

腸管出血性大腸菌感染症の感染源究明に関する調査研究

山口 仁孝・原 健志

An Investigative Report for Clear up the Origin of EHEC Infection

Yoshitaka YAMAGUCHI, Kenshi HARA

Key words : EHEC = enterohemorrhagic Escherichia coli , PFGE=Pulse-field gel electrophoresis, dendrogram
 キーワード:腸管出血性大腸菌、パルスフィールドゲル電気泳動、系統樹

はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、「感染症法」において全数把握の3類感染症として感染症発生動向調査が行われている。また、食品が原因と疑われ、医師から食中毒の届出があった場合や保健所長が食中毒と認めた場合には、「食品衛生法」に基づき、各都道府県において調査および国への報告が行われる。

本邦における近年の EHEC 感染症届出数は、年間約 3,000~4,000 例を推移しており、溶血性尿毒症症候群 (HUS) 発症による重篤化や死亡例も報告されており (図1、表1)¹⁾ 依然注意すべき感染症である。

EHEC の感染源調査については、集団発生例が多い一般の食中毒とは異なり、とくに小規模な単発事例が多く、患者個人の行動や摂食歴が様でない本症では、個々の事例について、原因食材やその他の感染源・感染経路等についての調査が困難な場合が多く、原因については十分に解明されないことが多い。

一方、ヒト以外の動物についての多くの調査や感染実験によって、健康な牛の数%は腸管出血性大腸菌を保菌していると考えられ^{2) 3)}、牛との直接的な接触や汚染した牛肉の摂食が原因と思われるヒトの発症事例も多数報告されている^{4) 5)}。しかしながら、通常の EHEC 感染症では、牛との接触や牛肉の摂食歴がまったくない場合が多く存在する。

そこで、我々は近年家庭菜園やガーデニング用などで市販されている牛糞堆肥に注目し、平成14年度より、2 ヶ年にわたり市販牛糞堆肥の汚染実態調査を行うとともに、県内で分離された EHEC について、感染源調査時に有効な分子疫学データ

となる PFGE 解析を実施し、各菌株の泳動パターンをそれぞれデータベース化し系統樹の作成を試みた。

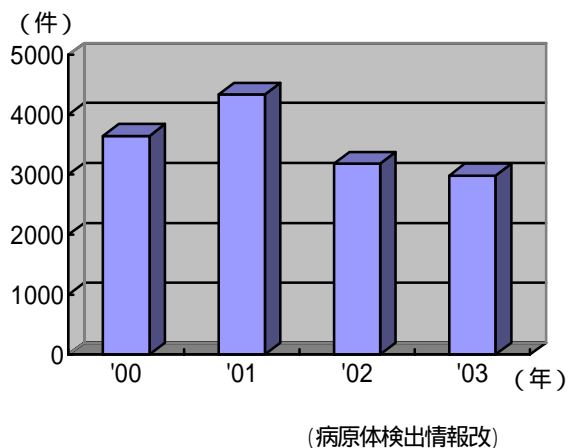


図1: EHEC 感染症届出数の推移

表1: EHEC の主な臨床症状 (%)

	HUS	血便	下痢	腹痛	発熱	無症状
0-157	1.3	32.2	48.7	42.3	17.6	39.6
その他	1.6	17.4	50.7	26.4	15.3	41.4

(病原体検出情報改)

材料および方法

1. 市販堆肥予備調査

市販牛糞堆肥 4 検体について、発酵の程度や大腸菌群の有無を確認するために、臭気、pH を測定し、マニュアル⁶⁾に従って培養試験を行った。また、志賀毒素 (Stx) 遺伝子の有無について Multiplex PCR 法⁷⁾により、スクリーニング試験を実施した。

2. 市販堆肥本試験

2市2町の14販売店より、市販牛糞堆肥120検体を購入し、堆肥中心部を約1g無菌的に採取し、トリプチケ-スライブ入9mlにて37 18hrs増菌し、増菌液0.1mlをさらに同ブ入にて37 約6hrs培養後、増菌液1ml用いてPCRスクリーニングを実施した。

