

沖縄県における腸管出血性大腸菌O157およびO26の発生状況、 薬剤耐性および分子疫学的解析について (1996~1997)

久高 潤・大野 惇・糸数清正・大城直雅・安里龍二・徳村勝昌

Drug-resistance and Genotypic Analysis of enterohemorrhagic *Esherichia coli* O157 and O26 in Okinawa

Jun KUDAKA, Atsushi OHNO, Kiyomasa ITOKAZU, Nomasa OSHIRO,
Ryuji ASATO and Kastumasa TOKUMURA.

要旨：腸管出血性大腸菌O157およびO26について、菌疫学的解析を目的とし、県内の発生状況、分離株の薬剤耐性、パルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析を行った。

1996年6月から1997年12月にかけて沖縄県で発生した腸管出血性大腸菌症は25事例82名であり、その内O157によるものが11事例、29名およびO26によるものが11事例、49名で、O26の患者の占める割合が高かった。26事例中8事例は集団発生で、いずれも保育園での発生であった。遺伝子解析の成績より、ヒトや食品等から分離されたO157の35株は大きく8型に分類され、サブタイプを含めると10型に分類できた。また、O26の50株は大きく7型、サブタイプを含めると8型に分類できた。また、1997年6月に発生したO157:H7 (VT2) による3名の家庭内散发事例においては、患者由来株と喫食した牛肉および別の場所で保管されていた同一牛肉から分離されたO157が、PFGE法による遺伝子解析の結果、すべて同一であることが確認され、牛肉が感染源であることが特定できた。

Key words : Enterohemorrhagic *Esherichia coli*, EHEC O157, EHEC O26, pulsed-field gel electrophoresis, Drug resistance, Okinawa.

I はじめに

1996年5月末に病原大腸菌O157による食中毒が岡山県の小学校で発生したのを発端として、O157による食中毒は中国、関西地方を中心に全国的に多発、7月に大阪府堺市の小学校を中心に発生した食中毒では患者数が5,000人を越え、世界的にも類を見ない大規模のものとなった。そして厚生省は1996年8月6日、O157をはじめとした腸管出血性大腸菌感染症を指定伝染病に指定した。

沖縄県では1996年6月より1997年12月までに26事例、82名の腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染者が発生している。今回これらの事例についての菌疫学的解析を目的として、沖縄県内での発生状況、分離株の薬剤耐性およびパルスフィールド電気泳動 (Pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) 法を用いて、そのRFLP (Reaction fragment length polymorphism) により各分離株の遺伝子型別を行ったので報告する。

II 材料および方法

1. 供試菌株

1996年6月より1997年10月までに沖縄県衛生環境研究所において分離または送付されてきたEHEC O157, 36株 (患者由来株29株, 食材由来株4株, 牛糞由来株1株, 環境由来株1株, イエバエ由来株1株), およびEHEC O26, 50株 (患者由来株49株, 環境由来株1株) の計86株について試験を実施した。

2. ペロ毒素 (VT) 産生試験

ペロ毒素は逆受身ラテックス凝集反応 (デンカ生研) またはPCR法 (primer: EVC-1,2, EVS-1,2, EVT-1,2 : TaKaRa) によりVT1, VT2を決定した。

3. 薬剤耐性試験

感受性ディスク (BBL) を用い、KB法により実施した。供試薬剤はアンピシリン (ABPC), カナマイシン (KM), エリスロマイシン (EM), テトラサイクリン (TC), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), フォスフォマイシン (FOM), クロラムフェニコール (CP), スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST), ナリジクス酸 (NA) の10薬剤である。

4. PFGE法による遺伝子解析

アガロースブロックの作成; トリプチケース・ソイ・ブイヨン10mlで37℃, 16時間培養した菌体を洗浄後, 1.6% Low Melt Preparative Grade Agarose に包埋した. このアガロース・プラグをLysozymeとProteinase Kにより溶菌処理し, DNAアガロースプラグを作成した.

制限酵素による処理; DNAアガロース・プラグを, 制限酵素Xba-Iで37℃, 16時間消化処理した.

