

資料

神奈川県における腸管出血性大腸菌の
 検出状況（令和3年度）

政岡智佳, 鈴木美雪, 古川一郎

Occurrence of enterohemorrhagic
Escherichia coli in Kanagawa Prefecture
 (April, 2021-March, 2022)

Tomoka MASAOKA, Miyuki SUZUKI,
 Ichiro FURUKAWA

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*：以下、EHECと略す）感染症は、「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」（平成10年10月2日法律第114号）で三類感染症に分類され、EHEC感染症の患者と診断した医師は、保健所を経由して都道府県知事に直ちに届け出なければならない¹⁾。さらに、分離された菌株はそれぞれの地方衛生研究所（以下、地研と略す）に集められ、生化学的性状、血清型、毒素型等を確認したのち、地研は「病原性大腸菌O-157の検体提供依頼について」（平成8年6月19日付、衛食第160号）および「飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について」（平成19年5月14日付、食安監発第0514001）に基づき、国立感染症研究所（以下、感染研と略す）細菌第一部に菌株を送付している。感染研は、全国から送付された菌株について遺伝子解析を実施し、全国レベルの大規模な集団発生や散発的集団発生を探知

することにより感染の拡大防止に努めている。EHECの遺伝子型別検査は、これまでパルスフィールド・ゲル電気泳動（以下、PFGEと略す）、IS-Printing Systemおよび反復配列多型解析法（以下、MLVAと略す）が実施されていた。その後、「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」（平成30年6月29日付事務連絡）において、広域的な事案の探知の迅速化のために、異なる検査機関で実施した検査の結果が比較可能なMLVAによる遺伝子解析を実施することで統一された。感染研ではMLVA解析について2014年から血清型O157、O26およびO111について解析が実施されており、さらに2017年からは血清型O103、O121、O145、O165およびO91についても解析が実施され、その結果が各自治体に報告されている²⁾。また、溶血性尿毒症症候群（以下、HUSと略す）発症者については、便からのベロ毒素（以下、VTと略す）の検出、血清中のO抗原凝集抗体あるいはVT抗体の検出によって診断された場合も届出の対象となっており¹⁾、当所においても搬入された血清について、EHEC加熱死菌により抗体の確認を行っている。

当所では、神奈川県域（横浜市、川崎市、横須賀市および相模原市を除く神奈川県内、以下、県域と略す）から集まったEHECについて血清型別、毒素型別、薬剤感受性試験、PFGEおよびMLVA（血清型O157、O26およびO103のみ）を実施している。本報では、令和3年度に収集したヒト及び牛枝肉から分離されたEHEC24株の遺伝子解析および薬剤感受性試験の結果について報告する。

EHEC24株のうち14株は県域の医療機関等で分離され、8株は当所地域調査部において患者家族から分離され、2株は県食肉衛生検査所で同一の牛枝肉から分離された。表1には管轄施設別の搬入菌株数、EHECの血清型および毒素型別を示した。24株の血清型および毒素型は、O157 (VT1&2) 3株、O157 (VT2) 10株、O26

表1 菌株の血清型および毒素

管轄保健所等	合計 (株)	血清型				
		O157		O26	O111	O128
		VT1&2	VT2	VT1	VT1	VT1&2
平塚保健福祉事務所	5	3	1	1		
小田原保健福祉事務所	5			2	3	
厚木保健福祉事務所	9		4	4		1
同上大和センター	3		3			
食肉衛生検査所	2		2			
合計 (割合)	24	3 (12.5%)	10 (41.7%)	7 (29.2%)	3 (12.5%)	1 (4.2%)

表2 患者・保菌者の年齢構成および

年齢層	男性	女性	計
0-5		1	1
6-10	3	2	5
11-20	3	1	4
21-30	2		2
31-40	1	3	4
41-50		4	4
51-60	1		1
61-70			0
>70		1	1
計	10	12	22

(VT1) 7株, O111 (VT1) 3株およびO128 (VT1&2) 1株であった。牛枝肉由来の2株を除くEHECが分離された患者および保菌者の性別と年齢構成

は、男性が10名、年齢範囲9～60歳で平均21.5歳及び中央値20歳、女性が12名、年齢範囲3～95歳で平均33.8歳及び中央値35.5歳であった(表2)。搬入時期は、6月が8株と最も多く、次いで10月の6株及び9月の3株と続いた。