3. PFGE

過去に県内で分離された146株('01-'03年に県内で分離された感染者由来株140株、と畜場牛由来株6株)について、純培養後制限酵素 Xba

を用いた標準法(厚労省新興再興感染症研究班)に従い処理した後、ゲルを0.3µg/mlのエチジウムブロミドで30分間振とう・染色した。脱色後トランスイルミネーターでUVを照射し、ポラロイド写真を撮影した。

4. データベース化ならびに系統樹作成

PFGE泳動写真を目視により確認後スキャナーを用いてパソコンに取り込み、市販解析ソフト(ATTO株式会社: Lane Multi Screener ver 2)を用い、操作マニュアルに従って集団発生例を除く104株について、それぞれのPFGE泳動画像をデータベース化し、各バンド間の相似度を計算後、UP GMA(Unweighted pair group method-determined)法によって系統樹の作成を試みた。

結果

1. 市販堆肥予備調査(表2)

発酵の程度については、いずれも便臭はなく、完熟されているものと思われたが、水分が多く、pHが7未満のものもあった(No.3)。また、培養試験では大腸菌群が確認された(No.1、2)。志賀毒素遺伝子のPCRスクリーニング試験は4例とも陰性であった。

2. 市販堆肥本試験

市販牛糞堆肥120検体のPCRスクリーニング試験において、いずれの検体も陰性でEHECの菌分離には至らなかった。

3. PFGE データベース化ならびに系統樹作成

0-157(Stx1+2)56株(図2)、0-157(Stx2)34株(図3)、0-26(Stx1)14株(図4)の合計104株について、PFGEデータベースを構築した。

県内で分離された感染者由来株は0-157(Stx1+2)で2つ(図2:点線枠)、0-157(Stx2)で3つ(図3:点線枠)、0-26(Stx1)で1つ(図4:点線枠)のクラスター(遺伝子が近縁のグループ)が認められた。

分離地や分離日が異なるものの、遺伝子がほぼ同一であることから、何らかの同一感染源によるoutbreakがあったことが示唆された事例が0-157(Stx1+2)では3例(図2:実線枠)、0-157(Stx2)では2例(図3:実線枠)確認された(表3)。

表2: 予備調査結果

試験項目 \ No.		1	2	3	4
便臭		-	-	-	-
pH(試験紙法)		7.0	8.0	6.0	7.0
EC broth DHL	gas	+++	++	±	-
	colony	R*	R	-	-
NmEC broth CT-SMAC	gas	±	±	±	±
	colony	G*	G	G	G
NmEC broth VIDAS# CT-SMAC		R	R	G	G
血清凝集試験		-	-	-	-
Stx 毒素遺伝子 (PCR)		-	-	-	-
大腸菌群		+	+	-	-

