

千葉市内における腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検出状況 (2018 - 2020 年)

野本 さとみ、吉原 純子、本宮 恵子、佐々木 彩華
石橋 恵美子、横井 一、大塚 正毅

(環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 2018 年 4 月から 2021 年 3 月の 3 年間に、市内医療機関から腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症として保健所へ届出され、当所に菌株の搬入があった 62 株について血清型別とベロ毒素 (VT) 型別を実施した。血清型別の結果、O157 が 38 株 (61.3%)、O145 が 8 株 (13.0%)、O26 が 5 株 (8.1%) であり、全体の 8 割を占めた。VT 型別の結果、VT1+VT2 型が 23 株 (37.1%)、VT1 型が 12 株 (19.4%)、VT2 型が 27 株 (43.5%) であった。分離菌株の遺伝子を反復配列多型解析 (multilocus variable-number tandem repeat analysis: MLVA) 法により解析したところ、全国で広域的に分離された EHEC と同一の MLVA 型または MLVA コンプレックスに分類される株が市内にも存在することが明らかとなった。

Key Words : 腸管出血性大腸菌 (EHEC)、反復配列多型解析 (MLVA) 法

1. はじめに

EHEC 感染症は、VT を産生または VT 遺伝子を保有している大腸菌による感染症である。「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)において三類感染症に指定され、症状の有無に関わらず、菌の分離・同定と VT の確認による全数届出が義務付けられている。

また、厚生労働省通知^{1),2)}により、地方衛生研究所に搬入された菌株については国立感染症研究所(感染研)へ送付することとなった。中でも O 血清群が O157、O26 および O111 の菌株については、厚生労働省事務連絡³⁾に基づき MLVA 法による遺伝子解析を実施しており、解析結果を感染研に報告することによって付与される MLVA 型を国と各自治体間で共有することとなっている。

今回、2018 年 4 月から 2021 年 3 月の 3 年間ににおいて市内医療機関から届出があり、当所へ搬入された EHEC 感染症の菌株について、血清型別試験、VT 型別試験、MLVA 法による遺伝子解析および薬剤感受性試験を実施したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 供試菌株

2018 年 4 月から 2021 年 3 月の 3 年間に、市内医療機関から EHEC 感染症として届出があり、当所に搬入された菌株 62 株を使用した。

菌株は血清型毎に種々の選択培地を用いて一晚培養後、発育したコロニーを各種試験に用いた。また、選択培地としては、O157 では CT-SMAC (OXOID) とクロモアガー O157 (OXOID)、O26 では CT-RMAC (BD、OXOID)、O111 では CT-SBMAC (BD、OXOID) を用いた。なお、搬入時点において、血清型が不明の菌株についてはクロモアガー STEC (OXOID) および DHL 培地 (栄研化学) を用いて培養した。

2.2 血清型別試験

血清型別は病原体検出マニュアル⁴⁾に基づき、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて O 抗原および H 抗原の型別を行った。

O 抗原の型別において当所で所有している免疫血清で判定できない菌株については、E.coli Og-typing PCR

(Og-typing PCR) 法⁵⁾によってOg型を確認した。

また、非運動性の菌株または免疫血清で判定出来なかった菌株のH抗原については、E.coli Hg-typing PCR (Hg-typing PCR) 法⁶⁾によってHg型を確認した。

2.3 VT型別試験

VT型別については病原体検出マニュアル⁴⁾に基づき、CAYE培地(デンカ生研)にて増菌培養後、VTEC-RPLA(デンカ生研)を用いて行った。

また、RPLA法によって、判定が出来ない菌株は、「腸管出血性大腸菌VT1遺伝子検出用Primer Set EVT-1&2」および「腸管出血性大腸菌VT2遺伝子検出用Primer Set EVS-1&2」(ともにタカラバイオ)を用いたPCR法によって毒素遺伝子の保有状況を確認した。