PFGEは全24株について、制限酵素 *Xba*I を使用し、6V/cm、パルスタイム2.2-54.2秒、12℃の条件下で19時間行われた。泳動パターンについてBioNumerics (Applied Maths社) を用いてクラスター解析し、デンドログラムを作成した。MLVAは血清型O128の1株を除いた23株について、地研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で作成した「腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック(2018年11月編)」(<https://www.chieiken.gr.jp/manual01/MLVA/MLVA-handbook2018.pdf>) 記載の方法に従い実施した。MLVAの結果に基づいてPFGEと同じソフトを用いてMinimum spanning tree (以下、MSTと略す)を作成

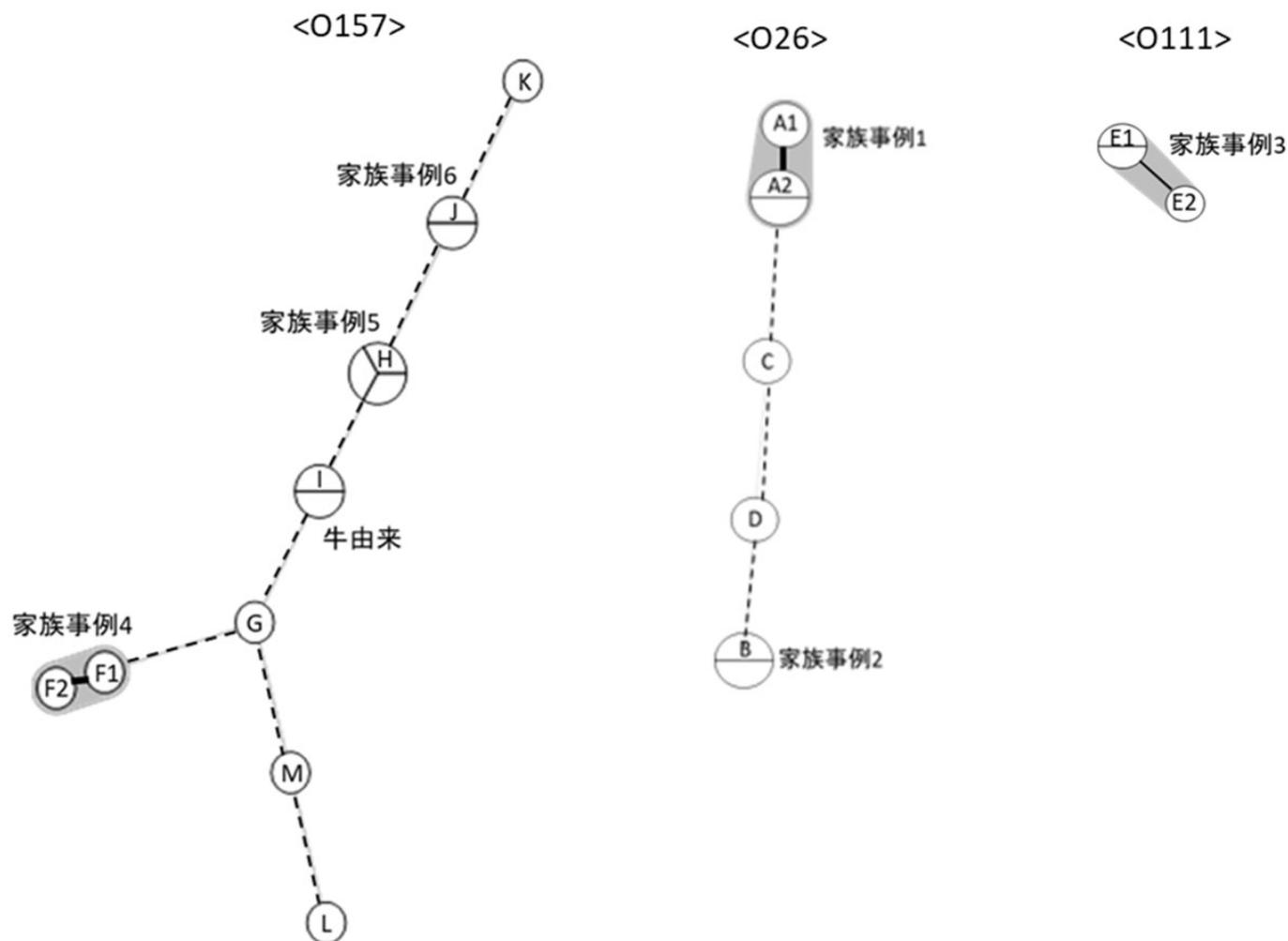


図1 MLVA解析結果に基づくMST
アルファベットおよび数字はMLVAパターンを示す

した。各円でMLVAパターンを示し、同一のMLVAパターンの菌株が存在した場合は、円を分割することで菌株数を示した。1遺伝子座が異なるsingle locus variant (以下、SLVと略す) の場合は円同士を太い実線 (A1-A2間およびF1-F2間) で繋ぎ、2遺伝子座が異なるdouble locus variant (以下、DLVと略す) の場合は細い実線 (E1-E2間) で繋いだ。さらにSLVおよびDLVの場合は、円同士をグレーで囲んだ。3遺伝子座以上異なる場合は、円は点線で繋がれており、点線の距離が長いほど異なる遺伝子座が多いことを示している。

血清型O128を除く23株のMLVAの結果から得られた血清型ごとのMSTを図1に示した。家族内感染事例では、MLVAパターンは一致もしくは、SLVまたはDLVであった。同一事例から分離された菌株でもSLVは確認されており³⁾、今回SLVであった家族内感染事例1 (A1およびA2) および事例4 (F1およびF2) も疫学的背景



