

図 1

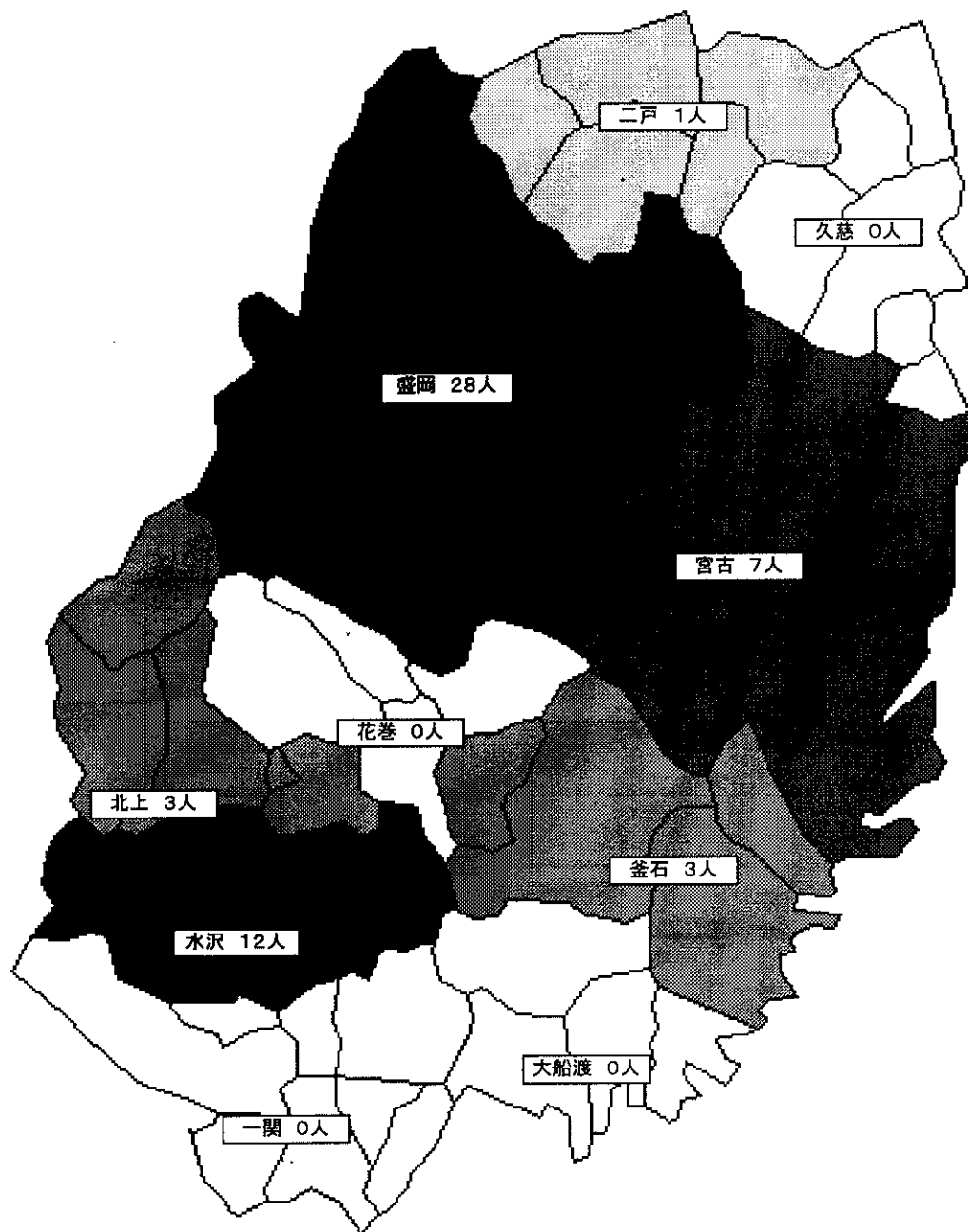


図 2

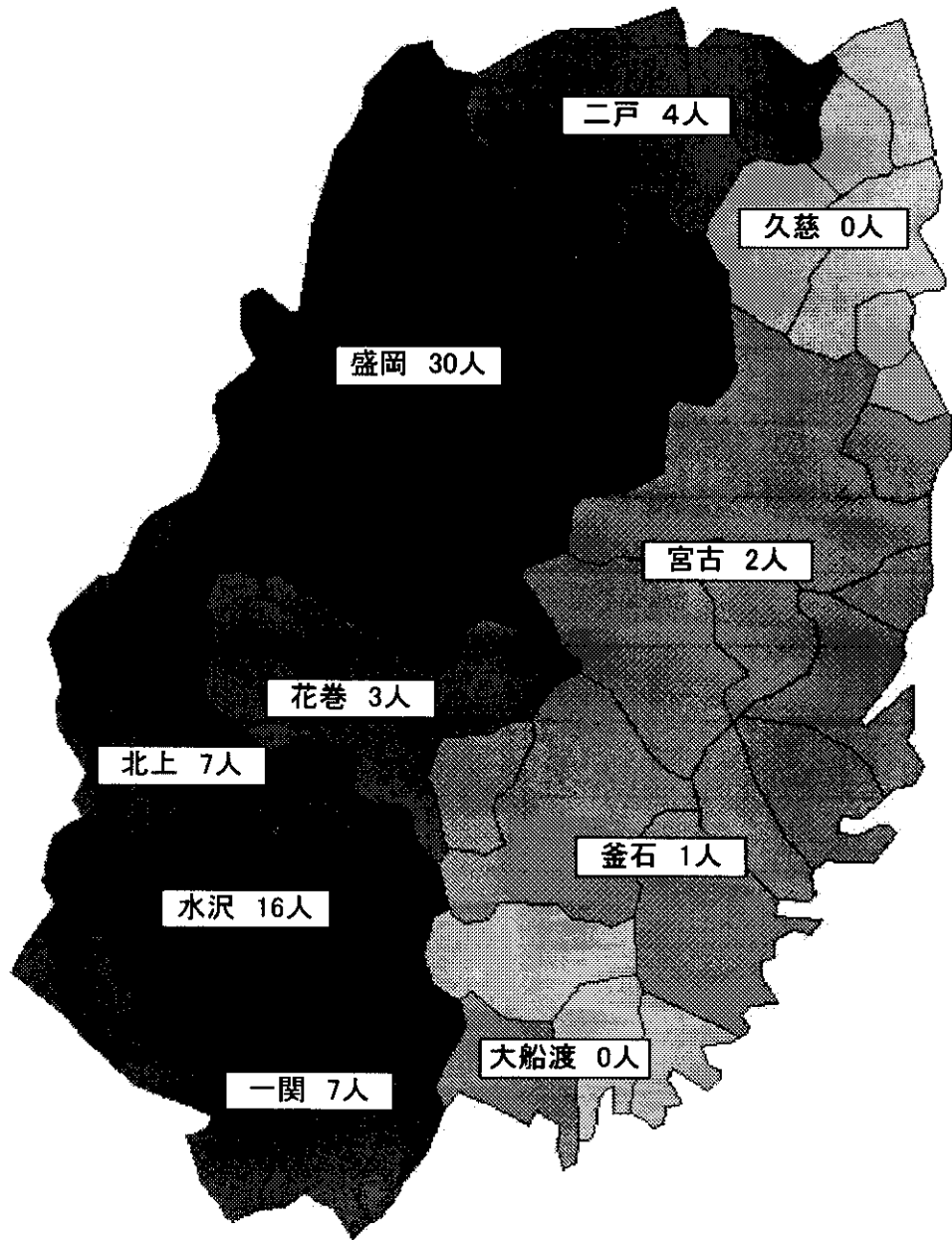


図 3

7. 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業） 分担研究報告書

O157 等腸管出血性大腸菌感染症に関する研究

－パルスフィールド電気泳動法による集団事例の解析－

分担研究者 玉田 清治 岩手県衛生研究所長

研究協力者 熊谷 学、齋藤 幸一、菅原 喜弘、佐藤 卓、
田頭 滋、小林 良雄

研究要旨

岩手県においてヒトから検出された志賀毒素産生性大腸菌についてパルスフィールド電気泳動（PFGE）により遺伝子パターンの解析を行い、それぞれの遺伝子パターンの相同性について比較検討した。

A. 研究目的

平成8年は全国で腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）による集団感染が発生した。県内においても学校給食による集団感染が発生した。これらの事例では、食品が原因菌に汚染されていたと確認された事例もあるが、その食品の汚染経路は解明されていない。

県内で検出された STEC について遺伝子パターンの解析を行い、それぞれの遺伝子パターンの相同性について解析し、感染の予防と拡大防止を図る。

B. 研究方法

平成10年1月から平成11年12月までの間に県内の医療機関等から志賀毒素産生性検査を依頼され、毒素産生性を確認した菌株を対象とし PFGE により DNA パターンの解析を行った。

志賀毒素産生性検査は逆受身ラテックス凝集反応（RPLA）で行った。

PFGE はバイオラドの試薬キットを用い、キットに示された方法により試験を行った。電気泳動装置は CHEF-DRⅢ（バイオラド）を使用し、制限酵素は O157、O111 については Xba I、O26 については Not I を使用した。

C. 研究結果及び考察

志賀毒素産生性検査のために当所によせられた大腸菌の菌株数は、平成10年が 1,305 株、平成11年が 1,252 株で、検査の結果、志賀毒素産生性が確認された菌株はそれぞれ 49 株（3.8%）、71 株（5.7%）であった。

志賀毒素産生株の血清型別、毒素型別の内

訳を表1に示した。血清型別では O26 が最も多く 79 株、次いで O157 が 34 株、O111 が 5 株、O121 と O 型不明がそれぞれ 1 株であった。

