

千葉市内における腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検出状況 第 2 報

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 2021 年 4 月から 2022 年 3 月の 1 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 22 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 16 株 (72.7%)、O26 が 3 株 (13.6%) となり、全体の 8 割を占めた。VT 型別の結果、VT1+VT2 型が 11 株 (50.0%)、VT1 型が 4 株 (18.2%)、VT2 型が 7 株 (31.8%) 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、2021 年 4 月から 2022 年 3 月の 1 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

2021 年 4 月から 2022 年 3 月の 1 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 22 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。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 (16 株)、O26 (3 株) および O111 (1 株) であった 20 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)、セフメタゾール (CMZ)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MPM)、テトラサイクリン (TC)、ホスホマイシン (FOM)、カナマイシン (KM)、ノルフロキサシン (NFLX)、レボフロキサシン (LVFX) および ST 合剤 (ST) の 10 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

2021 年度において 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 22 件であった。患者年齢は 5~78 歳の範囲 (平均年齢 34.0 歳) であり、年代別では 20 歳代が最も多く 6 件 (27.3%) であった。男女別では女性が 13 件 (59.1%)、男性が 9 件 (40.9%) 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 16 件 (72.7%)、無症状者が 6 件 (27.3%) であった。主な症状は水様性下痢・下痢 15 件 (68.2%)、血便 14 件 (63.6%)、腹痛 13 件 (59.1%) であった (重複あり)。また、溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症は 2 件 (9.1%) であ

った。

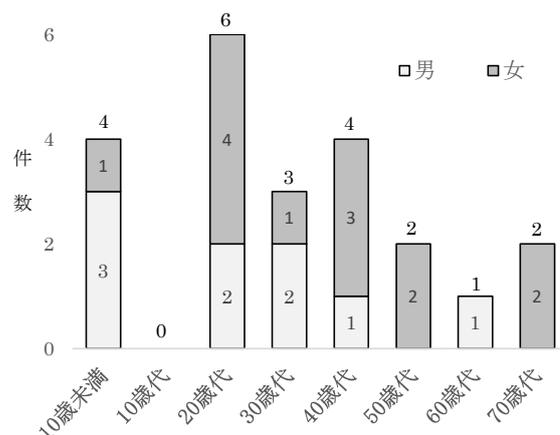


図 1 届出症例の年齢と性別

3.2 血清型別および VT 型別試験

当所に搬入された菌株 22 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 16 株 (72.7%)、O26 が 3 株 (13.6%) となり、O157 が全体の 7 割以上を占め、主要な 2 つの O 血清群 (O157 および O26) で全体の 8 割以上を占めた。その他、O111、O156 および O48 が各 1 株であった。

O156 および O48 については血清型不明で搬入され、当所で判定がつかず、感染研で O156 および O48 va と判定された。なお、O48 va は O48 の亜型の 1 つであり、感染研において非定型 Og-typing PCR 法¹⁰⁾ にて判定された。

VT 型別では、VT1+VT2 型が 11 株 (50.0%)、VT1 型が 4 株 (18.2%)、VT2 型が 7 株 (31.8%) 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ものが 4 組 8 株あった (①~④)。そのうち、MLVA 型が一致した 3 組 6 株の菌株 (①~③) はいずれも O157 であった。それぞれの菌株が検出された患者の関連性については、①については、共通事項が無く、どちらも感染源不明であった。②については、家庭での食材購入に同一系列の食料品店を利用していたが、感染源の特定には至らなかった。③については、同一幼稚園の園児であったが、学年およびクラスが別であった。また、食品を介する感染経路も疑い、園内のふき取り検査等も行ったが

