

資料

神奈川県における腸管出血性大腸菌の 特徴について (2022 ～ 2023 年度)

陳内理生, 鈴木美雪*, 鈴木理恵子,
政岡智佳, 古川一郎

Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April, 2022 - March, 2024)

Michio JINNAI, Miyuki SUZUKI,
Rieko SUZUKI, Tomoka MASAOKA
and Ichiro FURUKAWA

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) はベロ毒素 (Verotoxin: VT) を産生する大腸菌で, 食中毒の原因菌として知られている。時に溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic Uremic Syndrome) を引き起こし, 重篤となることがある¹⁾。動物, 特に牛を含む反芻動物では, 腸管内に常在している場合があり²⁾, 食肉への加工過程や調理過程での交差汚染が食中毒の原因の一つである。しかし, 食肉以外にも野菜などを原因とする食中毒事例も知られていることに加えて, 食中毒以外にも直接的ないし間接的にヒトからヒトへ感染し, しばしば保育施設などでの集団感染事例が発生する^{3),4)}。これらのことから公衆衛生行政において, EHEC は重要な位置を占めている。

EHEC における O 抗原の血清群 (以下, O 血清群) は偏りがあることが知られており, 特に O157 および O26 を原因とする事例が多く発生している。EHEC の病原因子の一つである VT には VT1 と VT2 の二つのタイプがあり, O 血清群ごとに保有する VT 型に偏りがあることも知られている。

EHEC は食中毒や集団感染の原因となりうることから, 原因食品の特定や拡散状況の把握を目的として, 分子疫学的手法が必要とされている。加えて, EHEC はしばしば都道府県をまたぐ大規模な食中毒

を引き起こすことから, 分子疫学的データを全国で統一的に取扱うことが必要であった。このため, 2018 (平成 30) 年 2 月 8 日付け通知, 健感発 0208 第 1 号, 薬生食監発 0208 第 1 号「腸管出血性大腸菌の遺伝子型検査体制の整備及び研修会の開催について」により, EHEC のうち比較的良好事例が発生している O157, O26 および O111 を対象とした Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA) が全国で実施されることとなった。MLVA はゲノム内に存在するリピート領域を PCR により増幅したのち, PCR 産物のサイズを元に各領域のリピート数を算出し, それらリピート数のパターンで遺伝子型を決定する方法である。現在, わが国の衛生研究所で広く実施されている Izumiya らの方法⁵⁾では 18 領域を対象としている。

当所では横浜市, 川崎市, 横須賀市, 相模原市, 茅ヶ崎市, 藤沢市を除く神奈川県域 (以下, 神奈川県域) で発生した EHEC を収集するとともに, 接触者等の糞便から EHEC を分離し, MLVA を含む行政検査を実施している。これらのことに加えて, EHEC が薬剤耐性を獲得した場合, 治療が困難となり, さらなる感染拡大につながる可能性があることから, 薬剤耐性 EHEC の拡散状況の把握が必要と考えられた。そこで, 本研究では, 当所において 2022 ～ 2023 年度に収集・分離された食中毒および感染症患者または接触者由来の EHEC 59 株 (同一事例でかつ同一人物由来であり, 血清型および VT 型が一致した株が複数あった場合は 1 株のみを選択し解析した) を用い, その由来となる患者・接触者の年齢分布および男女比を確認するとともに, O 血清群別, MLVA および薬剤感受性試験を実施したのでその結果を報告する。

なお, 厳密にはベロ毒素を産生する大腸菌 (verotoxigenic *E. coli*: VTEC) のうち, 出血性大腸炎を呈したもののみ, EHEC と呼称するが, 集計上, 両者の区別が困難な場合もあり, 総じて EHEC と称されることも多いこと⁶⁾から, 本研究報告においては, 広く VTEC の意味で EHEC を使用する。

得られた菌株の由来となる患者もしくは接触者の年齢を 10 歳未満, 10 代 (10 ～ 19 歳), 20 代 (20 ～ 29 歳), 30 代 (30 ～ 39 歳), 40 代 (40 ～ 49 歳), 50 代 (50 ～ 59 歳), 60 代 (60 ～ 69 歳), 70 歳以上の 8 区分にて集計した。その結果, 20 代が最も多く全 59 例中 12 例 (20.3%) で, 続いて 10 代の 8 例 (13.6%), 30 代および 10 歳未満がそれぞれ 7 例 (11.9%) であった。2022 年の感染症発生動向調査事業年報⁷⁾における EHEC の年齢別患者数を上記区分に従い再度集