#VIDAS=0-157 免疫濃縮 (bioMerieux) *R=赤色 colony、G=灰色 colony

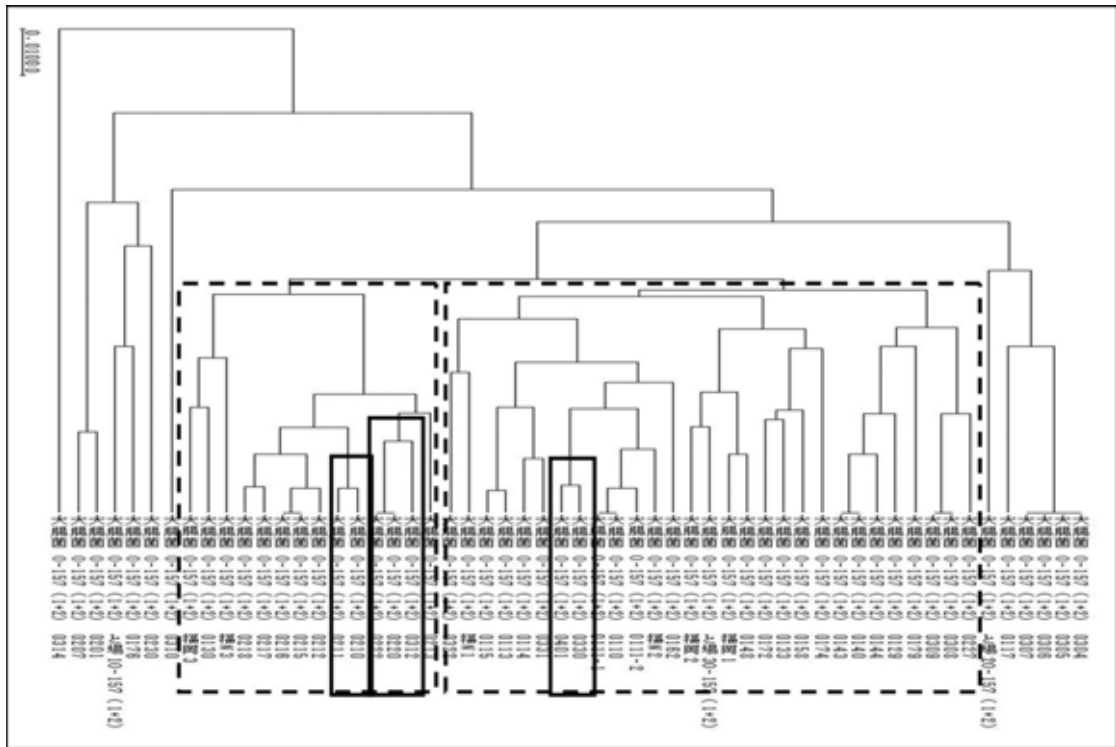


図2：系統樹1【0-157 (Stx1+2) 56株】

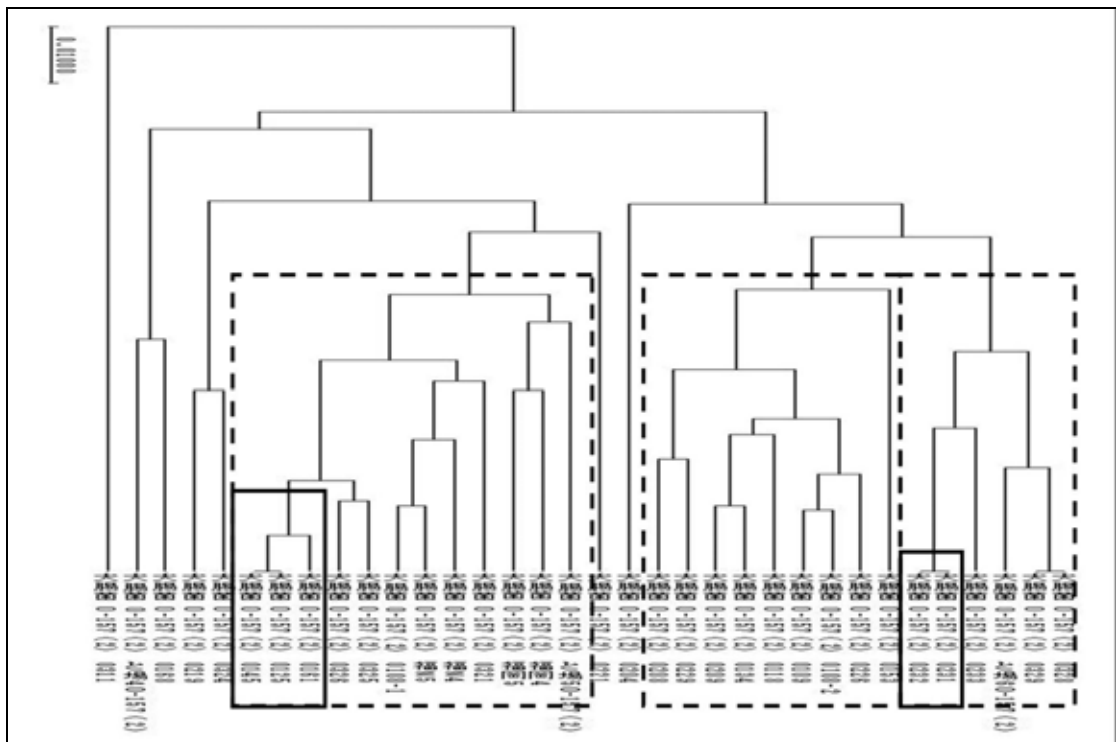


図3：系統樹2【0-157 (Stx2) 34株】

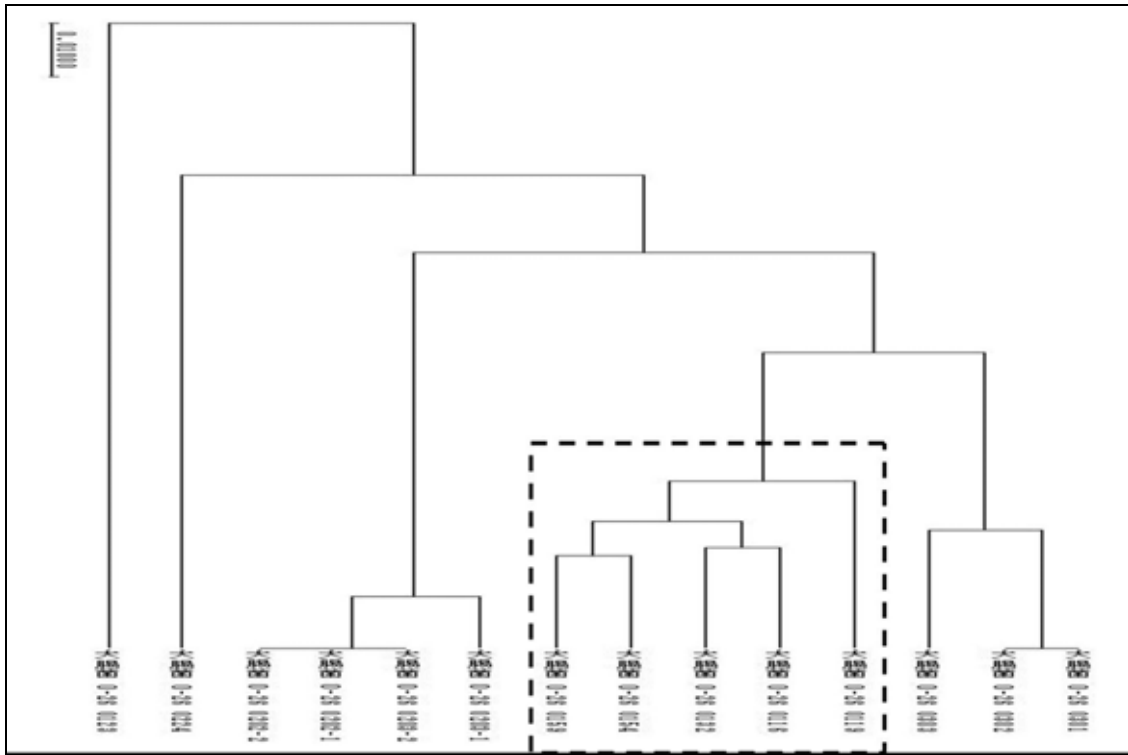


図4：系統樹2【0-26 (Stx1) 14株】

表3：Diffuse outbreakが疑われた事例

DONo.	株No.	菌分離日	保健所	O-type	STX-type
1	0210	02/05/18	県北	157	1+2
	0211	02/05/23	県南	157	1+2
2	0222	02/08/23	県南	157	1+2
	0220	02/07/19	佐世保	157	1+2
	0312	03/09/05	西彼	157	1+2
3	0330	03/12/18	県南	157	1+2
	0401	04/01/05	県南	157	1+2
4	0125	01/07/18	五島	157	2
	0145	01/08/30	県北	157	2
	0161	01/10/29	県南	157	2
5	0231	02/10/22	県北	157	2
	0232	02/10/25	県南	157	2

まとめ及び考察

牛糞堆肥汚染調査

PCR スクリーニングで 120 検体すべて陰性、菌分離できず。

遺伝子解析 (PFGE)