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:H7	VT2	434	19m0476			—	2021年6月
O157:H7	VT2	436	21m0133			—	2021年6月
O157:H7	VT2	439	21m0196			—	2021年7月
O157:H7	VT2	442	21m0271		②	○	2021年9月
O157:H7	VT2	443	21m0271		②	○	2021年9月
O157:H7	VT2	446	21m0308			○	2021年10月
O157:H-	VT1+VT2	432	21m0027			○	2021年4月
O157:H7	VT1+VT2	433	21m0029			—	2021年4月
O157:H7	VT1+VT2	435	19m0584	21c018	①	○	2021年6月
O157:H7	VT1+VT2	437	21m0074	21c031		○	2021年6月
O157:H7	VT1+VT2	438	19m0584	21c018	①	○	2021年7月
O157:H7	VT1+VT2	440	21m0177	21c029		○	2021年8月
O157:H7	VT1+VT2	441	20m0169	21c049		○	2021年8月
O157:H7	VT1+VT2	444	21m0332		③	—	2021年10月
O157:H7	VT1+VT2	445	21m0332		③	—	2021年10月
O157:H7	VT1+VT2	447	21m0386	21c051		—	2021年10月
O26:H11	VT1	152	21m2029			○	2021年6月
O26:H- /Hg11	VT1	153	21m2055	21c207	④	—	2021年6月
O26:H- /Hg11	VT1	154	21m2056	21c207	④	—	2021年7月
O48:H45	VT2	157	—			—	2022年3月
O111:H-	VT1+VT2	155	21m3043			—	2021年10月
O156:H25	VT1	156	—			—	2021年10月

EHEC は検出されず感染源の特定には至らなかった。

また、O26 の 2 株 (④) で MLVA コンプレックスが一致した。これらは 1 つの遺伝子座のリピート数が異なる single locus variant (SLV) の関係にあり、MLVA 型は異なる (21m2055 および 21m2056) が、同一の MLVA コンプレックス (21c207) に分類された。患者はどちらも無症状者であり、業態者検便にて菌が検出

