

# 新潟県における腸管出血性大腸菌の分離状況

— 1996 ~ 1997 年度 —

五十嵐美佳子・丸山 智子・佐々木寿子  
宇野由紀子・寺尾 通徳・後藤 公吉

Keywords: 腸管出血性大腸菌 (EHEC) ; O157; PFGE; RAPD-PCR.

## 1 はじめに

1990年、埼玉県の幼稚園での腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) O157:H7による集団感染事例で園児2名が死亡したことにより、EHECが注目されるようになった。1996年には、岡山県の小学校での集団発生にはじまり、全国で集団・散発事例が多発した。厚生省によると、1996年の有症者数は9,451名、入院患者数1,808名、死者数12名にのぼった。

1996年8月には、腸管出血性大腸菌感染症が指定伝染病に指定された。新潟県においては、腸管出血性大腸菌感染症に係る防疫対策を強化するため、関係機関との連携体制を整備した。それに伴い、保健所・医療機関での細菌検査で分離された菌株を保健環境科学研究所においてベロ毒素 (Vero toxin: VT) 産生試験を実施したところ、1996~1997年度の2年間にEHEC感染24事例を経験した。そこで、血清型別、ベロ毒素型別、パルスフィールド電気泳動 (Pulsed-field gelelectrophoresis: PFGE), RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction) による疫学的解析を行ったので成績を報告する。

## 2 方 法

### 2.1 供試菌株

保健所・医療機関で分離され、当所でベロ毒素産生試験を実施した109株。医療機関で分離され、ベロ毒素産生が確認され、当所に分与された5株の計114株。

菌株の由来内訳は、患者49株、患者家族13株、食中毒患者及び調理従事者9株、海外渡航者12株、給食従事者17株、食品・環境検体8株、その他6株。

### 2.2 ベロ毒素産生遺伝子・ベロ毒素の型別

PCR法によりベロ毒素産生遺伝子が検出された菌株について、RPLA (逆受身ラテックス凝集反応) 法によりベロ毒素の型別を行った。PCR法はKarchとMeyerのプライマー<sup>1)</sup>を使用し、PCRのプログラムは、熱変性94°C30秒、アニーリング47°C1分、伸長72°C90秒を30サイクル実施した。RPLA法は、ベロ毒素検出用キット (デンカ生研) を

使用した。

### 2.3 パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

制限酵素 *Xba*I を使用し、酵素消化の反応条件は30U/検体、37°C6時間とした。

泳動装置はCHEF-DR II (Bio-Rad)、泳動用バッファーは0.5×TBE 2L、ゲルは1% PFC アガロース (Bio-Rad) を使用した。泳動のパラメータは、Block 1 電圧6V泳動時間13時間、パルスタイム4~8秒、Block 2 電圧6V泳動時間11時間、パルスタイム8~50秒で行った。その後、エチジウムブロマイドで染色し、ポラロイドカメラで撮影した。泳動パターン分類は、国立感染症研究所で使用されている分類法<sup>2)</sup>によって行った。

### 2.4 RAPD-PCR

プライマーは10-mer kit G11 (Operon) を使用し、PCRのプログラムは、熱変性93°C30秒、アニーリング55°C30秒、伸長72°C1分を35サイクル実施した。その後、1.2%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、ポラロイドカメラで撮影した。泳動パターン分類は、国立感染症研究所で使用されている分類法<sup>2)</sup>によって行った。

## 3 結 果

### 3.1 血清型別株数及びベロ毒素産生株数

供試菌株114株の血清型内訳は、O157 32株、O1 21株、O111 16株、O26 10株、その他35株で、そのうちベロ毒素を産生した株は、O157 25株 (78.1%)、O26 9株 (90.0%) であった (表1)。

O157、O26以外の血清型の株はいずれもベロ毒素を産生しなかった。

### 3.2 月別 EHEC 分離状況

ピークは1997年7月にみられ、春から夏にかけて多く分離されたが、年間を通して分離された (表2)。

### 3.3 血清型

ベロ毒素を産生した34株の血清型内訳はO157:H7 23株、O157:HNM 1株、O157:H45 1株、O26:H11 7株、O26:HNM 1株、O26:HNT 1株であった (表3~6)。

表1 血清型別件数及びベロ毒素産生(陽性)株数

血液型	1996年度		1997年度		計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数
O157	7	3	25	22(4)	32	25(4)
O1	5	0	16	0	21	0
O111	10	0	6	0	16	0
O26	1	1	9	8(1)	10	9(1)
O128	5	0	4	0	9	0
O6	2	0	6	0	8	0
O153	1	0	6	0	7	0
O18	0	0	4	0	4	0
O25	0	0	2	0	2	0
O115	0	0	2	0	2	0
O126	1	0	1	0	2	0
O55	0	0	1	0	1	0
計	32	4	82	30(5)	114	34(5)