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1
* 現 地域調査部

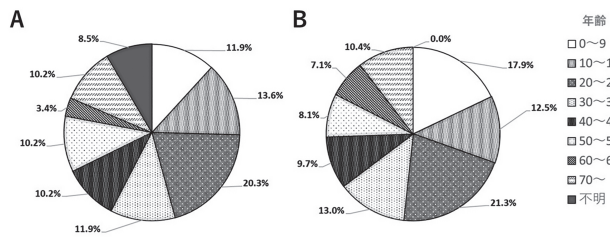


図1 患者・接触者の年齢分布

A: 神奈川県 (2022～2023年度) の患者・接触者
B: 全国 (2022年) の患者

計したところ、10歳未満の患者が3370例中604例(17.9%)と、20代の719例(21.3%)に次いで多いという違いはあるものの、概ね本研究における神奈川県域の結果と同様の傾向を示した(図1)。同様に男女比を比較すると、神奈川県域では男性31例、女性25例、不明3例と男性が多いのに対し、全国では男性1,480例に対し、女性1,890例と女性が多い結果であった。

O血清群別は病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社、東京)を用いたスライド凝集法により実施した。全59株のO血清群の内訳は、O157が最も多く31株(52.5%)、次いでO26が8株(13.6%)、O103が6株(10.2%)、O111およびO血清群別不能株(以下、OUT)がいずれも4株(6.8%)、O91、O115、O128、O145、O153、O165がそれぞれ1株(1.7%)であった(表1)。病原微生物検出情報(Infectious Agents Surveillance Report: IASR)における病原体個票による月別EHEC/VTEC血清型別情報⁸⁾を用いて、2022年11月～2024年4月までの結果をO血清群ごとに再度集計したところ、O157を原因とするものが2,270例中1,432例(63.1%)と最も多く、続いてO26が211例(9.3%)、O103が104例(4.6%)、O111が99例(4.4%)、OUTが91例(4.0%)であり、本研究における神奈川県域の傾向と一致していた。

O157、O26、O103およびO111の各々のO血清型におけるVTの保有状況を確認したところ、神奈川県域におけるO157では全31株中において、VT1のみを保有していた株(以下、VT1保有株)が0株(0.0%)で、VT2のみを保有していた株(以下、VT2保有株)が9株(29.0%)、VT1および2の両方を保有していた株(以下、VT1+2保有株)が22株(71.0%)で、O26では全8株中において、それぞれ、7株(87.5%)、1株(12.5%)、0株(0.0%)、O103は全6株中においてVT1保有株が6株(100.0%)、O111は全4株中においてVT1+2保有株が4株(100.0%)であった(表1)。2022年に全国で発生したO157、

表1 神奈川県域(2022～2023年度)において収集された腸管出血性大腸菌のO抗原血清群およびベロ毒素型の分布

O血清群	ベロ毒素型			合計
	VT1	VT2	VT1+2※	
O157	0	9	22	31
O26	7	1	0	8
O103	6	0	0	6
O111	0	0	4	4
O91	0	0	1	1
O115	0	1	0	1
O128	0	1	0	1
O145	1	0	0	1
O153	1	0	0	1
O165	0	1	0	1
OUT	2	1	1	4
合計	17	14	28	59

表中の数字は菌株数を示す

※ VT1+2とはVT1およびVT2の両方を保有することを示す。

O26、O103およびO111のVTの分布について、National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases (NESID) 病原体検出情報より集計したデータ⁹⁾を用いて確認した。その結果、O157全912例中VT1保有株が47例(5.2%)、VT2保有株が226例(24.8%)、VT1+2保有株が639例(70.1%)であった。O26全240例中で、それぞれ215例(89.6%)、17例(7.1%)、8例(3.3%)であった。O103全86例中でそれぞれ84例(97.7%)、0株(0.0%)、2株(2.3%)であった。O111全60例中でそれぞれ27例(45.0%)、0例(0.0%)、33例(55.0%)であった。以上のことから、O血清群ごとのVT保有状況も神奈川県域と全国でその傾向が概ね一致していると考えられた。

MLVAはO157、O26およびO111であった菌株を対象として、Izumiyaらの方法⁵⁾に従い実施した。得られた菌株ごとのリピート数を用いてBIONUMERICS version 6.6 (Applied Maths)により、Minimum Spanning Treesを作成した。O157については全31株について、VT1+2保有株(22株)、VT2保有株(9株)それぞれで解析した。その結果、VT1+2保有株において3つの異なるクラスター(同一もしくは1領域のみ変異した遺伝子型が集積したものをクラスターとした)が確認された(図2A)。クラスター1および3は同一事例由来の株による同一のMLVA型で構成されていた。クラスター2のうち、