図2 血清型O26の遺伝子解析結果



図3 血清型O111の遺伝子解析結果

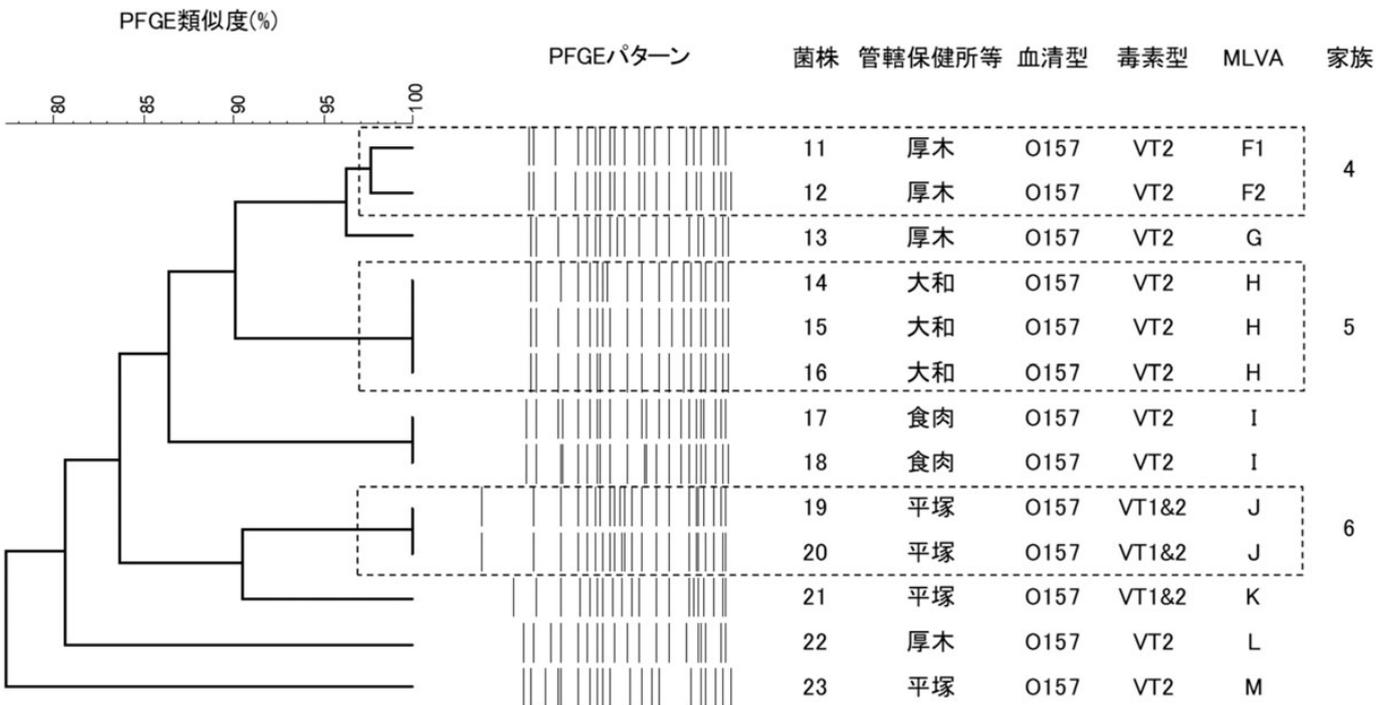


図4 血清型O157の遺伝子解析結果

表3 薬剤感受性試験の結果

	耐性薬剤	パターン	血清型	菌株数	
耐性	3剤	ABPC,SM,TC	I	O111 VT1	2
		CP,KM,SM	II	O157 VT2	1
	単剤	TC	III	O111 VT1	1
		FOM	IV	O26 VT1	1
中間	単剤	FOM	V	O26 VT1	3
感受性		VI		16	
計				24	

も考慮し、同一事例であると考えられた。また、DLVであった家族内感染事例3（E1およびE2）で異なっていた2遺伝子座は、プラスミド上に存在することが知られており⁴⁾、プラスミドの脱落によりMLVAパターンに差が生じたと考えられた。これらのことから、MLVAでは疫学調査により関連が認められる場合は、2遺伝子座までの違いであれば、同一事例と判断できると考えられた。さらに、PFGEパターンを基に血清型ごとに作成したデンドログラムに、MLVA等の結果もあわせて表記した（図2～4）。家族内感染事例で分離された菌株は、全事例でPFGEパターンが一致または類似度95%以上を示した。一方で、家族内感染事例4のNo.11およびNo.12の菌株とNo.13の菌株ではPFGE解析では類似度が96.2%と高い値を示したが（図4）、MLVAによるMSTでは点線で繋がれており（図1、F1-G間）、疫学情報でも関連が見られず異なる事例であると考えられた。今回の調査では、遺伝子型別においてはPFGEよりもMLVAの方がより解像度が高い結果となった。しかし、MLVAでは全ての血清型を型別することができないため、汎用性の面ではPFGEが優れていると考えられた。

次に、全24株について、アミノベンジルペニシリン（ABPC）、セフォタキシム（CTX）、クロラムフェニコール（CP）、ホスホマイシン（FOM）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ストレプトマイシン（SM）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（ST）およびテトラサイクリン（TC）の12薬剤についてCLSI（米国臨床検査標準化協会）法に準拠して薬剤感受性試験を実施し、試験の結果は薬剤ごとの阻止円の基準に従い、耐性、中間、感受性に分けて判定した⁵⁾。その結果、5株がいずれかの薬剤に耐性を示し、このうち3株が多剤耐性であった。さらに、2株が1薬剤に対して耐性を示し、3株が1薬剤に対し中間を示した。残りの16株は供試した薬剤全てに感受性となり、薬剤耐性パターンは6パターンに分けら