良好な泳動パターンが得られた。

データベースの構築・解析

・0-157 (Stx1+2) 56 株、0-157 (Stx2) 34 株、0-26 (Stx1) 14 株 合計 104 株について、PFGE データベースを構築した。

・01-03 年県内分離株は 0-157 (Stx1+2) で 2 つ、0-157 (Stx2) で 3 つ、0-26 (Stx1) で 1 つのクラスターが認められた。

・0-157 (Stx1+2) では 3 例、0-157 (Stx2) では 2 例の同一感染源による outbreak があったことが示唆された。

1988 ~ 89 年に南オーストラリアに広がったレジオネラ症の diffuse outbreak においては、患者が使用していた汚染堆肥中の菌が Aerosol 化して感染したものと考えられている⁸⁾⁹⁾。また、その後市販堆肥を感染源とする同様の事例は日本やアメリカで報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。主にアメーバに寄生するレジオネラ菌と大腸菌とでは、堆肥環境中の熱や酸などに対する抵抗性が異なり、同様には比較できないが、今回の予備調査で市販堆肥中に大腸菌群が検出されたことから、EHEC によって汚染されている堆肥が存在する可能性もあり、今後保健所が実施する EHEC 患者調査の際には、堆肥取り扱い歴の聞き取り等についても注意する必要があると考えられた。

今回供試した堆肥はいずれも生産地、発酵方法、出荷時期等の表示がまったくなかったため、同一ロットの検体を避けるために、時期をずらしてサンプリングを行った。市販牛糞堆肥 120 検体の調査では、PCR スクリーニングで陽性検体は確認されず、EHEC の菌分離ができなかったため、感染源としての有力な証拠は得られなかった。

腸管出血性大腸菌感染症の発生予防・感染源調査を行うにあたっては、いかに diffuse outbreak を早期に探知するかが最も重要と考えられる。今回新たに作成した県内分離株の遺伝子レベルでのデータベース化は、今後 EHEC 感染症が発生した場合に、PFGE を実施して個々の株間の遺伝子情報を比較することで、早期に diffuse outbreak の探知が可能となり、聞き取り調査の情報とともに検討することにより、感染源の推定に有効な強力な tool となることと期待される。

参考文献

- 1) 病原微生物検出情報;感染症情報センター; <http://idsc.nih.go.jp/iasr/25/292/tpc292-j.html>(2004).
- 2) O'Brien, L. J. G. a. A. D. Escherichia coli O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.:Higher prevalence rates than previously estimated. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (7), 2959-2961 (2000).
- 3) Ezawa A, G. F., Saitoh M, Tamura T, Kawata K, Takahashi T, Kikuchi N. A three-year study of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 on a farm in Japan. *J Vet Med Sci* 66(7), 779-84 (2004).
- 4) Yatsuyanagi J, S. S., Ito I. A case of hemolytic-uremic syndrome associated with shiga toxin 2-producing Escherichia coli O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. *Jpn J Infect Dis* Oct, 174-6 (2002).
- 5) 病原微生物検出情報;感染症情報センター; <http://idsc.nih.go.jp/iasr/rapid/pr2820.html> (2003).
- 6) 腸管出血性大腸菌検査マニュアル;国立感染症研究所 (2004).
- 7) 山口 仁孝他.小児下痢症患者より分離された志賀毒素産生大腸菌O63の病原分子解析.長崎県衛生公害研究所報,21-28 (2001).
- 8) Steele TW, M. C., Sangster N. Distribution of Legionella longbeachae serogroup 1 and other legionellae in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol* Oct, 2984-8 (1990).
- 9) Steele TW, L. J., Sangster N. Isolation of Legionella longbeachae serogroup 1 from potting mixes. *Appl Environ Microbiol* Jan, 49-53 (1990).
- 10) Koide M, S. A., Okazaki M, et al. Isolation of Legionella longbeachae serogroup 1 from potting soils in japan. *Clin Infect Dis*, 943-4 (1999).
- 11) Legionnaires' Disease Associated With Potting Soil--- California, Oregon, and Washington, May--June 2000. *MMWR(CDC)*, 777-8 (2000).