童を中心に, 患者数が5700人を越える大規模なものであった。1996年千葉県においては, 幸いにも本菌による集団事例はみられなかったが, 6月以降11月までに家族内感染事例4例を含めて38名の患者発生が認められた。

そこで, 1996年千葉県におけるEHEC患者発生状況ならびに, 患者由来株の性状を調べると共に, これら菌株間の関連性についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法およびDNAフィンガープリンティング (RAPD) 法による染色体遺伝子の解析を行ったので, その結果について報告する。

### II 材料及び方法

1. 供試菌株: 1996年に患者から分離されたEHEC菌株36株を用いた。

2. 生化学的性状: 定法に従って行った。

3. 薬剤耐性試験: センシディスク (BBL) を用い, 使用書に従い測定を行った。アンピシリン (ABPC), テトラサイクリン (TC), ストレプトマイシン (SM), クロラムフェニコール (CP), カナマイシン (KM), ナリジクス酸 (NA), スルフォメトキサゾール/トリメトプリム (SXT), フォスフォマイシン (FOM) の8薬剤について試験を行った。

4. RAPD: 供試菌をLプロスで37°C, 18時間振とう培養し, インスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) によりDNAを抽出し, 得られた鋳型DNAの1μlを, Taqポリメラーゼ (ペーリンガー) 1u, MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTP各250μM, Tris-HCl 10mM, KCl 150mM, Triton-X100 0.1%, プライマー20pmolを含むPCR混液 (最終容積25μl) に加えた。PCRはPTC-200 DNA Engine (MJリサーチ) を用い, 95°C 3分, (93°C30秒, 55°C30秒, 72°C1分) 35サイクル, 72°C 3分の条件で行った。プライマーは, 国立感染症研究所がEHEC

O157の解析に用いた, Operon社のG11 (5'-TGCCCGTCTCGT-3') と同配列のオリゴヌクレオチド<sup>1)</sup>を使用した。

5. PFGE: DNAの抽出と試料の調整は, 満田ら<sup>2)</sup>の方法に準じて行った。すなわち, 供試菌をBrain heart infusion培地で37°C, 18時間振とう培養後, その100μlを遠心集菌した。菌体に, 50μlのSEバッファーと等量の2%低融点アガロース (Bio-Rad) およびlysozyme (25mg/ml) を4μlを加え, サンプルゲルブロックを作成した。ゲルブロックをlysis solution (1M NaCl, 0.1M EDTA [pH8.0], 0.5% [w/v] Brij-58, 0.2% [w/v] deoxycholate, 0.5% [w/v] sarkosyl, 1mg/ml lysozyme) 内で37°C, 1時間反応させ溶菌を行った。次いで, 蛋白分解液 (0.25M EDTA [pH8.0], 1% [w/v] sarkosyl, 0.1mg/ml proteinase K) 中で16~20時間, 50°Cで蛋白消化を行った後, 1mM phenylmethylsulfonyl fluorideを含むTEバッファー (10mM Tris, 1mM EDTA [pH8.0]) 中で室温30分間放置し, 以後, TEバッファーで4回洗浄した。このゲルを適当な大きさに切断後, 制限酵素Xba Iで37°C, 18時間処理した。電気泳動は, CHEF-DR III (Bio-Rad) システムで, 0.5xTBE バッファー, 1%アガロースゲル用い, 200V, 5~50秒のパルスタイム, 14°Cの条件下, 20時間行った。

### III 結果

1. EHEC患者発生状況: 1996年に千葉県においては38名がEHEC感染症と診断された。このうち36名からは菌が分離され, 分離株の血清型別内訳は, O157が34株 (O157:H7:33株, O157:Hut:1株), O26が2株 (O26:H11:1株, O26:H-:1株)であった。2名は, 菌は分離されなかったがO157抗体の上昇が確認され, O157感染症と診断された。図1に月別EHEC患者発生状況を示す。6月から10月に患者が多く認められ, 11月は1名のみでの発生で12月は患者発生報告はなく, 本菌による感染症は夏期に好発し, 冬期には減少する傾向であった。患者発生は各年齢層に認められたが, 2歳以下が12名 (31.5%) と多くを占めた (表1)。EHEC陽性者38名のうち下痢有症者は32名 (84.2%) で, 4名がHUSを併発した。HUS併発患者の年齢は1歳2名, 4歳1名, 55歳1名であった。一方下痢発症のない, いわゆる保菌者は6名 (15.7%) で, 多くが下痢患者の家族検便で菌が分離された例であった。