パルスフィールド電気泳動; 酵素処理したDNAアガロース・プラグを1% Molecular Biology Certified Agarose に包埋し, GenePath System(BIO RAD)を用い, program 23-O157 JAPANにて泳動した.

III 結果

1. 腸管出血性大腸菌感染症発生状況

本県では1996年6月より1997年12月の間に25事例, 82名のEHEC感染者が報告されている. その血清型の内訳はO157:H7によるものが11事例, 感染者数29名, O26:H11によるものが11事例, 感染者数49名, その他O111:H-が2事例2名, O153:H-が1事例1名であった. 感染者の約6割がO26:H11を原因菌とする事例で占められており, 全国(13%:1997³⁾)に比し非常に高率であった. EHEC感染者を年齢別にみると低年齢層の占める割合が高く, 特に0歳~2歳までの乳・幼児期で約68.3%を占めていた(表1). 臨床症状については, 下痢を主症状

表1. 血清型および年齢別腸管出血性大腸菌症感染者数.

年齢 (歳)	血清型				計(%)
	O157	O26	O111	O153	
0-2	13	42	1	0	56 (68.3)
3-15	8	6	1	0	15 (18.3)
16-56	7	1	0	1	9 (11.0)
60-	1	0	0	0	1 (1.2)
不明	1	0	0	0	1 (1.2)
合計	29	48	2	1	82
(%)	(35.4)	(59.8)	(2.4)	(1.2)	

とする比較的軽症者が多く, 血便がみられたのがO157で20.7%, O26で8.2%, HUS(溶血性尿毒症候群)の併発したのがO157で3.4%であった. また, O26, O157共に4割強の無症状者が存在した. 腹痛を訴えた患者の割合が低いが, これについては0~1歳児は, 言葉で腹痛を訴えることが出来なかったことも考慮する必要があると思われる(図1).

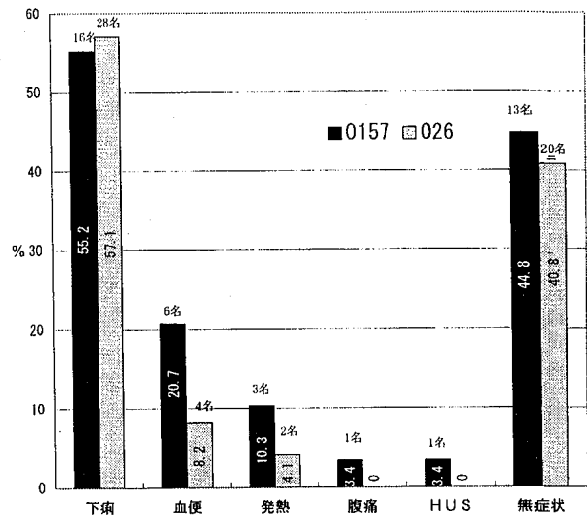


図1. 腸管出血性大腸菌 O157および O26の臨床症状出現率.

(1) EHEC O157の発生状況

表2にEHEC O157の発生状況の一覧を示す. 11事例, 29名の感染者が発生した. 11事例のうち, 9事例が散発的発生でそのうち2事例において家族内感染が認められた. また, 2事例の集団発生はいずれも保育園であった. 発生原因については, 事例10の家庭内発生(患者数3名)において, 患者宅に喫食後, 保存されていた原材料の冷凍牛肉よりO157:H7(VT2)が検出された. また, 患者宅とは別の場所で保存されていた同一個体由来の牛肉からも同様にO157:H7(VT2)が検出され, このことから, この事例においては牛肉が感染源であったことが特定できた. 保育園における2つの集団発生事例では, 発生原因が共通の食品を介して感染したのか, あるいは園内での二次感染であったかは不明であるが, 両事例とも, 家庭内においても感染者が発生し, 感染力の強さが伺えた.

H抗原は1事例10株(事例9)が非運動性株(H-)であり, その他は全てH7であった. VT産生性については7事例(16株)がVT2単独産生株でVT1およびVT2産生株が4事例(13株), VT1単独産生株はみられなかった.