されたものであるが、他に共通事項は無く、どちらも感染源不明であった。

血清群が O157 に型別された 16 株について、得られたリピート数を用いて、VT 型ごとに MST を作成した (図 2 および図 3)。

O157 (VT2) の MST (図 2) では、No.434 および No.439 の MLVA 型はそれぞれ異なっていた (19m

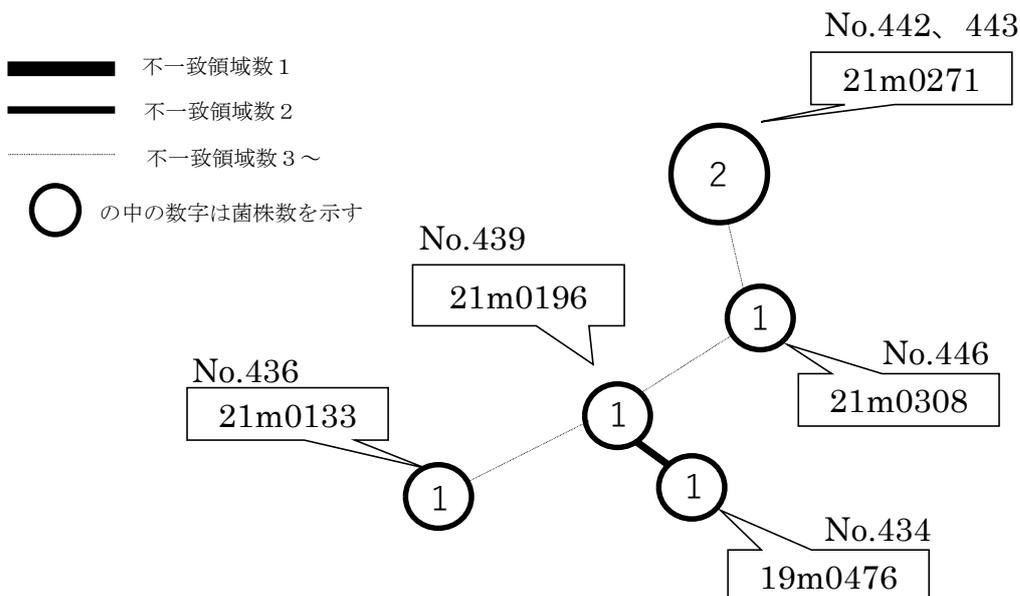


図 2 EHEC O157 (VT2) の MST

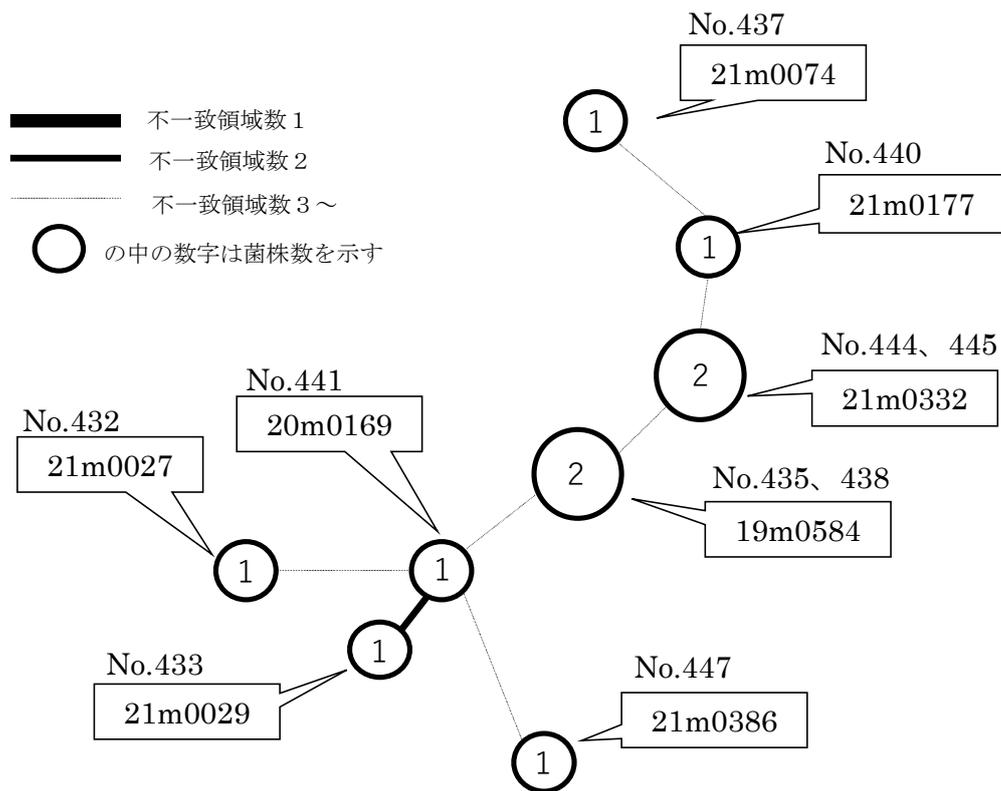


図 3 EHEC O157 (VT1+VT2) の MST

0476 および 21m0196) が、2つの遺伝子座のリピート数が異なる double locus variant (DLV) の関係にあった。しかし、これら 2 菌株が分離された患者に共通事項はなく、どちらも感染源不明であった。

O157 (VT1+VT2) の MST (図 3) では、No.433 および No.441 も MLVA 型はそれぞれ異なっていた (21m0029、20m0169) が、DLV の関係にあった。これら 2 菌株が分離された患者には共通事項がなく、どちらも感染源不明であった。

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 22 株のうち 17 株 (77.3%) は全ての薬剤に感受性を示したが、5 株 (22.7%) はいずれかの薬剤に耐性を示した。

O 血清群別で見ると、耐性を示した株は O157 で 3 株 (n=16、18.8%)、O111 で 1 株 (n=1、100%)、O48 で 1 株 (n=1、100%) であった。

一方、薬剤別で見ると、いずれかの薬剤に耐性を示した 5 株のうち、TC に耐性を示す株が 4 株 (80%) と

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 (16)	TC、ST	1	(6.3)
	ABPC	1	(6.3)
	TC	1	(6.3)
	—*	13	(81.3)
O26 (3)	—*	3	(100)
O111 (1)	ABPC、TC、KM、ST	1	(100)
O156 (1)	—*	1	(100)
O48 (1)	TC	1	(100)