( ) : 医療機関より分与された株数, 再掲

表2 月別EHEC分離状況

分離年月	O157	O26	計
96. 6	1	0	1
96. 8	1	0	1
96. 9	0	1	1
97. 3	1	0	1
97. 4	3	0	3
97. 5	2	0	2
97. 6	2	3	5
97. 7	5	3	8
97. 8	3	0	3
97. 9	1	0	1
97.10	1	0	1
97.11	0	1	1
97.12	3	1	4
98. 3	2	0	2
計	25	9	34

表3 O157家族内感染事例

事例	分離年月	保健所	血清型	VT型	年齢	性別	臨床症状	続柄	PFGE型			RAPD-PCR型
									<100kb	100~200kb	350kb	
1-1*)	97. 4	長岡	O157:H7	1&2	10	男	腹痛, 下痢	本人	II a	II b	I	II e
1-2	97. 4	長岡	O157:H7	1&2	39	女	症状なし	母	II a	II b	I	II e
1-3	97. 4	長岡	O157:H7	1&2	14	女	症状なし	姉	II a	II b	I	II e
2-1	97. 5	上越	O157:H7	1&2	16	女	腹痛, 下痢, 発熱	本人	II a	II b	III	II e
2-2	97. 5	上越	O157:H7	1&2	46	女	症状なし	母	II a	II b	III	II e
3-1*)	97. 7	長岡	O157:H7	2	1	女	腹痛, 下痢	本人	III a	ND	III	II e
3-2	97. 7	長岡	O157:H7	1&2	30	男	症状なし	父	III a	ND	III	II e
3-3	97. 7	長岡	O157:H7	2	35	男	症状なし	接触者	III a	ND	III	II e
3-4	97. 7	長岡	O157:H7	2	28	女	症状なし	接触者	III a	ND	III	II e
4-1	97.12	小出	O157:H7	2	1	女	嘔吐, 下痢, 血便	本人	III g	ND	ND	II e
4-2	97.12	小出	O157:H45	2	4	女	症状なし	姉	III g	ND	ND	II e
5-1	98. 3	六日町	O157:H7	1&2	5	女	腹痛, 下痢, 血便	本人	ND	ND	ND	NT
5-2	98. 3	六日町	O157:H7	1&2	3	女	症状なし	妹	ND	ND	ND	NT
6-1	97. 9	新津	O157:H7	2	35	女	症状なし	母	II a	ND	II	II e

ND : その他の型 NT : 検査未実施

\*) : 医療機関より分与された株

表4 O157散発事例

事例	分離年月	保健所	血清型	VT型	年齢	性別	臨床症状	PFGE型			RAPD-PCR型
								<100kb	100~200kb	350kb	
1	96. 6	相川	O157:H7	1&2	18	女	下痢, 腹痛, 血便	II a	II c	I	II e
2	96. 8	小出	O157:H7	1&2	18	男	下痢, 腹痛, 血便	ND	ND	I	II e
3	97. 3	村上	O157:H7	1&2	22	女	下痢, 腹痛, 血便, 発熱	II a	II b	I	NT
4	97. 6	長岡	O157:H7	1&2	14	男	下痢, 腹痛	型別不能			II e
5	97. 7	六日町	O157:H7	2	29	男	腹痛, 血便	III c	ND	ND	II e
6	97. 8	三条	O157:H7	1&2	41	男	下痢, 腹痛, 血便	II a	II b	I	II e
7	97. 8	小出	O157:H7	1&2	15	男	下痢, 腹痛, 血便, 発熱	II a	ND	I	II e
8	97.10	村上	O157:HNM	2	54	女	症状なし	II a	ND	III	NT
9	97.12	新津	O157:H7	1&2	4	男	腹痛, 血便	II a	ND	I	NT
10*)	97. 6	長岡	O157:H7	1&2	11	男	下痢, 腹痛, 血便, 発熱	型別不能			NT
11*)	97. 8	長岡	O157:H7	2	46	男	下痢, 腹痛, 発熱, 嘔吐	III a	ND	III	NT