(2) EHEC O26の発生状況

表3に本県におけるEHEC O26の発生状況の一覧を示す. 11事例, 49名の感染者が発生した. 5事例が散発的発生でそのうち1事例において家族内感染が認められた. また, 6事例の集団発生はいずれもO157の場合と同様, 保育園であった. どの事例においても発生原因が共通の食品を介して感染したのか, あるいは園内での二次感染であるかは不明であった. 園児感染者42名のうち38名(90.5%)が2歳以下で, 糞便の自己管理が不十分な年齢層で占められていた.

表2. 腸管出血性大腸菌O157の発生状況(1996~1997).

事例	発生日	地域	血清型	VT型	散/集発	感染者数	備考
1	96.6	本島中部	O157:H7	1&2	散発	1	
2	96.7	豊見城村	O157:H7	2	散発	1	
3	96.7	石川市	O157:H7	1&2	散発	1	
4	96.9	M離島	O157:H7	2	散発	1	
5	96.11	本部町	O157:H7	2	散発	1	HUS
6	96.12	I離島	O157:H7	2	集発	5	A保育園, 家庭内3名
7	97.4	那覇市	O157:H7	2	散発	4	家庭内
8	97.6	M離島	O157:H7	2	散発	1	
9	97.5-6	名護市	O157:H-	1&2	集発	10	B保育園 家庭内2名 風呂場
10	97.6	浦添市	O157:H7	2	散発	3	家庭内, 喫食牛肉, 同ロットの牛肉, 洗面所
11	97.12	糸満市	O157:H7	1&2	散発	1	
合計: 11事例, 散発9, 集発2, 感染者29名 環境・食品分離株4							

表3. 腸管出血性大腸菌O26の発生状況(1996~1997).

事例	発生日	地域	血清型	VT型	散/集発	感染者数	備考
1	96.7	浦添市	O26:H11	1&2	散発	1	
2	96.8	名護市	O26:H11	1	散発	1	
3	96.8	M離島	O26:H11	1	散発	1	
4	96.9	M離島	O26:H11	1	集発	2	C保育園
5	96.9	M離島	O26:H11	1	集発	4	D保育園
6	97.5	M離島	O26:H11	1	散発	1	
7	96.5	那覇市	O26:H11	1	集発	10	E保育園 トイレ付近取っ手より検出
8	97.6	那覇市	O26:H11	1	集発	4	F保育園
9	97.7	本部町	O26:H11	1	集発	19	G保育園 家庭内感染2名
10	97.8	I離島	O26:H11	1	集発	3	A保育園
11	97.11	M離島	O26:H11	1	散発	3	家庭内
合計: 11事例, 散発7, 集発4, 感染者49名 環境分離株1							

また、1事例については園内のトイレ付近の手すりからO26が検出され、園児家族にも感染者が発生するなど二次感染が起こりやすい状況であることが伺えた。このようなことからO26:H11についてもO157:H7と同様の感染力を有すると思われる。

H抗原は11事例(49株)の全てがH11であり、VT産生性については11事例中10事例(48株)がVT1単独産生株でVT1およびVT2産生株が1事例(1株)、VT2単独産生株はみられなかった。

2. 薬剤耐性試験

人由来株、EHEC O157 (29株) およびO26 (49株) の計78株について薬剤耐性試験を行った。EMに対しては78株全てが耐性であった。以下、TC: 13株 (16.7%), ABPC: 10株 (12.8%), ST: 8株 (10.3%) の順に耐

性が高かった(表4)。薬剤耐性パターンとしてはEM単独耐性菌が55株(70.5%)で最も多く、EMおよびTCの2剤耐性株が9株(11.5%)、EMおよびABPCの2剤耐性株が6株(7.7%)、EMおよびSTの2剤耐性菌が4株(5.1%)、EM、ABPC、TC、およびSTの4剤耐性菌が4株(5.1%)であった。O26で18株(36.7%)、O157で5株(17.3%)が2剤以上の耐性菌であった(表5)。

3. PFGE法による遺伝子解析

EHEC O157およびO26の患者由来株78株および環境・食材由来株6株について制限酵素Xba-Iを用いたPFGE法によるDNAパターンの比較を行った。バンドパターンの比較分析は、表6に示すカテゴリーに従って分類した^{1), 2)}。