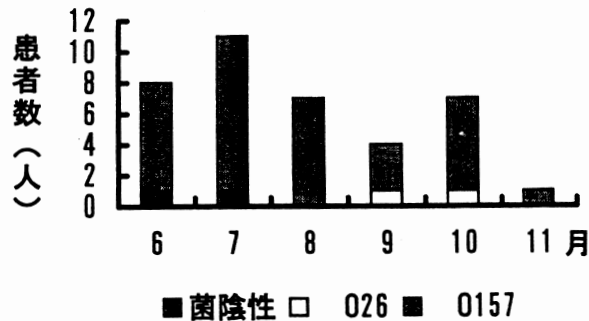


図1 月別腸管出血性大腸菌患者発生状況 (1996年)

表1 年齢別腸管出血性大腸菌患者発生状況 (1996年, 千葉県)

年齢群 (歳)	患者数 (人)		
	男	女	合計
0~2	6	6	12
3~5	1	2	3
6~12	6	1	7
13~20	0	1	1
20~	6	9	15
合計	19	19	38

2. 分離株の性状

① 生化学的性状: EHEC分離株中, 血清型O157を示した34株の糖分解性およびβ-グルクロニダーゼ産生性のまとめを表2に示す。34株中1株はソルビトール分離性を示し, 1株は乳糖遅分解菌であった。また2株はβ-グルクロニダーゼ陽性株であった。

表2 腸管出血性大腸菌O157の性状 (1996年分離株34株について)

テ ス ト	腸性株数 (%) (n=34)
糖分解性	
ソルビット	1 ( 2.9)
ズルシット	30 ( 88.2)
ラムノース	28 ( 82.4)
ラフィノース	34 (100 )
シュクロース	34 (100 )
サリシン	0 ( 0 )
ラクトース	34 (100 )
キシロース	34 (100 )
β-グルクロニダーゼ	2 ( 5.9)

ソルビット分解性は24時間培養後の成績  
その他の糖は, 7日間観察

② 毒素型: 血清型O157の34株の毒素型は, VT1, VT2両毒素産生株が10株 (29.4%), VT1産生株が2株 (5.9%), VT2産生株が22株 (64.7%)であった。血清型O26の2株は, 何れもVT1産生株であった (表3)。

表3 毒素型別腸管出血性大腸菌分離数 (1996年 千葉県)

血清型	毒素型別分離株数			
	VT1+VT2	VT1	VT2	合計
O157: H7/ut	10	2	22	34
O26: H11/-	0	2	0	2
合計	10	4	22	36

③ 薬剤感受性: 供試菌株34株の薬剤感受性型を表4に示す。O157の34株中29株 (85.3%) が使用8薬剤に感受性を示し, SM耐性が1株, TC, SM耐性が2株, SM, CP, KM, NA耐性が1株であった。O26の2株は感受性株であった。

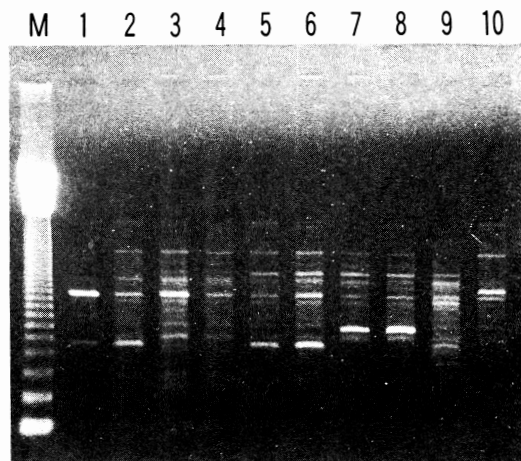
表4 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性パターン (1996年 千葉県)