毒素産生性別は Stx1 産生株が 78 株、Stx2 産生株が 22 株、Stx1 及び Stx2 産生株が 20 株で、O26:H11（Stx1 産生）株が最も多く 67 株（55.8%）であった。

PFGE により DNA パターンを比較検討した結果、DNA パターンには多様性が認められた。一方、集団事例では、全ての事例で事例内の株間で DNA パターンの一致が認められた。図1、2、3にその例を示したが、集団事例1は、O157 による事例で患者由来株、患者宅で飼育されていた牛の糞便から検出された株及び患者宅の濯水から検出された株の DNA パターンが一致した事例。集団事例2は、食品により感染したと推定された O26 による事例で患者由来株と食品由来株の DNA パターンが一致した事例。集団事例3は、O26 による事例で患者由来株と飼育牛舎内のハエ由来株の DNA パターンが一致した事例である。

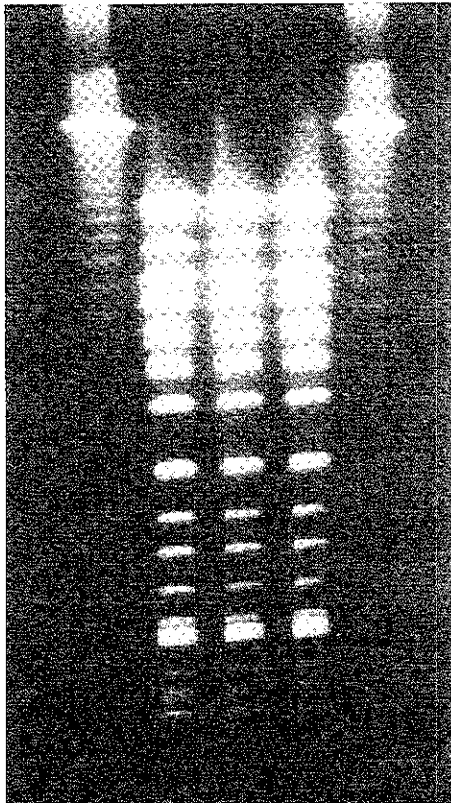
以上岩手県内で検出された STEC の検討結果を示したが、STEC には表現型（血清型及び毒素産生性）においても、遺伝子型においても多様性が確認された。また、今回の調査において検出頻度の低い血清型である O121:H19（Stx2）が平成10年に1株、OUT：HUT（Stx2）が平成11年に1株分離されたことから、今後、種々の血清型の STEC がヒトから検出される可能性が示唆された。

表1 平成10年から11年の患者由来 STEC

血清型	株数	毒素型		
		Stx1	Stx2	Stx1 & Stx2
O157:H7	34	4	13	17
O26:H11	76	67	6	3
O26:H-	3	3		
O111:H-	1		1	
O111:HUT	4	4		
O121:H19	1		1	
OUT:HUT	1		1	
合計	120	78	22	20

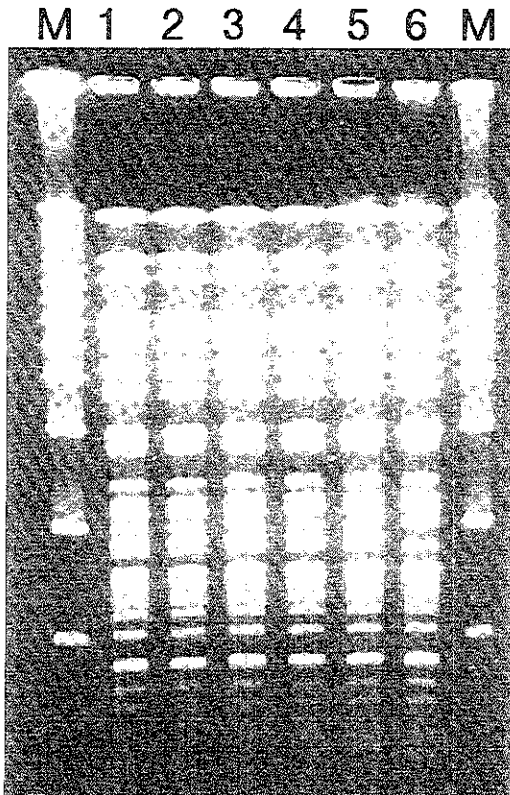
図1 集団事例1 (0157)