2.4 MLVA法による遺伝子解析

O血清群がO157(38株)、O26(4株)およびO111(2株)であった44株について、MLVA法による遺伝子解析を行った。MLVA法は「腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック(O157、O26、O111編)」⁷⁾に従って実施した。また、O157については解析で得られたリピート数を用いてMLVA-mate⁸⁾によりminimum spanning tree(MST)を作成した。

2.5 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準化協会(CLSI)の抗菌薬ディスク感受性試験法に基づき、KBディスク(栄研化学)を用いてKirby-Bauer法⁹⁾による薬剤感受性試験を実施した。試験に用いた薬剤はアンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、セファゾリン(CEZ)、セフポドキシム(CPDX)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、クロラムフェニコール(CP)、レボフロキサシン(LVFX)およびST合剤(ST)の9薬剤とした。各薬剤について阻止円を計測し、感受性を判定した。

3. 結果

3.1 EHEC感染症の発生状況

EHEC感染症として届出された症例のうち、当所に菌株が搬入された症例は2018年度に24件、2019年度に17件、2020年度に21件であった。患者年齢は2~87歳の範囲(平均年齢32歳)であり、年代別では20歳代が最も多く16件(25.8%)であった。男女別では女性が39件(62.9%)、男性が23件(37.1%)であり女性が男性の約1.5倍であった(図1)。症状の有無に関しては、有症状者が47件(75.8%)、無症状者が15件(24.2%)であった。主な症状は腹痛41件(66.1%)、水様性下痢・下痢38件(61.3%)、血便29件(46.8%)

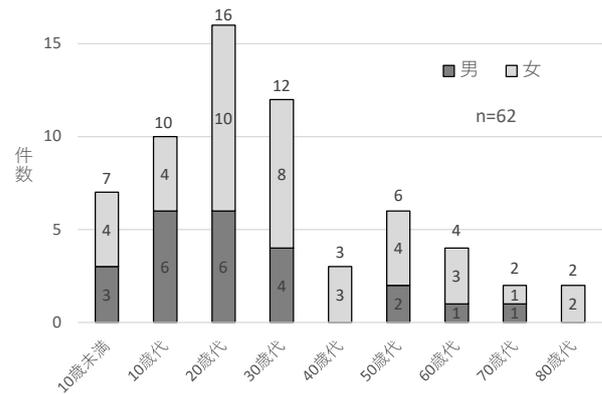


図1 届出症例の年齢と性別

であった(重複あり)。また、溶血性尿毒症症候群(HUS)の発症は4件(6.5%)であった。

3.2 血清型別およびVT型別試験

当所に搬入された菌株62株の血清型別およびVT型別試験の結果を表1に示した。

O血清群別にみるとO157が38株(61.3%)、O145が8株(13.0%)、O26が5株(8.1%)となり、O157が全体の半数以上を占めた。また、主要な3つのO血清群(O157、O145およびO26)が全体の8割以上を占めた。

O174の3株についてはO血清群不明で搬入され、そのうち2株は感染研でO174と判定されたが、残りの1株は当所および感染研においても型別出来ずOg-typing PCR法によってOg174と判定された。

VT型別では、VT1+VT2型が23株(37.1%)、VT1型が12株(19.4%)、VT2型が27株(43.5%)であった。

3.3 MLVA法による遺伝子解析

感染研から付与されたMLVA型およびMLVAコンプレックスを表1に示した。全国で広域的に分離された菌株と同一のMLVA型またはMLVAコンプレックスに分類される株が全体の約半数を占めた。

当所で解析を行った菌株のうち、MLVA型またはMLVAコンプレックスが一致した株は8組18株あり、これらの菌株は全てO157であった。このことから血清群がO157に型別された38株から得られたリピート数を用いて、VT型ごとにMSTを作成した。O157(VT2)のMST(図2)を見ると、2018年に分離されたNo.397、No.400およびNo.404のMLVA型はそれぞれ異なっていた(17m0435、13m0327、18m0163)が、2つの遺伝子座のリピート数が異なるdouble locus variant(DLV)の関係にあり、同一のMLVAコンプレックス(18c010)に分類された。また、2019年に分離された

