

宮城県内における近年の腸管出血性大腸菌感染症の動向

Recent trend of Enterohemorrhagic Escherichia coli Infection in Miyagi

木村 葉子 渡邊香織 山口友美 後藤郁男*1
畠山 敬 渡邊 節 佐藤俊郎*1

Yoko KIMURA, Kaori WATANABE, Yumi YAMAGUCHI, Ikuo GOTO,
Takashi HATAKEYAMA, Setsu WATANABE, Toshiro SATO

近年の腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、主流である O157 や O26 以外の血清型を原因とする事例が全国的に増加傾向にある。そこで、県内（仙台市を除く）で過去 5 年間に分離された EHEC を精査し、その発生動向を検証したところ、全国と同様に O157、O26 以外の血清型の増加が確認された。さらに、EHEC145 による広域感染症事例、O 抗原型が変化した事例などの特徴的な事例が含まれている事が判明した。また、平成 25 年度に検出した EHEC の発症と病原因子との関連性を調査した結果、菌の付着等に関わる *eaeA* の保有率に相違があり、発症に *eaeA* が関与している可能性が示唆された。

キーワード：腸管出血性大腸菌；血清型；O 抗原遺伝子；*eaeA*

Key words: Enterohemorrhagic *E.coli*; serotype; O antigen gene; *eaeA*

1 はじめに

EHEC 感染症は、感染症法において三類感染症に指定されており、全数把握疾患として、診断した医師は保健所に届出することが義務づけられている。過去 10 年間における有症者と無症状病原体保有者を合わせた全感染者数は毎年 4,000 人前後の報告で推移している¹⁾。EHEC の代表的な血清型としては O157 や O26 が知られており、血清型別の検出頻度を年度別に見ると、平成 15 年では O157 が 70%、O26 が 20%と、この 2 つの血清型で全体の 90%を占めていたが、平成 23 年には O157 が 59%、O26 が 21%、平成 24 年は O157 が 53%、O26 が 27%と、ここ最近の 2 年間は 80%まで減少しており、特に O157 の減少が顕著である¹⁾。このように近年の EHEC 感染症は、これまで主流となっている O157、O26 以外の血清型を原因とする事例が全国的に増加傾向にある。

そこで本研究では、県内で過去 5 年間に分離された EHEC を精査し、その発生動向を検証した。さらに EHEC における発症と病原因子との関連性を調査したので報告する。

2 対象及び検査方法

2.1 対象

EHEC の発生動向の検証には、平成 20～24 年度に分離された患者由来の EHEC 菌株 189 株、患者家族や接触者の便から検出した 198 株及び水から検出した 1 株の計 388 株を対象とした。また、平成 25 年度に O157、O26、O 血清型不明（OUT）の初発患者より検

出した 39 株については、発症と病原因子との関連性について調査を実施した。

2.2 方法

2.2.1 EHEC 分離同定

菌の分離は、平板培地には DHL 寒天培地（栄研化学）、クロモアガーSTEC（関東化学）、各種糖を添加した CT・マッコンキー寒天培地（自家調整）等の選択培地を使用し、増菌培地には mEC 培地（日水製薬）を使用した。平板培地上に発育した疑わしいコロニーについて、TSI 寒天培地（栄研化学）、LIM 培地（日水製薬）に接種し、生化学性状を確認した。大腸菌が分離された場合は血清型別試験を実施した。ペロ毒素の有無は、EVT-1・EVT-2 及び EVS-1・EVS-2（TAKARA）を用いた PCR 法によるペロ毒素遺伝子の検出と、VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研）を用いた逆受身ラテックス凝集反応による毒素産生試験により確認した。

2.2.2 菌株の遺伝子解析

分離した EHEC 菌株は、全て制限酵素 *Xba* I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を実施した。CHFF Mapper（BIO RAD 社）を用い、パルスタイム 2.2～54.2 秒、泳動時間 19 時間の条件で行った。解析には Fingerprinting II（Dice）を用いて遺伝子型を比較した。

2.2.3 病原因子保有状況調査

平成 20 年に調理従事者等の検便検査の項目が変更され、EHEC については血清型が O157 のみであったものが、全ての EHEC が対象となった²⁾。その結果、県内では無症状病原体保有者が増加してきている。

*1 現 食肉衛生検査所

表 1 大腸菌病原因子検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	PCR産物 サイズ(bp)
<i>eaeA</i>	mSK1	CCGGCACAAGCATAAGC	310
	eaekas_a	TGGCAAAATGATCTGCTG	
<i>bfpA</i>	EP1	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	326
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	
<i>aggR</i>	AggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254
	AggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
<i>astA</i>	EAST-1S	GCCATCAACACAGTATATCC	106
	EAST-1AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	

そこで EHEC における発症と病原因子との関連を調べるため、平成 25 年度の対象 39 株について、菌の定着等に関わる 4 種類の病原因子 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*, *astA*) の保有状況について、表 1 に示したプライマーを用いて PCR 法により検索し、症状との関連性を検証した。