M 1 2 3 M



- M : マーカー
- Lane 1 : 被検者由来株
- Lane 2 : 水由来株
- Lane 3 : 牛糞便由来株
- M : マーカー

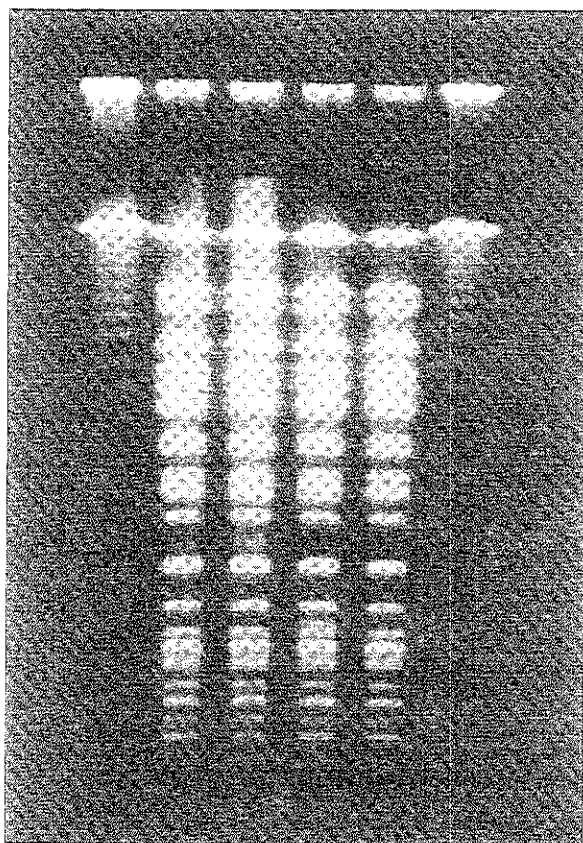
図2 集団事例2 (O26)



- M : マーカー
- Lane 1 : 大福由来株 1
- Lane 2 : 大福由来株 2
- Lane 3 : 大福由来株 3
- Lane 4 : 大福由来株 4
- Lane 5 : 被検者 1 由来株
- Lane 6 : 被検者 6 由来株
- M : マーカー

図3 集団事例3 (026)

M 1 2 3 4 M



M : マーカー
Lane 1 : 被検者1
Lane 2 : 被検者2
Lane 3 : 被検者3
Lane 4 : ハエ
M : マーカー

8. 腸管出血性大腸菌O157:H7の形態変化および志賀様毒素発現におよぼす ホスホマイシン、ノルフロキサシンの作用

研究協力者：根本優子（岩手医科大学口腔微生物学講座）
一戸奈穂子（岩手医科大学細菌学講座）

腸管出血性大腸菌（EHEC）O-157:H7感染症の際に抗菌薬を投与する事が溶血性尿毒症症候群（HUS）の危険因子である志賀様毒素（SLTs）を放出させる可能性が指摘されている。そこで、EHEC O-157:H7にホスホマイシン（FOM）とノルフロキサシン

（NFLX）を1時間作用させて、その影響を調べた。生菌数の測定からはどちらの抗菌薬も殺菌的に働く事、電子顕微鏡による形態変化の観察では、FOM処理では溶菌が、また、NFLX処理では濃度依存性の菌体の伸長がみられた。ELISAによる菌体外SLTsの測定では、NFLX処理では検出限界以下であったが、FOM処理では増加を認めた。しかし、RT-PCR法によるSLT1、SLT2のmRNA発現量にはどちらの抗菌薬でも顕著な差は認めなかった。以上から、FOM処理によるSLTの放出はSLT geneの発現による合成の誘導ではなく、溶菌による事が示唆された。

<研究目的>

近年、世界的な増加傾向を示している腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、我が国でも集団感染が相次ぎ、1996年には指定伝染病とされた。特に、乳幼児では本症の感染率が高く、溶血性尿毒症症候群（HUS）の合併により重篤化することが多いため、早急に有効な予防法、治療法の確立が望まれているが、本症の治療における抗菌薬の使用法についての一定の見解は未だ出ていない。本研究では、1996年の盛岡市の集団感染時の分離菌株（SLT1、2の遺伝子を有する、FOM、NFLX感受性株で、全症例にFOMあるいはNFLXを投与し、HUSの合併例はみられなかった）を用いて、厚生省治療マニュアルで推奨され、本症の治療に広く用いられているFOM、NFLXが菌の形態、SLTの菌体外への放出、およびSLT遺伝子発現の誘導にどのような影響をおよぼすかについて検討を行った。

<材料および方法>

菌株：1996年盛岡市M小学校でのEHEC集団感染時に患児の糞便から分離したEHEC O-157:H7 M1-2を使用した。

使用薬剤とMICの測定：FOM、NFLXの2剤を使用し、FOMのMICはホスホマイシンMIC測定小委員会法で、また、NFLXのMICは日本化学療法学会標準法に基づく微量液体希釈法により測定した。

電子顕微鏡観察：対数増殖期の被験菌株 10^8 cfuを、FOM 100 μ g/ml、NFLX 1.0 および0.1 μ g/mlの培地に接種し、37℃、1時間培養した。その後、抗菌薬処理後被験菌株の遠心沈渣を固定、包埋して、超薄切片を作成し、電子染色後に、透過型電子顕微鏡で観察した。

生菌数の測定：抗菌薬処理後の生菌数は菌液を適宜生理食塩水で希釈し、その希釈液0.1 mlをNutrient Agarに接種して一夜培養後にコロニー数を数えて算出した。