表1 EHEC 菌株の血清型、毒素型および MLVA 型

血清型	毒素型	千葉市No.	MLVA型	MLVA コンプレックス	当所で一致した 組み合わせ	広域的（市外）に 検出があった株	検出年月
O157:H-	VT1	415	19m0445			-	2019年9月
O157:H7	VT2	395	18m0182	18c029	①	○	2018年8月
O157:H7	VT2	396	16m0103	18c028	②	○	2018年8月
O157:H-	VT2	397	17m0435	18c010	③	○	2018年7月
O157:H7	VT2	398	18m0182	18c029	①	○	2018年7月
O157:H7	VT2	400	13m0327	18c010	③	○	2018年8月
O157:H7	VT2	401	18m0182	18c029	①	○	2018年8月
O157:H7	VT2	404	18m0163	18c010	③	○	2018年8月
O157:H7	VT2	408	18m0419			-	2018年10月
O157:H7	VT2	411	16m0103	19c028	②	○	2019年7月
O157:H7	VT2	416	19m0492			-	2019年10月
O157:H7	VT2	417	19m0493			-	2019年10月
O157:H7	VT2	418	19m0488	19c058	⑦	○	2019年11月
O157:H7	VT2	419	19m0487	19c058	⑦	○	2019年11月
O157:H7	VT2	422	20m0105	20c010		○	2020年7月
O157:H7	VT2	423	20m0235			-	2020年7月
O157:H7	VT2	424	20m0236			-	2020年8月
O157:H7	VT2	427	20m0273			-	2020年9月
O157:H7	VT2	429	18m0468			○	2020年9月
O157:H7	VT2	431	19m0082	20c044		○	2021年3月
O157:H7	VT1+VT2	392	18m0030			○	2018年5月
O157:H7	VT1+VT2	393	15m0436	18c002		○	2018年6月
O157:H7	VT1+VT2	394	18m0113			○	2018年7月
O157:H7	VT1+VT2	402	16m0035	18c036		○	2018年8月
O157:H7	VT1+VT2	403	13m0425			-	2018年8月
O157:H7	VT1+VT2	406	16m0484		④	○	2018年9月
O157:H7	VT1+VT2	407	16m0484		④	○	2018年9月
O157:H7	VT1+VT2	409	19m0247		⑤	-	2019年7月
O157:H7	VT1+VT2	410	19m0247		⑤	-	2019年7月
O157:H7	VT1+VT2	412	19m0298	19c027	⑥	-	2019年7月
O157:H7	VT1+VT2	413	19m0298	19c027	⑥	-	2019年7月
O157:H7	VT1+VT2	414	19m0276	19c051		○	2019年8月
O157:H7	VT1+VT2	420	20m0032		⑧	○	2020年4月
O157:H7	VT1+VT2	421	20m0032		⑧	○	2020年4月
O157:H7	VT1+VT2	425	20m0186	20c023		○	2020年9月
O157:H7	VT1+VT2	426	16m0039	20c022		○	2020年9月
O157:H7	VT1+VT2	428	19m0513	20c030		○	2020年9月
O157:H7	VT1+VT2	430	20m0243	20c028		○	2020年9月
O145:H-	VT1	131	18m6012			-	2018年9月
O145:H-	VT2	132	18m6018			-	2018年11月
O145:H-	VT2	133	18m6018			-	2018年12月
O145:H-	VT2	134	18m6018			-	2018年12月
O145:H-	VT2	135	17m6017			-	2019年1月
O145:H-	VT2	138	19m6004			-	2019年7月
O145:H-	VT2	141	19m6011			-	2019年10月
O145:H-	VT2	147	20m6009			-	2020年10月
O26:H11	VT1	127	18m2040			-	2018年7月
O26:H11	VT1	136	19m2014			-	2019年3月
O26:H11	VT1	137	19m2077			-	2019年7月
O26:H-/Hg11	VT1	143	20m2060			-	2020年6月
O26:H11	VT1	145	15m2050			○	2020年7月
O103:H2	VT1	129	18m4006			-	2018年6月
O103:H2	VT1	130	18m4021			-	2018年8月
O103:H2	VT1+VT2	139	16m4013			-	2019年9月
O128:H2	VT1+VT2	128				-	2018年7月
O128:H2	VT1+VT2	148				-	2021年1月
O128:H2	VT1+VT2	149				-	2021年2月
O174:H-/Hg8	VT1	140				-	2019年8月
O174:H2	VT1	142				-	2020年4月
OUT/Og174:H-/Hg21	VT2	146				-	2020年9月
O111:H-/Hg8	VT1	150	21m3002			-	2021年2月
O111:H-/Hg8	VT1+VT2	144	15m3007			○	2020年7月