れた（表3）。

本調査期間中に当所に搬入された菌株は牛由来の2株を含め24株であった。このうちヒト由来の22株中15株（68.2%）は家族内感染事例由来で、EHECの感染対策として家庭内での二次感染を予防することは重要であると考えられた。今回実施した2つの遺伝子解析では、疫学情報から同居家族であるなど同一の感染源が疑われた菌株同士の関連を裏付ける結果となり、EHECの検査においてMLVA等の遺伝子解析を実施することは、集団感染事例の迅速な探知に繋がると考えられた。

なお、この報告の一部は、厚生労働科学研究費補助金（広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 新興・再興感染症研究事業）において実施した。

最後に、ご協力を頂きました各医療機関、医療検査機関、衛生研究所地域調査部および菌株搬入にご尽力いただきました各保健福祉事務所、生活衛生課、食肉衛生検査所ならびに医療危機対策本部室の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 腸管出血性大腸菌感染症：病原微生物検出情報. 27, 149(2006)
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課食中毒被害情報管理室：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, IASR, 40, 83-85(2019)
- 3) 松本裕子, 小泉充正, 小川敦子, 後藤千恵子, 吉野友章, 田中伸子：MLVA解析を活用した迅速な行政対応が可能であった腸管出血性大腸菌O157食中毒事例－横浜市, IASR, 40, 76-77(2019)
- 4) Izumiya et al.: New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111, Microbiol Immunol, 54, 569-577(2010)
- 5) Clinical and laboratory standards institute; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, CLSI document M100-S25, (2015)