ELISA法によるSLT量の測定：被験菌株を抗菌薬処理した後の上清をNovapath EHECペロ毒素EIAでSLTの総量を測定した。

RT-PCR法によるSLT mRNAの検出：抗菌薬処理後被験菌株からRNAを抽出し、常法のRT-PCR法を行った後、PCR産物を電気泳動して、エチジウムブロマイドで染色した。

<結果>

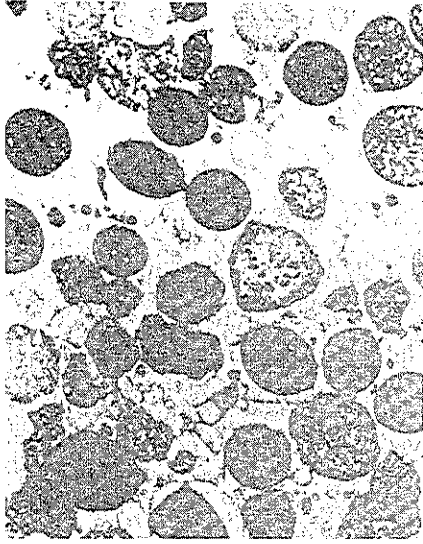
使用薬剤のMIC：FOMのMICは好気培養で4 $\mu\text{g/ml}$ 、嫌気性培養で2 $\mu\text{g/ml}$ 、また、NFLXのMICは好気培養、嫌気性培養ともに0.0125 $\mu\text{g/ml}$ であった。

抗菌薬処理による菌の形態変化：FOM処理では溶菌が、NFLX処理では濃度依存性の菌体の伸長がみられた (Fig. 1)。

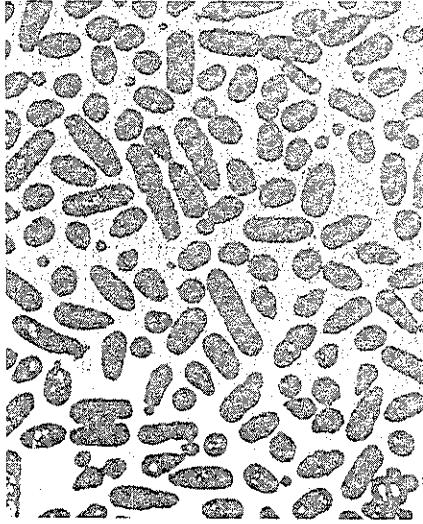
抗菌薬処理後の生菌数と菌体外SLT量：対照では1時間で若干の菌数の増加がみられたのに対し、NFLX 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 処理では変

化がなく、FOMおよびNFLX 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 処理では著しい減少がみられた。また、菌体外SLT量については、対照およびNFLX処理群では検出限界以下であったが、FOM処理では増加した。しかし、その量は24時間培養後の対照上清中のSLT量を越えなかった (Fig. 2)。

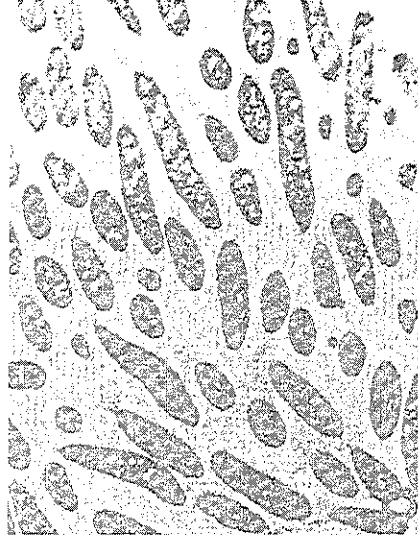
RT-PCR法によるSLT1、SLT2 mRNAの検出：FOM、NFLX、どちらの抗菌薬でも顕著な差は認めなかった (Fig. 3)。



2 μm



2 μm



2 μm



2 μm

Fig. 1. Transmission electron micrograph of EHEC O157 : H 7
EHEC O157 : H 7 was cultured a) in the absence of antibiotic or in the presence of b) 100 μg/ml of FOM,
c) 1 μg/ml of NFLX and d) 0.1 μg/ml of NFLX.