ND : その他の型 NT : 検査未実施

\*) : 医療機関より分与された株

表5 O26家族内感染事例

事例	分離年月	保健所	血清型	VT型	年齢	性別	臨床症状	続柄
1-1	97.6	長岡	O26:H11	1	27	女	症状なし	母
1-2	97.6	長岡	O26:H11	1	57	男	症状なし	祖父
2-1	97.7	柏崎	O26:H11	1	14	女	下痢, 腹痛, 血便	本人
2-2	97.7	柏崎	O26:H11	1	73	女	症状なし	家族
3-1	97.7	長岡	O26:H11	1	24	女	症状なし	母

表6 O26散発事例

事例	分離年月	保健所	血清型	VT型	年齢	性別	臨床症状
1	96.9	長岡	O26:H11	1	3	男	下痢
2	97.6	新発田	O26:H11	1	57	女	腹痛, 血便
3	97.12	小出	O26:H11	1	35	女	急性腸炎
4*)	97.11	長岡	O26:HNT	1	1	女	下痢

\*) : 医療機関より分与された株

3.4 毒素型

ベロ毒素を産生した34株の毒素型は、O157ではVT1&2産生株は16株(64%), VT2産生株9株(36%)であった。O26ではVT1産生株9株(100%)であった(表3~6)。

3.5 臨床症状

EHEC感染者のうち、患者(有症者)の占める割合は、O157では25人中15人(60.0%), O26では9人中5人(55.6%)であった。保菌者(無症状者)の内訳は、O157では患者家族9人、給食従事者1人、O26では患者家族4人であった(表3~6)。

また、O157感染患者(有症者)15人中、血便が10人(66.7%), 下痢が13人(86.7%), 腹痛が14人(93.3%)に認められた(表7)。O26感染患者(有症者)5人中、血便が2人(40.0%)に認められた(表5, 6)。

O157の年齢別保菌者は、15歳以下が11人中3人(27.3%), 16歳以上が14人中7人(50.0%)であり、16歳以上のほうが保菌者の割合が高かった(表7)。

3.6 O157のPFGE型, RAPD-PCR型

PFGE型は、家族内感染事例1~4において、各事例ごとに同一のパターンを示した(表3, 図1)。散発例では

表7 O157の年齢別臨床症状

年齢	≤1	2~5	6~15	16~39	≥40	計
人数	2	4	5	10	4	25
血便	1	2	2	4	1	10
下痢	2	1	4	4	2	13
腹痛	1	2	4	5	2	14
発熱	0	0	2	1	1	4
無症状	0	2	1	5	2	10

PFGE型で同一パターンを示す菌はなかった(表4)。また、PFGE型で、地域による特徴は認められなかった。

RAPD-PCR型は散発例、家族内感染事例ともに全て同じ型であった(表3, 4)。

4 考 察

4.1 分離状況, 臨床症状

1997年に全国で分離されたEHECの内訳は、O157 76.2%, O26 18.0%, O111 3.5%, その他2.3%となっている<sup>3)</sup>。当所で1996~1997年度に分離したEHECはO157(73.5%)とO26(26.5%)のみで、O111が分離されなかった以外は全国と同様の結果が得られた。

全国の月別EHEC分離状況は、1996, 1997年のピークは共に7月にみられ、年間を通して分離された<sup>3)</sup>。新潟県も同様に1997年7月にピークがみられ、年間を通して分離された。

PCR法でベロ毒素産生遺伝子が検出された株は全て

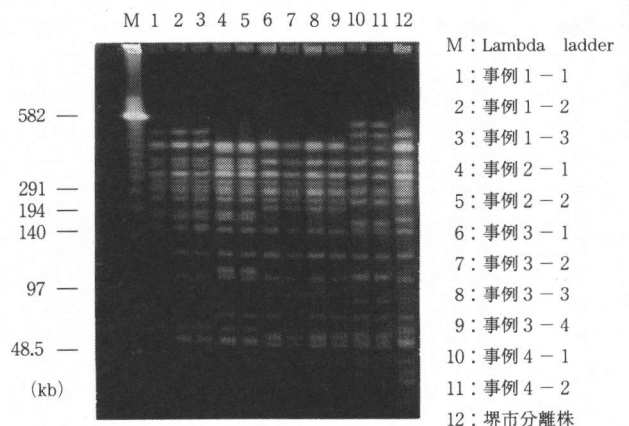


図1 O157 家族内感染事例のPFGE

RPLA 法により毒素産生性が確認され、甲斐らの報告<sup>4)</sup>と同様の結果が得られた。

1997年に全国で分離されたO157:H7はVT1&2を産生する株が67.2%、VT2のみを産生する株が31.1%、VT1のみを産生する株が1.4%であったが、他の血清型はVT1のみを産生する傾向がみられた<sup>3)</sup>。新潟県でもほぼ同様の傾向がみられた。