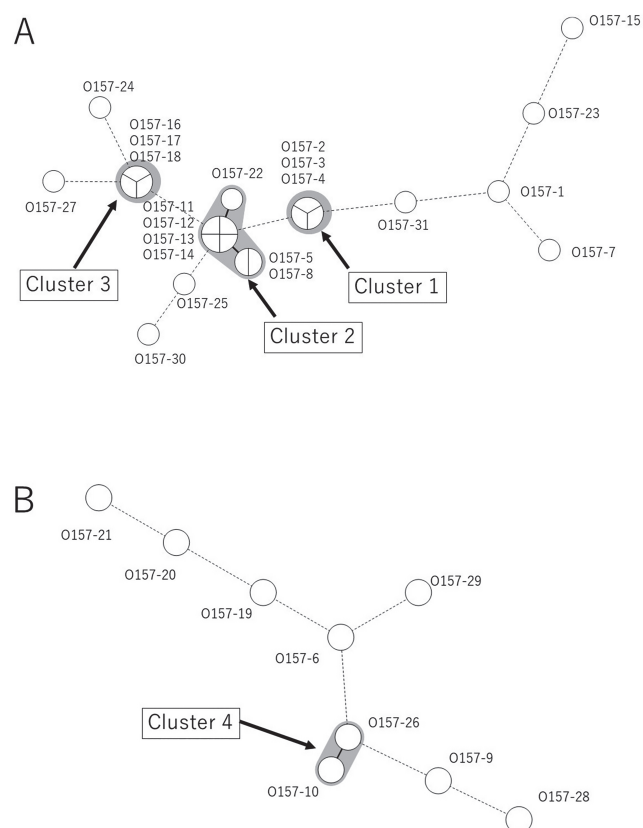


図2 神奈川県 (2022～2023 年度) における腸管出血性大腸菌 O157 の Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (Minimum Spanning Trees)

A. VT1 および 2 保有 O157

B. VT2 のみ保有 O157

図中の番号は菌株番号を示す。1 領域異なる遺伝子型を太線で結び、2 領域以上異なる遺伝子型を点線で結んだ。

O157-11, O157-12 および O157-13 については同一事例由来の株であった。O157-14 はこれら 3 つと同一の MLVA 型であるものの、疫学的関連性は不明であった。その他、クラスター 2 に属する O157-5, O157-8, O157-22 についても疫学的関連性は不明であった。O157 における VT2 保有株については、O157-10 および O157-26 がクラスター 4 を形成したものの、これら 2 株の疫学的関連性は不明であった。このほか 7 株についてはいずれも、2 領域以上異なっており、遺伝学的関連性は認められなかった (図 2B)。O26 および O111 についても、それぞれ 7 株、4 株を MLVA に供試した。O26 については供試した 7 株すべてが 2 領域以上異なっており、遺伝的関連性は認められなかった。O111 については供試した 4 株のうち、同一事例由来である 3 株の遺伝子型が一致したものの、1 株については 2 領域以上異なっており、両者の遺伝的関連性は認められなかった。

薬剤感受性試験は The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S2510) に従い、ディスク拡散法により実施した。対象薬剤は、 β -ラクタム系として、アンピシリン (ABPC)、セフトキシム (CTX)、クロラムフェニコール系として、クロラムフェニコール (CP)、ホスホマイシン系として、ホスホマイシン (FOM)、アミノグリコシド系として、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、キノロン系としてナリジクス酸 (NA)、ノフロキシサシン (NFLX)、シプロフロキシサシン (CPFX)、テトラサイクリン系として、テトラサイクリン (TC)、サルファ剤としてスルファメトゾール/トリメトプリム (ST) の計 7 クラス、12 薬剤を用いた。各薬剤の判定基準は CLSI M100-S2510) に従った。その結果、薬剤の耐性率は、ABPC が 15.3%, CTX が 3.4%, CP が 10.2%, KM が 8.5%, SM が 23.7%, NA が 5.1%, TC が 16.9%,

表2 神奈川県 (2022～2023 年度) で収集された EHEC における各薬剤の耐性率

	β -ラクタム系		クロラムフェニコール系	ホスホマイシン系	アミノグリコシド系			キノロン系			テトラサイクリン系	サルファ剤
	ABPC	CTX	CP	FOM	GM	KM	SM	NA	NFLX	CPFX	TC	ST
R	9 (15.3)	2 (3.4)	6 (10.2)	0 (0)	0 (0)	5 (8.5)	14 (23.7)	3 (5.1)	0 (0)	0 (0)	10 (16.9)	7 (11.9)
I	12 (20.3)	2 (3.4)	1 (1.7)	5 (8.5)	0 (0)	2 (3.4)	2 (3.4)	1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)
S	38 (64.4)	55 (93.2)	52 (88.1)	54 (91.5)	59 (100.0)	52 (88.1)	43 (72.9)	55 (93.2)	59 (100)	59 (100)	48 (81.4)	52 (88.1)