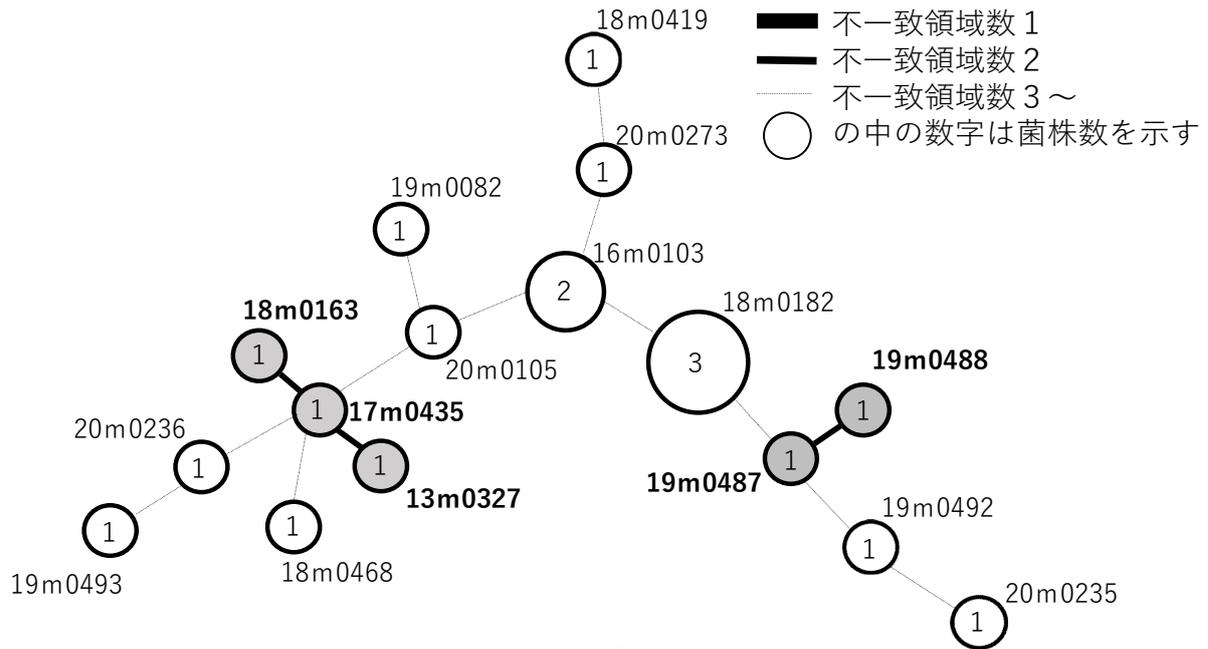


図2 EHEC O157 (VT2) の MST

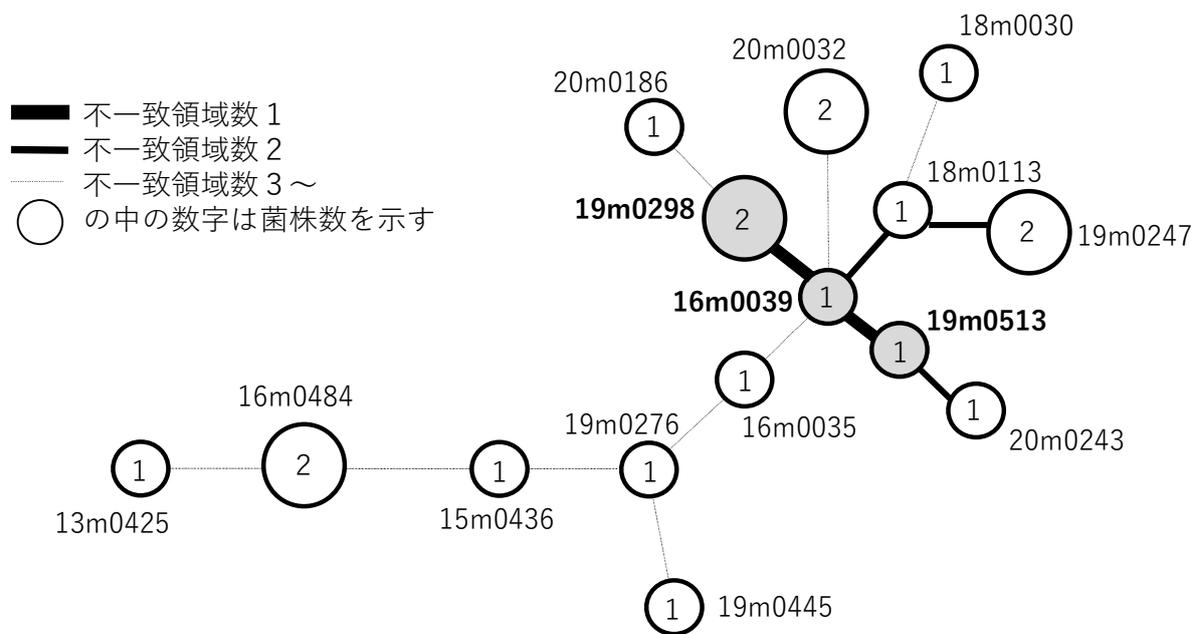


図3 EHEC O157 (VT1+VT2) の MST

No.418 と No.419 についても DLV の関係にあり MLVA 型は異なっていた (19m0488、19m0487) が、同一の MLVA コンプレックス (19c058) に分類された。なお、これら 2 菌株が分離された患者は焼肉チェーン店の利用と関連があった。

O157 (VT1+VT2) の MST (図3) を見ると、2019 年に検出された No.412 および No.413 の MLVA 型は同一 (19m0298) であり、同一の MLVA コンプレックス (19c027) に分類された。一方、2020 年に検出された No.426 と No.428 の MLVA 型は異なり (16m0039、19m0513)、1 つの遺伝子座のリピート数が異なる single

locus variant (SLV) の関係にあった。しかし、分類された MLVA コンプレックスはそれぞれ 20c022、20c030 と異なっていた。なお No.412 と No.426 および No.413 と No.426 も SLV の関係にあったが、分類された MLVA コンプレックスはそれぞれ 19c027 (No.412、No.413)、20c022 (No.426) と異なっていた。

3.4 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果を表2に示した。菌株 62 株のうち 43 株 (69.4%) は全ての薬剤に感受性を示したが、17 株 (27.4%) は、いずれかの薬剤に耐性を示した。