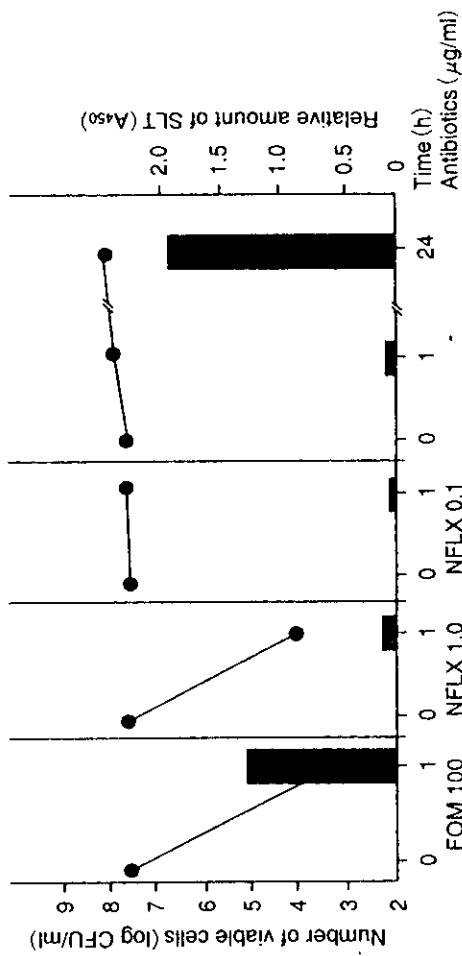


Fig. 2. Effects of FOM and NFLX on the survival of EHEC O157 : H 7 and on the release of SLTs. Relative amounts of SLTs in the culture supernatants (■) were measured by ELISA. Number of viable cells (●) were counted on Nutrient agar plates.

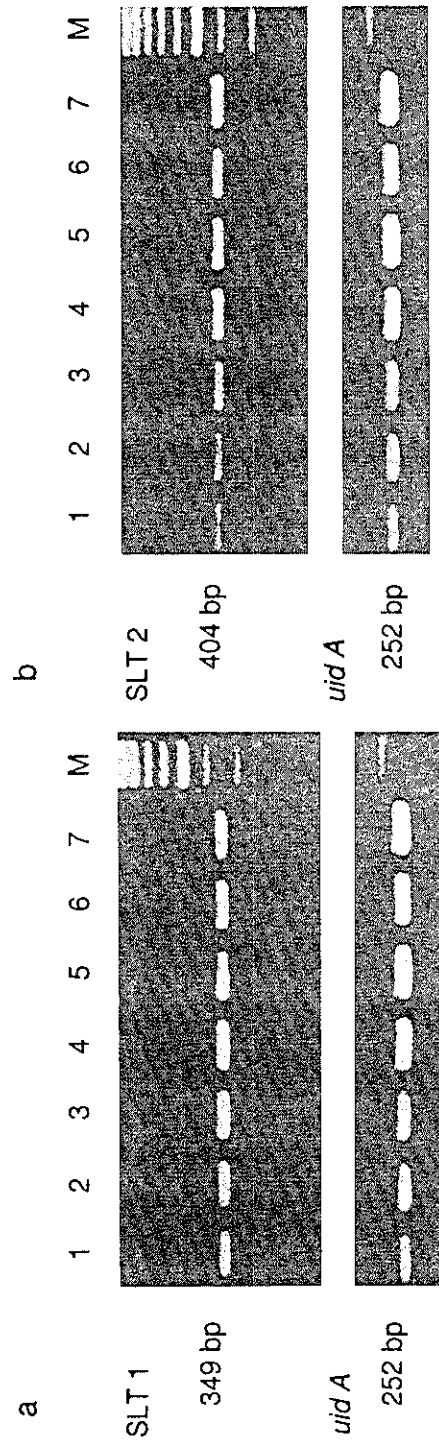


Fig. 3. RT-PCR analysis of SLT 1 and SLT 2 mRNA

Total RNA was obtained from EHEC O157 : H 7 cultured in the absence or presence of antibiotics. RT-PCR products were subjected to agarose gels, and stained with ethidium bromide. Lane 1, one-hour culture in the presence of 100 μ g/ml of FOM; lane 2, 10 μ g/ml of NFLX; lane 3, 1 μ g/ml of NFLX; lane 4, 0.1 μ g/ml of NFLX; lane 5, a culture in the absence of antibiotics, 0 h; lane 6, 1 h; lane 7, 24 h; lane M, 100bp DNA Ladder (Takara, Tokyo, Japan)

9. 腸管出血性大腸菌に対する各種抗菌剤の最小発育阻止濃度の測定 — 3種類の測定法による比較検討 —

研究協力者： 狩野 敦（盛岡市立病院）

神 光輝（盛岡市立病院臨床検査部）

高橋勝雄、小野寺直人（岩手医科大学薬剤部）

永井謙一（岩手県立宮古病院） 上野照子（岩手県立宮古病院臨床検査部）

川村芳則、木村美浩（小田島盛岡臨床検査センター）

腸管出血性大腸菌に対するフロージンプレート栄研の感受性検査結果と、VITEK および Walk Away における感受性検査結果の比較検討を行い、その相関性を検討した。

提供菌株は腸管出血性大腸菌感染患者より分離された 115 株で、その内訳は O-157 : 33 株および O-26 : 77 株、O-111 : 5 株である。MIC の比較結果では、3 方法とも MIC50 および MIC90 での結果においてはほぼ良好な相関性を認めたが、低感受性株においては感受性、耐性のカテゴリーにおいて 4 株の不一致が認められた。