表中の数字は菌株数を示し、()内の数字は全 59 株中の割合 (%) を示す。

アンピシリン:ABPC, セフトキシム: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, ストレプトマイシン:SM, ナリジクス酸:NA, ノフロキシサシン:NFLX, シプロフロキシサシン:CPFX, テトラサイクリン:TC, スルファメトゾール/トリメトプリム:ST

S: 感受性, I: 中等度耐性, R: 耐性

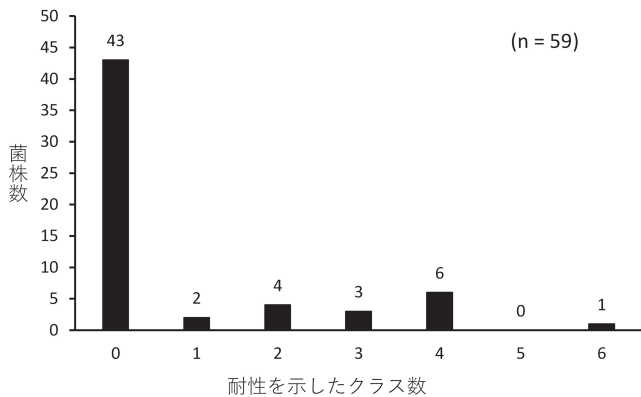


図3 耐性を示したクラス数の分布

STが11.9%で、FOM、GM、NFLX、CPFXは0.0%であった(表2)。さらに、全59株中6クラスに耐性を示す株が1株、4クラスが6株、3クラスが3株、2クラスが4株、1クラスが2株、全ての薬剤に対して感受性の株が43株で、多剤耐性の指標とされる3クラス以上¹¹⁾の薬剤に耐性を示す株の合計は10株(16.9%)であった(図3)。

本研究報告において、全国の結果⁷⁻⁹⁾との比較により、神奈川県域で収集された菌株の患者・接触者の年齢分布、菌株のO血清群の分布、およびO157、O26、O103およびO111のVT型の分布はおおむね全国の傾向と一致していた。このため、神奈川県域に流入・分布しているEHECは全国の傾向を反映しているものと考えられた。今回、O157におけるVT1+2保有株のMLVA解析で、疫学情報では関連性が認められないものの、遺伝学的に近縁な遺伝子型から構成されるクラスター2が検出されたことから(図2A)、MLVAを活用することは、潜在的な食中毒事例や集団感染事例の検出に有効であると考えられた。加えて、多剤耐性EHECが1割以上も検出されたことから、EHECの薬剤耐性について今後注視する必要があると考えられた。

(令和6年9月4日受理)

引用文献

- 1) J. Scheiring, S. P. Andreoli, and L. B. Zimmerhackl: Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS), *Pediatr Nephrol*, **23**, 1749 – 1760 (2008)
- 2) L. Beutin, D. Geier, H. Steinrück, S. Zimmermann, and F. Scheutz: Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals, *Journal of Clinical Microbiology*, **31**, 2483-2488 (1993)
- 3) 津田侑子, 宇野伽那子, 富原亜希子, 田中さおり, 齊藤武志, 中村訓子 他: 保育施設における腸管出血性大腸菌O157による集団感染事例(第1報), *IASR*, **44**, 148-149 (2023)
- 4) 腸管出血性大腸菌感染症 2022年3月現在, *IASR*, **43**, 103-104 (2022)
- 5) H. Izumiya, Y. Pei, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Hayashi, S. Iyoda 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
- 6) 西川禎一, 谷本佳彦, 浅野桃子: 腸管出血性大腸菌の疫学, *モダンメディア*, **8**, 103-112 (2012)
- 7) 感染症発生動向調査事業年報2022年(令和4年) 確定報告データ <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2270-idwr/nenpo/12553-idwr-nenpo2022.html>> (2024/4/30 アクセス)
- 8) 病原微生物検出情報(Infectious Agents Surveillance Report: IASR)における病原体個票による月別EHEC/VTEC血清型別情報 <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/511-surveillance/iasr/tables/1525-iasrb.html>> (2024/4/30 アクセス)
- 9) 腸管出血性大腸菌感染症 2023年3月現在, *IASR*, **44**, 67-70 (2023)
- 10) The Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, M100-S-25 (2015)
- 11) R. Cantón, P. Ruiz-Garbajosa: Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes, *Current opinion in pharmacology*, **11**, 477-485 (2011)