表2 EHEC 菌株の薬剤耐性パターン

O血清群 (分離菌株数)	薬剤耐性パターン	菌株数	(%)
O157 (38)	ABPC、TC、CP、ST	1	(2.6)
	ABPC、TC、ST	2	(5.3)
	ABPC	1	(2.6)
	—※	34	(89.5)
O145 (8)	ABPC、TC、CP、ST	4	(50.0)
	ABPC、KM、CP	1	(12.5)
	ABPC、TC、ST	1	(12.5)
	—※	2	(25.0)
O26 (5)	ABPC、TC、CP、LVFX、ST	1	(20.0)
	—※	4	(80.0)
O103 (3)	ABPC、TC、KM、ST、CEZ	1	(33.3)
	ABPC、ST	1	(33.3)
	CP	1	(33.3)
O128 (3)	CEZ (中間)	1	(33.3)
	—※	2	(66.6)
O174・Og174 (3)	TC	1	(33.3)
	KM (中間)	1	(33.3)
	—※	1	(33.3)
O111 (2)	ABPC、TC、KM、ST	1	(50.0)
	ABPC	1	(50.0)

※全ての薬剤 (9種類) に感受性

また、一部薬剤に対して中間を示したものが 2 株 (3.2%) あった。

O 血清群別で見ると、耐性を示した株は O145 で 6 株 (n=8、75%)、O157 で 4 株 (n=38、10.5%)、O103 で 3 株 (n=3、100%)、O111 で 2 株 (n=2、100%)、O26 で 1 株 (n=5、20%)、O174 で 1 株 (n=3、33.3%) であった。

一方、薬剤別で見ると、ABPC に耐性を示す株が 15 株 (24.2%) と最も多く、次いで TC が 12 株 (19.4%)、ST が 12 株 (19.4%) であった。

4. 考察

千葉市内における EHEC の届出件数は、2018 年度に 24 件、2019 年度に 19 件、2020 年度に 20 件とほぼ横ばいで推移している。全国的に見ると、2020 年度のみ減少がみられているが、それ以外の年度においては多少の増減はあるがほぼ横ばいで推移しており、本市も同様の傾向を示している¹⁰⁾。また、発生時期は食中毒の発生が増加するといわれている夏期に多くみられ、本市においても 6 月から 9 月にかけての期間で全体の 6 割近くを占めた。

血清型別で見ると、全国的には O 血清群 O157 および O26 の 2 群が 7 割近くを占めるが、当所では O157、O145、O26 の順に多く検出されており、全国に比べ O145 の検出が多く見られた。無症状者由来の菌株では O157、O145、O128、O26、O111 等と様々な O 血清群が検出された。

有症状者のうち HUS 発症患者は、O157 が 4 件中 3 件と最も多く、年齢は 2~71 歳の範囲ではあるが、10 歳未満および 10 歳代で 3 件となっており、低年齢層の割合が高かった。全国的にも HUS 発症は O157 で多く、患者も低年齢層で多いことが報告¹¹⁾されており、本市も同様の傾向であった。

MLVA 法による遺伝子解析の結果、2018 年に分離された No.397 (17m0435)、No.400 (13m0327) および No.404 (18m0163) の MLVA 型は異なっていたが、MLVA コМПレックスは同一 (18c010) であった。この 3 菌株の関連性は不明であるが No.397 が分離された患者は牡蠣を喫食していた。また、18c010 コМПレックスに含まれる株は全国で広域的に検出 (32 株、18 機関) されていた¹²⁾。

2019 年に分離された No.418 (19m0488) と No.419

(19m0487) についても MLVA 型は異なるが、同一の MLVA コンプレックス (19c058) であった。この 19c058 は全国で広域的に検出 (60 株、27 機関) されており、食中毒と認定はされなかったが、患者は同一焼肉チェーン店を利用していた¹³⁾。No.419 が分離された患者は、2 歳女児であったが、姉が同焼肉店を利用しており、家族内で二次感染が起きた可能性も示唆された。

届出があった症例の多くは、感染源の特定に至っていないが、症例の多くが焼肉店を利用していたことから、喫食時の生肉の取り扱いに不備があったことによる感染の可能性が示唆された。生肉の取り扱いについては行政として注意喚起を行っているところではあるが、届出件数が横ばいであることから、食中毒予防の継続的な啓発が必要である。