血清型	薬剤耐性パターン	株数 (%)
O157 (n=34)	感受性	29 ( 85.3)
	SM	1 ( 2.9)
	TC, SM	3 ( 8.8)
	SM, CP, KM, NA	1 ( 2.9)
O26 (n=2)	感受性	2 (100 )

3. 分離株の遺伝子解析

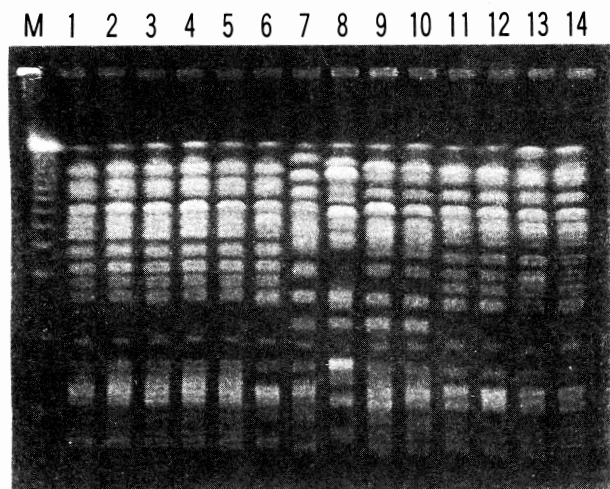
34株のO157についてRAPDおよびPFGEを行いパターンを比較した。供試菌株のパターンは多様で, それぞれ20種類以上のパターンが観察された。電気泳動パターンの一部を図2および図3に示す。便宜的に, PFGEパターンはアルファベット, RAPDパターンはローマ数字で分類した。34株の内, 4名 (6月富津市), 2名 (10月市原市), 3名 (10月市原市) の家族が発症した3件の家族内感染事例の患者由来株に, それぞれ共通のパターンが認められた。また, 家族内発生を除く散发事例由来株25株中10株は, 毒素型とRAPDおよびPFGEパターンの共通性から4グループに分類され (表5), 15株はそれぞれパターンが異なっていた。

図2 散发患者由来O157株のRAPDパターン



Lane: 菌株No.: Type      Lane: 菌株No.: Type  
 1: 42: I                      6: 56: VII  
 2: 67: OT                    7: 58: II  
 3: 50: VI                    8: 62: II  
 4: 59: VI                    9: 52: OT  
 5: 46: VII                    10: 66: OT  
 M: Marker                    (OT: その他)

図3 発患者由来O157:H7株のPFGEパターン



Lane : 菌株No. : Type      Lane : 菌株No. : Type  
 1 : 42 : A                      8 : 64 : OT  
 2 : 43 : A                      9 : 61 : C  
 3 : 44 : A                      10 : 63 : C  
 4 : 45 : A                      11 : 67 : D  
 5 : 48 : A                      12 : 70 : D  
 6 : 57 : A                      13 : 71 : D  
 7 : 50 : OT                      14 : 72 : D  
 M : Marker                      (OT : その他)

表5 散発患者由来株の毒素因と遺伝子パターンの分類

菌株No.	発生月日	発生場所	菌株毒素型	遺伝子パターン分類		備考
				PFGE	RAPD	
42	6/13	富津市	VT2	A	I	}
43	6/13	富津市	VT2	A	I	
44	6/13	富津市	VT2	A	I	
45	6/13	富津市	VT2	A	I	
48	6/9	鎌ヶ谷市	VT2	A	I	
57	7/24	柏市	VT2	A	I	}
58	7/29	市川市	VT1+VT2	B	II	
62	8/8	多古町	VT1+VT2	B	II	
61	8/5	船橋市	VT2	C	III	
63	8/15	長南町	VT2	C	III	
67	8/31	茂原市	VT2	D	III	
70	9/4	船橋市	VT2	D	III	
71	9/30	千葉市	VT2	D	III	
72	10/3	市川市	VT2	D	III	
73	10/2	市原市	VT1+VT2	E	IV	
74	10/3	市原市	VT1+VT2	E	IV	
76	10/22	市原市	VT2	F	V	}
77	10/2	市原市	VT2	F	V	
78	10/22	市原市	VT2	F	V	