※全ての薬剤 (10種類) に感受性

最も多く、次いで ABPC および ST が各 2 株（40%）であった（重複あり）。

また、CMZ、IPM、MPM、FOM、NFLX、LVFX に耐性を示した株は無かった。

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、2021 年度は 24 件とほぼ横ばいで推移している。全国的に見ると、2020 年は減少しているが、それ以外につ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¹¹⁾。

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、本市の 2021 年度の発生状況も 6 月から 9 月の夏期で全体の 6 割近くを占めていた。発生届によると患者の中には、焼き肉や焼き鳥等を喫食している例もあり、引き続き生肉の取り扱いも含めた食中毒予防の啓発が必要である。

血清型別で見ると、全国的には O 血清群 O157 のみで全体の約半数を占め、次いで O26 が 2 割近くを占めている¹¹⁾。当所においては O157 だけで約 7 割を占めており、O26 については全国に比べ少ない傾向にあった。

無症状由来の菌株（6 株）は O157 が 2 株、O26 が 3 株、O156 が 1 株と様々な O 血清群であり、O26 は全てが無症状由来であった。

有症状者のうち HUS 発症例は 2 件あり、どちらも血清群は O157 であり、年齢は 10 歳未満であった。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¹²⁾されており、本市も同様の傾向であった。

本市に届出があった菌株のうち 10 株が広域的に検出されており、そのうち、最も多く広域的に検出された株は 21cO18 コンプレックスに含まれるものであり、全国的に東日本を中心に 33 株検出されたが、そのほとんどが感染経路不明であった¹³⁾。

型不明で届出があった血清群 O156 については、例年だと全国でも数件しか検出されていないが、2021 年以降では全国で 95 株が検出され感染研へ送付されている（2022 年 3 月 31 日現在）¹⁴⁾。感染研において実施したパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）では少なくとも 64 株が同一の PFGE 型に分類され、本市の菌株も含まれていた。また、感染研において一部の菌株について、全ゲノム解析を行った結果、21 株が非常に近縁であることが判明したが、感染源の特定には至っていない。

型不明で届出された血清群 O48 については、定型 Og-typing PCR では判定できない O48va という非定型 Og 型であり、非常に稀な菌株であった。今年度本市では O156 および O48va という市販の血清では型別できない菌株の届出事例が 2 例あり、O 血清群が多様化していることが示唆された。これらの血清型の検出には特異的なプライマーが必要であることから、EHEC の発生動向を注視し、検査体制を整備するとともに、菌株の収集を継続していくことが重要である。

薬剤感受性試験では、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* を検索するために CMZ、IPM および MPM に対する薬剤感受性を確認したが、この 3 薬剤に耐性を示す菌株は検出されなかった。当所においては 2019 年に NDM 型メタロ β -ラクタマーゼおよび 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¹⁵⁾ ことから、引き続き EHEC における薬剤耐性について調査が必要であると考えられる。

EHEC 感染症における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。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治体に情報を還元していくことが重要である。

また、広域アウトブレイク事例においては、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析も導入されていることから、当所においても新たな解析方法を導入して、多様な手法で解析を実施出来る体制を構築する必要があると考えられる。

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) Iguchi A, Nishi H, Seto K, Mitobe J, Lee K, Konishi N, Obata H, Kikuchi T, Iyoda S : Additional O_g-Typing PCR Techniques Targeting *Escherichia coli*-Novel and *Shigella*-Unique O-Antigen Biosynthesis Gene Clusters, *Journal of Clinical Microbiology*58.11.e01493-20, 2020
- 11) 腸管出血性大腸菌感染症 2022 年 3 月現在, 病原微生物検出情報 43, 103-106, 2022
- 12) 国立感染症研究所感染症疫学センター第四室: 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素症候群, 2021 年, 病原微生物検出情報 43, 110-111, 2022
- 13) 泉谷秀昌, 李謙一, 伊豫田淳, 他 : 2021 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 43, 108-109, 2022
- 14) 李謙一, 伊豫田淳, 泉谷秀昌, 他 : 腸管出血性大腸菌 O156:H/Hg25 の広域散髪発生事例について(速報) 病原微生物検出情報 43, 109-110, 2022
- 15) 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