19c058 コンプレックスは、主な MLVA 型 (19m0487) を中心に、同 MLVA 型の SLV および DLV である 19m0488 から形成されている。感染研が 19c058 の 23 株について次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing : NGS) を用いて解析した結果、全て同一の感染源に由来する株である可能性が示唆された¹³⁾。このように DLV が存在する場合でも、NGS を用いることで菌株間の近縁性を明らかにすることが可能であり、MLVA 法だけでは集団感染の判断が難しい場合でもより詳細な分子疫学的解析が可能となる。本市においても NGS を導入し、集団事例、家族内事例、散发事例等の様々な事例間の関連性を解析が出来る体制を整備していきたい。また、MST を作成することで、MLVA 型および MLVA コンプレックスが異なる場合でも、SLV や DLV の関係性を視覚化でき、届出症例の関連性を把握する上で有用であった。

薬剤感受性試験の結果、血清群 O157 菌株は他の血清群に比べて耐性を示す株が少ない傾向が見られた。今回の調査では実施していないが、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 感染症の原因となるカルバペネム系薬剤および広域 β -ラクタム剤に対して耐性を示す *E.coli* もあり、当所においても 2019 年に NDM 型メタロ β ラクタマーゼ及び CTX-M9 型 β ラクタマーゼを保有する *E.coli* が検出されている¹⁴⁾。今後は薬剤感受性試験に使用する薬剤を検討し幅広く薬剤耐性の動向を調査する必要があると考える。

EHEC 感染症の分子疫学的サーベイランスでは、MLVA 法による遺伝子解析結果を一覧化し、MLVA リストとして全国で共有できることとなり、広域的な感染症や食中毒事例における迅速な対応が可能となった。引き続き、本市においても速やかに菌株の解析を実施

し、リアルタイムに国や各自自治体に情報を還元していくことが重要であると考えます。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課長：病原性大腸菌 O-157 の検体提供依頼について、衛食 160 号、平成 8 年 6 月 19 日
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について、食安監発第 0514001 号、平成 19 年 5 月 14 日
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課、厚生労働省医薬・生活衛生局食品安全課：腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について、事務連絡、平成 30 年 6 月 29 日
- 4) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル 2019 年 9 月改訂版」、2019
- 5) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M and Pathogenic *E.coli* Working Group in Japan : *Escherichia coli* O-genotyping PCR:a Comprehensive and Practical Platform Molecular O Serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology*53:2427-2432, 2015
- 6) Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S and Pathogenic *E.coli* Working Group in Japan : *Escherichia coli* H-genotyping PCR:a Complete and Practical Platform for Molecular H-Typing . *J Clin Microbiol*56.e00190-18, 2018
- 7) 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ：腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (O157、O26、O111 編) 第一版 (Ver.1.2), 2018
- 8) 南須原亮, 灘岡陽子, 草深明子, 他 : MLVA(VNTR) 情報の集計・可視化システム MLVA-mate の開発, 東京健康安全研究センター年報 69, 279-284, 2018
- 9) Bauer AW, Kirby W, Sherris M, et al: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*45, 493-496, 1966
- 10) 腸管出血性大腸菌感染症 2021 年 3 月現在, 病原微生物検出情報 42, 87-90, 2021
- 11) 国立感染症研究所感染症疫学センター: 感染症発生動向調査に届出された腸管出血性大腸菌感染症における溶血性尿毒症症候群, 2020 年, 病原微生物検出情報 42, 98-99, 2021

- 12) 泉谷秀昌, 李謙一, 伊豫田淳, 他: 2018年に分離された腸管出血性大腸菌の MLVA 法による解析, 病原微生物検出情報 40, 81-82, 2019
- 13) 李謙一, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 他: 2019年に報告された腸管出血性大腸菌集団感染事例の全ゲノム配列解析, 病原微生物検出情報 41, 70-71, 2020
- 14) 吉原純子, 野本さとみ, 篠田亮子, 他: 千葉市におけるカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の検出状況 (第2報), 千葉市環境保健研究所年報, 27, 67-70, 2020