表4. EHEC O157 および O26 分離株の薬剤耐性

血清型	供試株数	耐性株数	耐性薬剤 (%)									
			ABPC	KM	EM	TC	NFLX	OFLX	FOM	CP	ST	NA
O157	29	29	4 (13.8)	0	29 (100)	1 (3.4)	0	0	0	0	0	0
O26	49	49	6 (12.2)	0	49 (100)	12 (24.5)	0	0	0	0	8 (16.3)	0
合計	78	78	10 (12.8)	0	78 (100)	13 (16.7)	0	0	0	0	8 (10.3)	0

表5. EHEC O157 および O26 薬剤耐性パターン (%)

耐性薬剤	O157	O26	合計
EM	24(82.8)	31(63.3)	55(70.5)
EM ABPC	4(13.8)	2(4.1)	6(7.7)
EM TC	1(3.4)	8(16.3)	9(11.5)
EM ST		4(8.2)	4(5.1)
EM ABPC TC ST		4(8.2)	4(5.1)

表6. PFGE法によるバンドパターン比較分析のカテゴリー.

遺伝学的に同一；	サンプル間のバンドパターンが同じ (Class I)	である。
遺伝学的に近縁；	1ヶ所の遺伝子が異なっており、1 (Class II)	～3個のバンドの違いがある (サブタイプ)。
遺伝学的にやや関連性がある；	2ヶ所の遺伝子が異なっており、4～5個のバンドの違いがある。非遺伝学的特徴も考慮しサブタイプとする。	(Class III)
遺伝学的に異なる；	3ヶ所以上の遺伝子が異なっており、6個以上のバンドの違いがある。	(Class IV)

(1) PFGEにより牛肉が感染源と特定できたO157家庭内事例について

1996年6月浦添市にて発生したO157の事例7 (表2) では、同時期に発症の家族3名から分離されたO157:H7 (VT2) 株と患者宅にて保存されていた食材の牛肉、患者宅の洗面台拭き取り、および、患者宅以外の別の場所で保存されていた牛肉のそれぞれから分離されたO157:H7 (VT2) 株のPFGEパターンがすべて一致し、この事例における感染源は牛肉であることが特定できた (図2)。

(2) EHEC O157のPFGEパターンについて

事例11を除く事例1～10までの10事例の患者由来株28株と、本島北部I離島で分離された牛糞便由来株1株、同島農業用ため池分離株1株、およびY離島採集のイエ

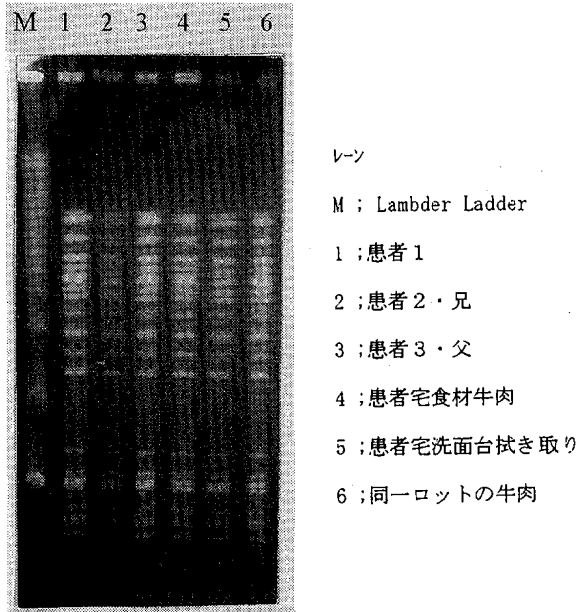


図2. 浦添市発生のO157:H7 (VT2) のPFGE DNAパターン (表2事例10)