VT2はVT1より病原性が強い<sup>5)</sup>といわれているがVT型と症状の重さとの関連は不明である。

O157の全国の年齢別臨床症状は、15歳以下では16歳以上に比べて血便、下痢が認められた人の割合が高く、無症状の人の割合が低いという特徴がみられた<sup>3)</sup>。新潟県では15歳以下で無症状の人の割合が低かった以外に特徴は認められなかった。

全国においては、EHEC感染者の15歳以下の割合が1995年以前は86%、1996年には76%、1997年には54%にまで減少した<sup>3)</sup>。新潟県では31人中14人(41.2%)が15歳以下であった。このことから、従来はEHECの感染は若年層を中心に考えられていたが、最近では若年層に限られなくなっている。

#### 4.2 PFGE型, RAPD-PCR型

国立感染症研究所は1996年のO157のPFGEパターンを大きく6つに分類した<sup>2)</sup>。グループIは5、6月に岡山での集団発生から分離された菌が示すパターンで、これは全国で散発例として1996年11月まで分離され続けた。グループIIは7月中旬に大阪府堺市での集団発生から分離された菌が示すパターン、グループIIIは10月に北海道帯広市での集団発生から分離された菌が示すパターン、グループIVは7月に群馬県での集団発生から分離された菌が示すパターン、グループVは6月に神奈川県での散発例から分離された菌が示すパターン、グループVIは8月に北海道千歳市で分離された菌が示すパターンであると報告している。

1996年に県内の散発例で分離された2株は共に集団発生例のグループIからVIに分類できないものであった。

1997年は全国で主に散発事例、特に家族内発生事例が続いて起こった。3月中旬に愛知県、神奈川県など広域に散発事例が多発したが、ほとんどの株が1996年の堺市分離株と同じPFGEパターン(II)を示した<sup>6)</sup>。

1997年、県内でも3月の散発事例3、4月の家族内事例1で堺市分離株と同じPFGEパターン(II)を示す株が分離された。愛知県や神奈川県の散発事例と発生時期に近いが、疫学的関連は不明である。

新潟県で分離された株のうち、PFGE型で同一パターン

を示す菌は、同一感染によると考えられる家族内感染のみで、事例間では異なるパターンを示した。散発例では同一パターンを示す菌はなかった。このことから、県内はすでに数多くの異なるPFGEパターンを示す菌が広まっていると考えられる。

今回、RAPD型はすべて同じ型であったが、RAPDI型とPFGEI型との間で97%以上一致すること<sup>2)</sup>、PFGE型別に1週間を要するのに対し、RAPD型別には数時間しかかからないことから、RAPD-PCRは疫学に有用であると考えられる。

#### 4.3 感染源

今回の県内24事例では感染源が解明されなかったが、この菌が他の食中毒菌に比べて非常に少量の菌で感染が成立する<sup>7)</sup>ため、原因食品からの菌の分離は困難であったと考えられる。原因食品の汚染経路の究明を図るためには食品からの菌検出法の改良を進める必要がある。

### 5 ま と め

- (1) 1996~1997年度に114件の大腸菌菌株のベロ毒素産生検査を行った。その内、ベロ毒素産生株はO157 25株(78.1%)、O26 9株(90.0%)であった。
- (2) 家族内感染事例はO157 6事例、O26 3事例発生した。散発例はO157 11事例、O26 4事例発生した。O157家族内感染事例ではPFGE型、RAPD-PCR型が一致し、事例間でPFGE型がそれぞれ異なっていた。O157散発例では、PFGE型がそれぞれ異なっていた。
- (3) 数多くの異なるPFGE型パターンのO157が新潟県内に広がっており、PFGE、RAPD-PCRは疫学において、その重要性が今後増すものと思われる。

### 文 献

- 1) Karch, H., Meyer, T.: J. Clin. Microbiol, **27**, 2751 (1989).
- 2) 国立感染症研究所: 腸管出血性大腸菌O157の検出・解析等の技術研修マニュアル (1997).
- 3) 感染症情報センター: 病原微生物情報月報, **19**, 122 (1998).
- 4) 甲斐 明美 他: 感染症学雑誌, **71**, 248, (1997).
- 5) 山本 達男: 臨床と微生物, **23**, 781, (1996).
- 6) 渡辺 治雄: 臨床と微生物, **25**, 167 (1998).
- 7) 甲斐 明美, 尾畑 浩魅, 伊藤 武, 工藤 泰雄: 臨床と微生物, **23**, 827 (1996).