A. 研究目的

感染症の診断と治療のためには、迅速かつ正確な細菌検査が要求される。特に、抗菌剤による治療が、経験的投与で行われている現状においては、極めて重要なことと考えられる。そのため、最近では自動細菌検査装置を導入し、このニーズに応えている施設が多くなっているが、臨床での利用においては各検査装置における測定値に高い相関性が求められる。

今回、我々は腸管出血性大腸菌の MIC を自動細菌検査装置である VITEK^{1,2)} および Walk Away³⁾ で測定した結果とフロージンプレート栄研を用い微量液体希釈法で測定した結果について、その相関性を見るため比較検討した。

B. 研究方法

<測定法>

自動細菌検査装置である VITEK および Walk Away のほかフロージンプレート栄研（以下栄研と略）を用いた微量液体希釈法の 3 種類の方法にて、それぞれの機器の操作手順に従い測定した。

<使用抗菌剤および菌株>

菌株は感染患者より分離した腸管出血性大腸菌 115 株を対象とした。その内訳は、O-157 が 33 株、O-26 が 77 株、O-111 が 5 株である。

また、使用抗菌剤は表 1 に示すごとく、VITEK では 16 種類、Walk Away では 21 種類、栄研では 7 種類を使用した。

C. 結果

<腸管出血性大腸菌に対する各種抗菌剤の MIC の比較>

3 種類の方法で測定した MIC の結果を表 2, 表 3, 表 4 に示した。また、3

方法に共通した薬剤については比較の目的で表5にまとめて示した。

ABPC、MINO、FOMにおいては、MIC50、MIC90において3方法の測定値はほぼ一致していたが、FOMのようにrangeにおいて大きな差の認められるものもあった。また、Walk AwayとVITEKの比較ではPIPC、CEZ、GM、ST、CVA/AMPCおよびIPMともほぼ一致していたが、CVA/AMPC、IPMのように両者の薬剤希釈段階のとりかたに大きな開きのあるものも認められた。VITEKと栄研の比較では、CPはよく一致していたが、NFLXは一致するものの希釈段階に問題が示唆された。

<感受性分布による比較>

MICの比較をさらに詳細にみるため、ABPC、MINO、FOM、IPM、CEZ、CCL、CPについてそのMIC累積分布を図1から図7に示した。

ABPCにおいては、栄研とWalk Awayは完全に一致し、VITEKでも約1管の違いで、良好な結果であった(図1)。MINO、FOMについては3方法とも良く一致しているのが認められた(図2, 3)。CEZとIPMではWalk AwayとVITEKに約2管の差はあるものの一致していた(図4, 5)。また、CCLでは栄研とWalk Awayが、CPでは栄研とVITEKがMIC50でほぼ、MIC90で完全な一致が認められた(図6, 7)。

<低感受性株に対するMICの比較>

3種類の方法で、それぞれ低感受性と認められた株についてMICを比較するため、そのMICを表6に示した。17株のうち、12株については3方法とも

耐性を示し、一致していた。しかし、菌株No.52およびNo.79のFOMにおいては、Walk AwayとVITEKでは感受性で一致していたが、栄研では耐性で、不一致であった。No.79はCCLにおいても、Walk Awayで感受性、栄研で耐性を示し不一致であった。また、No.74のMINOでは、3方法とも低感受性を示し一致していたが、VITEKのMICが他方法に比べ、約1管高い値であった。一方、No.78のMINOにおいては、Walk Awayと栄研は耐性で一致していたが、VITEKは感受性で不一致であった。

D. 考察

感受性試験結果の迅速報告の有用性については、経験的治療の早期修正が可能であることばかりでなく、耐性菌の早期対策、院内感染の予防対策にも大きく貢献できる点にある。そのため、結果として経済的面や労働面での効果も得ることが可能である。そうしたことから、最近では迅速かつ正確な自動細菌検査装置の導入が多く施設でなされているが、臨床での活用には装置間の精度面での高い相関が求められる。

今回の3種類の方法でのMICの比較では、3方法間に対応する抗菌剤の数はあまり多くなかったが、MIC50およびMIC90の比較において試験管1-2管の差を認めるものがあるものの、不一致と認められる測定値はなく、3方法間で高い相関があることが認められた。一般には、2管差以内であれば、一致するとされており⁴⁾、この成績は妥当なものと考えられる。しかし、低感受性株について限っていえば、Walk AwayおよびVITEK

で感受性、栄研で耐性のものが2株、Walk Away および栄研で耐性、VITEK で感受性のものが1株、Walk Away で感受性、栄研で耐性のものが1株認められた。これは、自動細菌検査装置である Walk Away および VITEK の原理と栄研の原理が異なることからきているものと考えられる。宮本ら⁴⁾は、特に耐性傾向の強い株においては、VITEK で感受性、栄研で耐性を示す傾向があると報告しており、我々の得た成績もこれを支持するものであった。

以上のことより、こうした傾向を考慮して使用するならば、自動細菌検査装置は極めて利用価値の高いものと思われた。

E. 文献

- 1) Moore,DF., S.Hamada, E.Marso, and W.J.Martin:Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacilli from blood cultures by the automicrobic system. J. Clin. Microbiol.,13:934-939,(1981).
- 2) 長沢光章：自動機器ーバイテック (VITEK) .臨床と微生物,22(6):669-675.
- 3) 川上小夜子、生方公子：全自動細菌同定・薬剤感受性検査システム「autoSCAN Walk Away」。臨床と微生物,19(3):27-33,(1992).
- 4) 宮本仁志、半田智子、井上千春、村瀬光春：VITEK 45 Well 感受性カードを用いた迅速性と精度について。JARMAM,9(2):55-58,(1998).