3 結果

3.1 過去 5 年間における EHEC 検出状況

平成 20~24 年度に検出された EHEC を O157, O26, その他の血清型に分け、その検出割合を比較したものを図 1 に示した。宮城県では O26 の割合が多い特徴があることが報告されているが³⁾、この 5 年間においても同様の傾向が確認された。また、平成 23 年度から O157, O26 以外の血清型の割合が特に増加し、全体の約 50%を占めていた。

表 2 に、県内の O157, O26 以外の血清型の検出状況を示した。事例数、血清型の種類とも年々増加傾向にあり、平成 20 年度では 12 事例 6 種類であったが、平成 24 年度では 22 事例 10 種類であった。また、平成 22 年度からは OUT 株が毎年検出されており、その大半は無症状病原体保有者からの検出であった。

さらに個々の事例について検証を行った結果、複数の特徴的な事例が含まれていることが判明した。

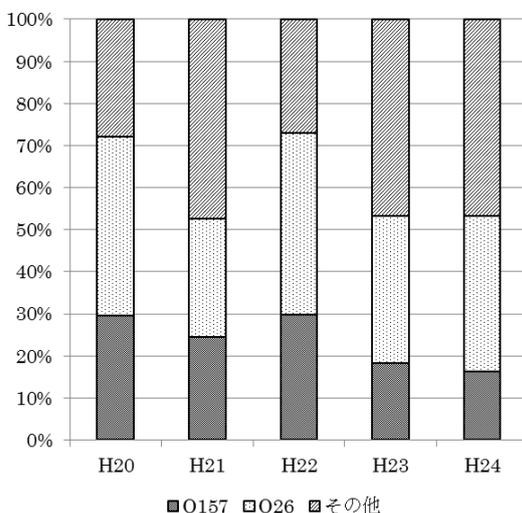


図 1 県内で検出した EHEC の血清型別割合の推移

表 2 O157, O26 以外の血清型検出状況

年度	事例数	血清型数	種類
H20	12	6	O91,O103,O111,O119,O121,O146
H21	10	5	O74,O103,O111,O121,O145
H22	17	7	O91,O103,O111,O121,O124,O127a,OUT
H23	22	8	O15,O55,O91,O103,O111,O121,O145,OUT
H24	22	10	O6,O55,O74,O91,O103,O111,O121,O145,O159,OUT

3.2 特徴的な事例の検証

3.2.1 EHEC0145 による広域感染症事例

平成 24 年度は県北部で同時期に 3 件の O145 事例が発生した。本事例を含め、過去 5 年間の 5 事例について PFGE 法による遺伝子型の比較を行った結果、平成 24 年度の事例から検出された菌株は他年度に検出したものと明らかに異なる遺伝子型を示しており、県内で新たなタイプの O145 株が広範囲で流行していたことが明らかとなった (図 2)。

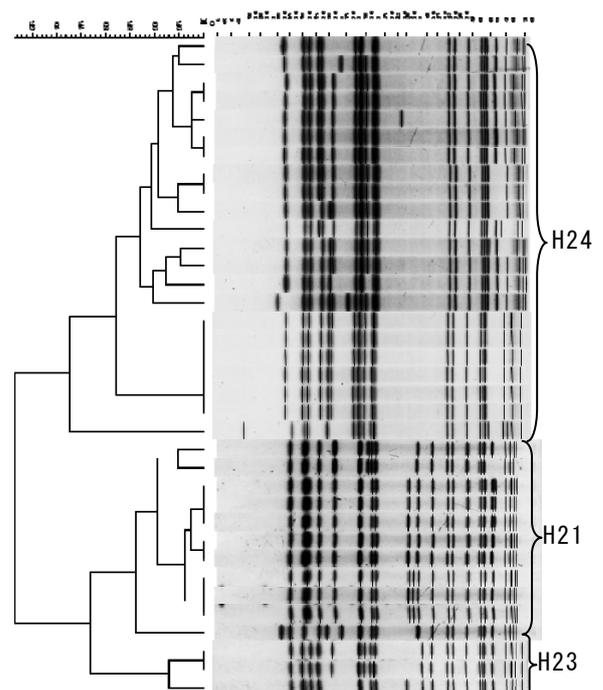


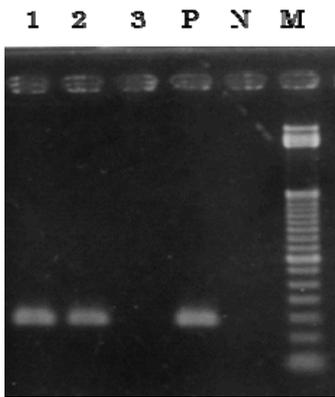
図 2 O145 の PFGE 解析結果

3.2.2 O 抗原型が変化した事例

平成 24 年度に家族内で発生した O26 事例では、患者を含む家族 10 名を調査し 5 名から EHEC を検出した。このうち 4 名から O26:H11 VT1 株を検出したが、残り 1 名からは OUT:H11 VT1 株が検出された。そこで O26 の O 抗原遺伝子 *wzx* を検出するプライマーを用いた PCR 法及び PFGE 法による精査の結果、OUT 株についても O26 抗原遺伝子を保有しており、血清型が変化したものであることが判明した（表 3、図 3、4）。