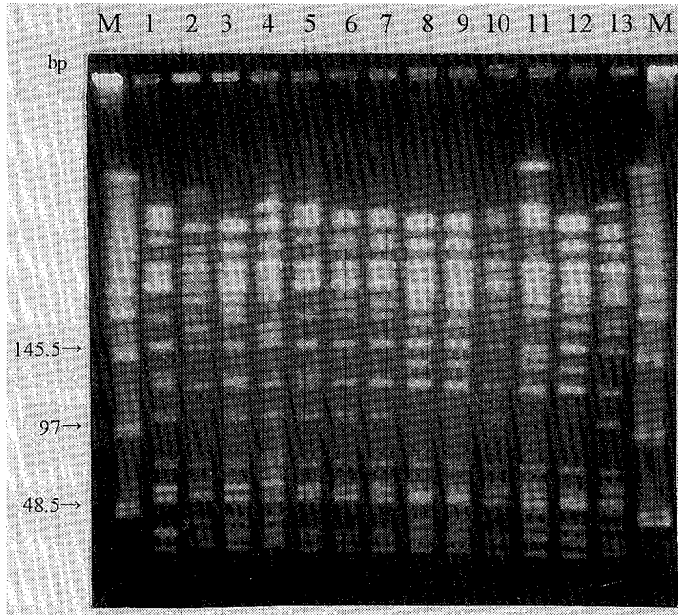
ハエから分離された株1株の計31株のついてPFGEによるDNAパターンの比較を行った。

事例6, 7, 9, 10, の保育園および家庭内発生事例は、それぞれの集団発生内では、単一のDNAパターンを示していた。

事例1～10までの代表株10株と、本島北部I離島で分離された牛糞便由来株1株、同島農業用ため池分離株1株、およびハエ由来株1株の計13株のPFGEによるDNAパターンを図3に示した。

O157のDNAパターンは大きくType1～8の8型に、サブタイプを含めると10型に分類することができた。

また、由来の異なるいくつかの株が、同一、あるいは近縁のサブタイプよることが判明した。まず、図3、レーン6の96年12月本島北部I離島で発生した事例6は、同島で同じ時期に牛糞便より分離された株と同一であり (Type 5)、また、97年6月、同島においてため池より分離された株は、バンドが1つ異なるのみで、サブタ

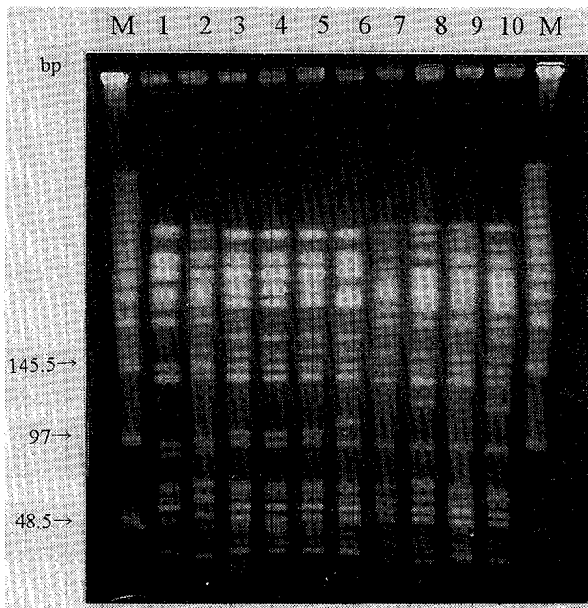


レ-ン	事例	発生 場所	PFGE Type
1	2	96.6 豊見城村	1
2	3	96.7 石川市	2
3	4	96.9 M離島	3
4	1	96.9 本島中部	4
5	5	96.11 本部町	1a
6	6	97.12 I離島, A保育園	5
7	環境	97.12 I離島, 牛糞	5
8	7	97.4 那覇市	6
9	8	97.6 M離島	6
10	環境	97.6 I離島, ため池	5a
11	9	97.5 名護市	7
12	10	97.6 浦添市	6
13	環境	97.10 Y離島, イエバエ	8

M ; Lambder Ladder

事例番号は表2に対応する。

図3. EHEC O157のPFGE DNAパターン(1996-1997)



レ-ン	事例	発生 場所	PFGE Type
1	1	96.7 浦添市	1
2	2	96.8 名護市	2
3	3	96.8 M離島	3
4	4	96.9 M離島, C保育園	3
5	5	96.9 M離島, D保育園	3
6	6	97.5 M離島,	3a
7	7	97.5 那覇市 E保育園	4
8	8	97.6 那覇市 F保育園	5
9	9	97.7 本部町 B保育園	6
10	10	97.8 I離島 A保育園	7