表1. 各方法で使用した抗菌剤の一覧

Walk Away	VITEK	栄研
ABPC	CVA/AMPC	ABPC
PIPC	ABPC	CCL
CEZ	CEZ	NFLX
CAZ	CFIX	CP
CPR	CTM	MINO
CMZ	CP	FOM
CCL	CPFX	KM
CFPM	FOM	
CZOP	GM	
CVA/AMPC	IPM	
SBT/CPZ	MINO	
IPM	LMOX	
MEPM	NFLX	
FMOX	PIPC	
AZI	TOB	
GM	ST	
AMK		
MINO		
FOM		
ST		
LVFX		

表2. 各種抗菌剤の腸管出血性大腸菌に対するMIC (Walk Away)

Drug	MIC(μ g/ml)		
	50%	90%	range
ABPC	\leq 4.0	\leq 4.0	< 1.0 - 16 <
PIPC	< 8.0	< 8.0	< 8.0 - 64 <
CEZ	< 1.0	< 1.0	< 1.0 - 16 <
CAZ	< 1.0	< 1.0	< 1.0 - 2.0
CPR	< 1.0	< 1.0	< 1.0 - 2.0
CMZ	< 2.0	< 2.0	< 2.0 - 32 <
CCL	< 2.0	< 2.0	< 2.0 - 16 <
CFPM	< 1.0	< 1.0	< 1.0 - 2.0
CZOP	< 1.0	< 1.0	< 1.0
CVA/AMPC	\leq 2.0	\leq 4.0	< 1.0 - 16 <
SBT/CPZ	< 4.0	< 4.0	< 4.0 - 8.0
IPM	< 0.5	< 0.5	< 0.5 - 1.0
MEPM	< 0.5	< 0.5	< 0.5 - 2.0
FMOX	< 1.0	< 1.0	< 1.0 - 16 <
AZT	< 2.0	< 2.0	< 2.0 - 16
GM	< 0.5	< 1.0	< 0.5 - 2.0
AMK	< 2.0	< 2.0	< 2.0 - 8.0
MINO	< 1.0	< 1.0	< 1.0 - 8.0 <
FOM	< 4.0	\leq 16	< 4.0 - 16 <
ST	< 0.5	< 0.5	< 0.5 - 2.0 <
LVFX	< 0.5	< 0.5	< 0.5

N=115

表3. 各種抗菌剤の腸管出血性大腸菌に対するMIC
(VITEK)

Drug	MIC(μ g/ml)			range
	50%	90%		
CVA/AMPC	\leq 8.0	\leq 8.0	$<$ 8.0	— 32 $<$
ABPC	2.0	2.0	1.0	— 32 \leq
CEZ	\leq 8.0	\leq 8.0	$<$ 8.0	— 16
CFIX	\leq 1.0	\leq 1.0	$<$ 1.0	— 4.0 \leq
CTM	\leq 16	\leq 16	\leq 16	
CP	4.0	8.0	$<$ 1.0	— 8.0
CPFX	0.5	0.5	\leq 0.5	
FOM	16	16	$<$ 16	— 32
GM	0.5	$<$ 1.0	$<$ 0.5	— 1.0
IPM	4.0	4.0	\leq 4.0	
MINO	2.0	2.0	$<$ 2.0	— 16 \leq
LMOX	4.0	4.0	\leq 4.0	
NFLX	4.0	4.0	\leq 4.0	
PIPC	8.0	8.0	$<$ 8.0	— 128
TOB	0.5	$<$ 1.0	$<$ 0.5	— 1.0
ST	0.5	\leq 0.5	\leq 0.5	

N=115

表4. 各種抗菌剤の腸管出血性大腸菌に対するMIC
(フローゾーンプレート法研:好気培養)

Drug	MIC(μ g/ml)		
	50%	90%	range
ABPC	≤ 2.0	≤ 4.0	1.0-128<
CCL	≤ 2.0	≤ 4.0	0.5-128<
NFLX	≤ 0.06	≤ 0.12	0.06-1.0
CP	≤ 8.0	≤ 8.0	4.0-64
MINO	≤ 1.0	≤ 2.0	0.5-16
FOM	≤ 2.0	≤ 16	0.5-512
KM	≤ 4.0	≤ 4.0	2.0-128

N=115(0-157:33株, 0-26:77株, 0-111:5株)