IV 考察

1996年、千葉県においては38名のEHEC患者発生が報告された。下痢患者由来大腸菌のベロ毒素産生試験を開始した1988年以後、年間1～4名の患者からEHECを分離しており、1985年までに13名の患者を確認している<sup>3),4)</sup>。昨年までと比較して、本年6月以降はEHEC患者数が急激に増加した。これは、5月末に始まった西日本における集団発生以降、EHEC感染症への関心

が急激に高まり、医療機関等において下痢症患者の検便が盛んに行われた結果と思われる。そのなかで特に注目されるのは、乳幼児の患者数が多いことおよびHUS併発例が15名中3名(20%)と高率を示したことである。患者及び家族の喫食状況調査から、外食等で感染した親から家庭内で乳幼児が二次感染したと疑われる例が認められた。乳幼児は成人に比べて抵抗力が劣ることから少量の菌でも発症しやすいと考えられているが、乳幼児がいる家庭では、下痢をしている親の衛生管理はもとより、入浴の順番等にも配慮が必要と思われる。

現在我が国で分離される腸管出血性大腸菌の多くは血清型O157株である。O157株の多くは他の大腸菌と異なり、ソルビトール遅分解およびβ-グルクロニダーゼ陰性の性状を有し、この性状を利用して選択分離培地や確認培地が工夫されている。しかし、本年千葉県で分離された34株中1株(2.9%)がソルビトール陽性で、2株(5.8%)がβ-グルクロニダーゼ陽性であった。このことは、O157用に考案された検査法では、患者発見を見逃す可能性があることを示している。特に下痢患者の検査においては、O157以外の腸管出血性大腸菌の検索も必要であり、基本的な大腸菌検査法に毒素産生試験を組み合わせて検査をしていくことが望ましいだろう。感染症研究所による全国集計では、1996年に分離されたO157株の内VT1+VT2両毒素産生型が86.7%を占めた<sup>5)</sup>が、千葉県では、VT2産生型が22株(64.7%)と多くを占め、全国の傾向とは異なった。このことから、O157で汚染された原因食品の流通に地域的な特徴があったことが推測されるが、分離されたVT2産生株の遺伝子パターンに共通性が認められないことから、汚染源が単一ではなくすでに多数存在していることが考えられる。また、PFGEおよびRAPDによる遺伝子検索の結果、発生場所が異なるにも関わらず同一の遺伝子パターンを示す例が4例明らかになったことは、遺伝子検索の疫学調査における有用性を示すものである。

文献

- 1) 満田年宏, 荒井一二, 川本進, 横田俊平 (1995) : バルスフィールドゲル電気泳動法による感染症の分子疫学的解析, 日細菌誌, 50 : 1077-1086
- 2) 国立感染症研究所 細菌部 (1997) : Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), 腸管出血性大腸菌O157の検出・解析等の技術講習会資料, 32-42.
- 3) 内村眞佐子, 鶴岡佳久, 福田トヨ子, 鈴木和夫, 山崎伸二, 竹田美文 (1991) : Vero毒素産生性大腸菌O111:H-を分離した虫垂炎が疑われた2症例, 感染症学会雑誌, 65 : 905-908.
- 4) 地引利昭, 森 淳夫, 早川真名, 田村雅治, 野口博史, 目黒英典, 猪股弘明, 寺島周, 吉澤康男, 堀内敏行, 内村眞佐子, 竹田多恵 (1993) : Vero毒素産生性大腸菌O157:H7の感染による溶血性尿毒症症候群の1例-臨床像ならびに細菌学的検討-, 小児科臨床, 46 : 1511-1516.
- 5) <特集>Vero毒素産生性大腸菌(腸管出血性大腸菌)感染症1996~1997. 6. (1997) 病原微生物検出情報 : 18, 153-155.