M ; Lambder Ladder

図4. EHEC O26:H11のPFGE DNAパターン(1969-1997)

イブ (Type 5 a) であった。また、図3、レーン8、9、12、つまり、97年4月に那覇で発生した事例7、同年6月に宮古島で発生した事例8、および同じく同年6月に浦添市での事例10は、同一の遺伝子型 (Type 6) によるものであった。事例10については、前記に示したように牛肉が感染源であることが判明しているが、事例7と事例8との疫学的調査からの関連性については不明

である。

レーン4は事例1の96年6月、沖縄本島中部での発生であるが、国立感染症研究所の分類ではIa, I, I型であり、同時期に広島県、福岡県、岡山県など多くの地域において分離された株と同一のタイプであった。その他の株については本土において分離された株との関連性はみられなかった。

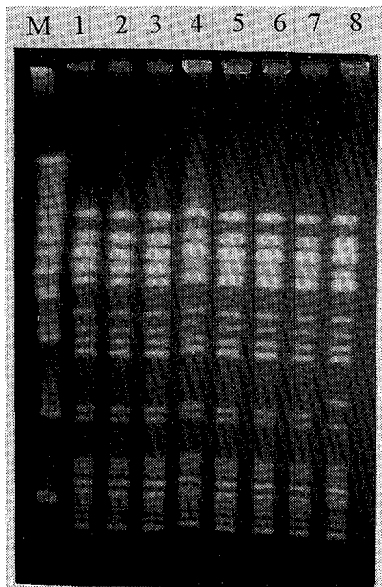


図5. M離島で発生したO26:H11 (VT1)のPFGE DNAパターン (1996-1997)

レ-ン	事例	発生	場所	PFGE Type
1	3	96.6	散発	3
2	4	96.9	C保育園	3
3	4	96.9	C保育園	3
4	5	96.9	D保育園	3
5	5	96.10	D保育園	3
6	5	96.10	D保育園	3
7	5	96.10	D保育園	3
8	6	97.5	散発	3a

M ; Lambda Ladder

事例番号は表3に対応する。

事例番号は表3に対応する。

(3) EHEC O26のPFGEパターンについて

事例11を除く事例1~10の47株についてPFGEによるDNAパターンの比較を行った。それぞれの集団発生事例においては、集団内のDNAパターンは同一であった。一部の集団事例においては、バンドが1本多いかあるいは欠落している場合もあった。O26:H11の事例1~事例10までの代表株(10株)およびM離島で発生した事例3, 4, 5, 6の8名から分離された8株のPFGEパターンをそれぞれ図4, 図5に示した。

O26:H11のDNAパターンは10事例で7型, サブタイプを含めると8型のパターンに分類できた。

図4のレーン2, 4, 5および図5のレーン1~7に示した96年8月~9月にM離島発生事例3, 4, 5は、同一のDNAパターンを示しており、diffuse outbreakの様相を呈していた。しかしながら喫食状況調査等の疫学的調査からは3者に関連性は見出せず、同一の感染源によるものなのか、あるいはその地域が広範囲にわたり同菌型が浸淫しているのかは不明であった。また、図4のレーン6(図5のレーン8)の同離島発生事例6についても、これより8ヶ月後に同地域で発生した事例であるが、バンド2ヶ所の相違しか無い。これより、事例6は事例3, 4, 5の1ヶ所の遺伝子の挿入もしくは欠損株でありサブタイプであると考えられる。

図4のレーン1, 2およびレーン7~10に示す沖縄島, および沖縄島北部I離島で発生した事例については全て異なるパターンを示していた。このことから同地域では多様な感染源の存在を示しているといえる。