表 3 O26 抗原遺伝子検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列(5'→3')	PCR産物 サイズ(bp)	文献
wzx	F	GCGCTGCAATTGCTTATGTA	152	4)
	R	TTTCCCCGCAATTTATTCAG		



- ・ レーン1：本事例OUT株
- ・ レーン2：本事例O26株
- ・ レーン3：他事例OUT株

図 3 O26wzxPCR 結果

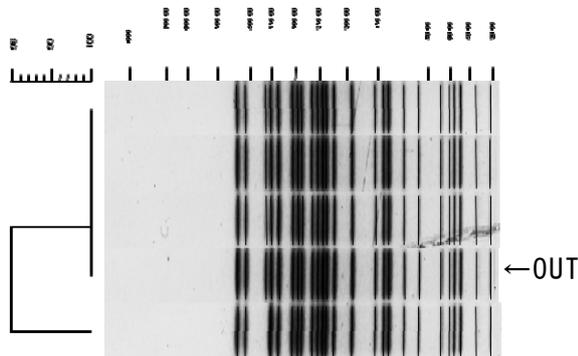


図 4 O26PFGE 解析結果

3.3 病原因子保有状況

各血清型の症状の有無と病原因子の保有状況を表 4 に示した。症状については、O157 では 100%，O26

では 92%の人が症状を呈していたのに対し、OUT ではわずか 20%であった。病原因子の保有状況については、*eaeA* の保有に相違が見られ、O157 及び O26 では 100%保有していたが、OUT では 33%にとどまった。また、有症者については 100%の保有率であることから、EHEC 感染症の発症に *eaeA* が関与している可能性が唆された。*eaeA* 以外の病原因子については、明確な関連性は認められなかった。

表 4 病原因子保有状況

血清型	症状あり	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>
O157	12/12(100%)	12/12(100%)	0	0	0
O26	11/12(92%)	12/12(100%)	0	0	3/12(25%)
OUT	3/15(20%)	5/15(33%)	0	0	2/15(13%)

4 考察

O157, O26 以外の血清型を原因とする EHEC 感染症事例は、近年全国的に増加傾向であるが、宮城県においても同様で、その傾向は全国より顕著であることが確認された。この傾向の理由の一つとして、遺伝子検査の導入が考えられる。EHEC のうち、培養による分離法が確立されている血清型は O157, O26 を含め数種類のみである。遺伝子検査によりベロ毒素の有無が早期に判明することから、培養のみでは分離が難しい血清型についても検出できる確率が高くなり、その結果検出数が増加しているものと思われる。

平成 24 年度の O145 広域感染症事例では、人や食品を介した感染の可能性が考えられ、各保健所において調査を実施したものの原因究明には至らなかった。複数の保健所が関わる事例については、関係機関の連携を強化し、原因究明をする必要があると考える。O26 の事例で検出された OUT 株は、同一事例の中で O 抗原型が何らかの原因により変化したものであった。本事例のように O 抗原型が変化したもの以外にも、初発患者の届出と異なる血清型の EHEC を本人や家族から検出する事例は年間複数発生しており、EHEC の検査は当初の想定とは異なる結果を生じる場合が少なくない。事例に的確に対応するためには、疫学情報に加え、遺伝子検査法などを駆使しながら様々な可能性を想定して検査を進めていくことが重要であると考えられる。

EHEC の発症と病原因子との関連性について、O157, O26 の感染者の多くは発症者または有症者として発見されるが、OUT は職場の定期検便などから無症状病原体保有者として届出されることが多い。EHEC の発症機序には、菌の腸管付着に関わる因子に係る遺伝子である *eaeA* が関与しているとの報告がある^{5)~7)}。今

回の調査でも O157, O26 は全て *eaeA* を保有していたのに対し, OUT の約 6 割は保有していなかった。また有症者においては保有率が 100% という結果となり, これらの報告を支持するものであると思われる。しかし, *eaeA* 以外の病原因子 *bfpA*, *aggR*, *astA* については, 今回の結果から発症との明確な関連性は確認できなかった。これらの解明は今後の課題であると考える。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌感染症 2014 年 4 月現在。病原微生物検出情報 35 : 117-118, 2014.
- 2) 平成 20 年 6 月 18 日付厚生労働省通知 食安発第 0618005 号
- 3) 山口友美, 田村広子, 佐々木美江, 島山敬, 御代田恭子, 秋山和夫：宮城県保健環境センター年報, 22, 42 (2004)
- 4) Appl. Environ. Microbiol. 70 1830 (2004)
- 5) Boerlin P, McEwen S, Boerlin-Petzold F, et al. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-1 Escherichia coli and Disease in Humans. J Clin Microbiol. 1999;37(3):497 - 503.
- 6) 熊谷奈々子, 須釜久美子, 平澤恭子, 長沢正秋, 渡部啓司：福島県衛生研究所年報, 23, 39-42 (2005)
- 7) 中居真代, 宮崎麻由, 那須務, 佐藤由紀, 渡邊節, 沖村容子：宮城県保健環境センター年報, 30, 23-26 (2012)