IV 考 察

1996年8月に厚生省が腸管出血性大腸菌感染症を指定伝染病に指定したことから、各病院, 検査センターのペロ毒素検査体制が向上し, O157, O26, O111を診断した病院からの届け出が徹底され, 本症の実態が明瞭に把握されるようになってきた。1991年から1995年までは全国での年間検出数が100前後であったものが1996年5月以降血清型O157を中心に爆発的に増加した。厚生省食品保健課によるとO157に感染したと推定される患者数は, 1996年には17,877名, 1997年1,576名となっている。検出されたEHECの血清型はO157:H7が最も多く, 1996年は76%, (2,309/3,022), 1997年は67%(1,319/1,959)となっている。それに次いで多いO26:H11は, 1991年から1995年まで1.5%, 1996年が3.4%, 1997年が13%と増加傾向にある³⁾。本県における腸管出血性大腸菌症は, 血清型O157およびO26が大多数であり, 特にO26の発生については感染者の59.8%を占め, 全国の割合と比べ非常に高率であった。O157, O26の流行は4月から9月までの春先から夏季にかけて集中し, 他の腸管感染症の発生と同様な発生状況を示している。

集団発生事例においてはO157, O26ともに保育園で発生しており, 特に0歳から2歳までの低年齢層が圧倒的に多く, 糞便の自己管理が不十分こともあり二次感染が起りやすい状況であり, 特に注意が必要である。

O157およびO26の流行を詳細に解析するために, 著者らは患者, 食品, 環境等から分離されたO157, O26を対象にパルスフィールド電気泳動法による解析を行ってきた。1996年から1997年にかけての本県でヒトや食品等から分離されたO157は8型にまた, O26については

7型に分類され、各種の遺伝子型をもったO157、O26が分布していることが明らかになり、多様な感染源の存在が広く侵因していることが示唆された。

O157、O26等の発生動向を解析するには血清型、毒素型、薬剤耐性パターン等の表現型による方法も重要であるが、PFGE法等による遺伝子型別法も有用な手段である。遺伝子型別法は、より詳細な解析が可能であることから、感染源や感染経路の解明には大きく貢献が期待される。また、遺伝子型別解析は、疫学調査の方向性を示唆できる基礎的なデータの提供になる。

国内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例において、実際に感染源の究明ができた事例は少ないが、県内で発生した家庭内散発事例では、牛肉を喫食した患者3名の分離株と、喫食した牛肉および同じロットの牛肉から分離されたO157が、同一の遺伝子型であり、感染源が究明できた希な事例である。感染源が牛肉であったこと、また、ほぼ同時期に那覇市、M離島で発生したO157の散発事例と同一の遺伝子型であったことについても、牛との関連性が示唆される非常に意義深い事例であった。M離島で多発しているO26については、PFGEによる遺伝子解析の結果、同様のパターンを示していることから、遺伝学的に同一あるいは近縁の株で発生していることが明らかとなり、今後の調査の重要な資料となることと思われる。

V まとめ

1. 1996年6月から1997年12月にかけて沖縄県で発生した腸管出血性大腸菌症は26事例82名であり、その内O157によるものが11事例、29名およびO26によるものが11事例、49名で、O26の占める患者の割合が高かった。
2. 26事例中8事例は集団発生で、いずれも保育園での発生であった。

3. ヒトや食品等から分離されたO157の35株は大きく8型に分類され、サブタイプを含めると10型に分類できた。また、O26の50株は大きく7型に分類、サブタイプを含めると8型に分類できた。

4. 家庭内散発事例由来株のPFGEによる遺伝子解析の成績から、牛肉が感染源であることが特定できた。

5. 分離株のPFGEによる遺伝子解析は、腸管出血性大腸菌感染症の感染源や感染経路の究明における、疫学調査の重要な基礎データとなる。

<謝 辞>

本研究の実施にあたり、ご協力ならびに菌株を分与して頂いた沖縄県家畜衛生試験場又吉正直主任研究員に深謝いたします。

VI 参考文献

- 1) Manslow, J. N., Slutsky, A. and Arbelt, R.D., (1993) Applications-Molecular Typing Methods, Chapter 7. 1, pp 563-572.
- 2) Tenover, F., et al., (1995) Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239.
- 3) 国立感染症研究所, 厚生省医療保健局結核感染症係, (1998)腸管出血性大腸菌 (Vero毒素産生性大腸菌) 感染症1996~1998.4, 病原微生物検出情報, 19 (6) 122-123.
- 4) 和田昭仁・寺島淳・渡辺治雄・(1997)パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) による分子疫学的同定法, 日本細菌額雑誌. 52 (4), 763-775.