

平成9 - 11年度厚生科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

総括及び総合研究報告書

O157 感染症の菌学的特性に基づく動向調査に関する研究

主任研究者 渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌部

平成 11 年度総括研究報告書

○157 感染症の菌学的特徴に基づく動向調査に関する研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌部長

1999 年度における腸管出血性大腸菌 ○157 事例は大規模なる集団事例こそ減少しているが依然として保育園、老人ホーム等における小規模集団事例、並びに散発及び家族内感染事例の発生が続いている。昨年度に引き続き PFGE 及びファージ型を用いた細菌学的解析結果から、EHEC ○157 の遺伝型はより一層多様になる傾向にあり、汚染原因が異なると遺伝型も異なっていることがはっきりしてきた。このことは、同一の PFGE 型を示す EHEC ○157 が、互いに離れた地域で発見された場合には、共通の汚染原因を考慮すべきであることを示している。つまり、“diffuse outbreak” の発見に有効であると考えられる。昨年に引き続き、一定の精度管理の基に、EHEC ○157 および *Salmonella* Typhimurium の全国的薬剤耐性検査を行った。その結果、1711 株の EHEC ○157 の中で、1 剤以上の耐性を示すものが 24% (415 株) 見られ、昨年度の 18% より明らかに増加していた。その中には、ABPC, SM, TC, TMP 等の臨床的に使用されていない薬剤に対する耐性が殆どであった。また、臨症的に使用されている FOM 耐性が 4 株、NA 耐性が 3 株みられているが、それらの耐性率は昨年度と同様であった。一方、*Salmonella* Typhimurium における耐性菌の頻度は昨年度の 6.4% よりも増加し、71% を示した。5 剤以上の耐性を示すものが耐性菌の 21% を占めていた。

分担研究者：

早坂晃一；山形衛生研究所所長
鈴木重任；東京都立衛生研究所所長
庄田丈夫；石川県保健環境センター所長
江部高廣；大阪府公衆衛生研究所所長
井上博雄；愛媛県立衛生研究所所長
牧野芳大；大分県衛生環境センター所長

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 ○157 による感染症は、1982 年にアメリカで食中毒集団発生事件として発見され、以後、世界中特に先進国で大きな問題を投げかけてきている新興感染症の一つである。わが国に於いては、1990 年の浦

和の幼稚園における集団事例に於いて一時注目されたが、それ以後年間 100 例未滿でしかなかった。ところが、1996 年 5 月から、突如として腸管出血性大腸菌 ○157 による集団及び散発の食中毒事件が日本全国で連続的に多数発生した。1996 年度には、感染者総数 17 千にも及び犠牲者 13 人を出す惨事となった。1997、1998 年も集団発生こそ減少したが、散発事例は 1996 年度と同様な頻度で続いている。今後再び 1996 年度にみられたような集団発生の多発が起こらないとも限らない。菌の形質的および遺伝的変化、環境からの分離状況、患者の発生状況、耐性菌出現状況などの全国的監視を続けて、異常発生の迅

速的感知を行っていく必要がある。本研究はそのための科学的資料を構築することにある。

B. 研究方法

国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所との共同研究により以下の研究を行う。1999年に各地方衛生研究所を中心に集団および散発の腸管出血性大腸菌食中毒事例の患者および原因食品ならびその他の食材等から分離された菌株について以下の性状を調査した。

1. 遺伝学的及び生化学的性状；血清型，ベロ毒素型，制限酵素 *Xba*I 切断後のパルスフィールド電気泳動 (PFGE: pulsed-field gel electrophoresis) 法，

2. 患者，保菌者の発生状況と菌型との関係

3. 薬剤耐性検査；センシデスク (BBL) とミューラーヒントン II 寒天培地 (150mmシャーレの生培地，BBL) を用い，KB 法で統一して全国調査を行った。供試した薬剤は，アンピシリン (ABPC)，クロラムフェニコール (CP)，

ストレプトマイシン (SM)，トリメトプリム/スルファメトキサゾール (ST)，テトラサイクリン (TC)，トリメトプリム (TMP)，シプロフロキササン (CPF)，ゲンタマイシン (GM)，カナマイシン (KM)，ナリジク酸 (NA)，セフトキシム (CTX)，フォスフォマイシン (FOM) の 12 剤である。

C. 研究結果と考察

1. 腸管出血性大腸菌の分離状況

図 1 に 1991 年から 1999 年までに地方衛生研究所で分離された腸管出血性大腸菌 (O157 及び non-O157 を含む) の分離状況を示す。1996 年に大流行を起こした後、1997 年から 1999 年まで毎年 2,000 株近く分離されている。7、8、9 月をピークとする分離傾

向は、この数年変化がなく、今後もこの分離状況が続くものと思われる。大規模な集団発生は少なく、10-50 人程度の中規模の集団事例が保育園、老人ホーム等の集団施設で、10 人以下の小規模集団事例が、焼肉店のお客、家族内感染等でみられる。また、昨年度と同様に、有症者の集団事例の周囲において無症者排菌者がかなりの頻度でみられている。

菌の血清型は、その 8 割以上が O157 であるが、non-O157 としては O26, O111 の分離が増加している。それ以外の血清型として 16 種以上が同定されており、それらは毒素として *stx1* のみを持つものが一番多く、続いて *stx1+stx2*, *stx2* の順になっている (表 1)。志賀毒素遺伝子が、我が国で分離される多くの血清型の菌に入り込んでしまっていることが明らかになった。

2. 1999 年度の全分離株の PFGE 型およびフェージ型解析

図 2-4 に 1997 から 1999 年度の分離株の PFGE 型の分離頻度を示す。大きく I 型として分類されるものが減少し、II, III 型および ND (not determined; I, II, III 等に分類されないものを示すが、非常に多くのものがここに入る) が増えてきていることが分かる。実際は各型がさらに多くの亜型に分けられる。お互いの株に何らかの因果関係がない場合には、全く同じ亜型を示すものはほとんどみられない。つまり、集団発生であるとか、“diffuse outbreak” である場合以外では、同じ亜型を示すことは稀である。それ程 O157 のゲノム構築は変化しやすい。今までは、行政的対応等において分かり易くするために、I, II, III 等の表示を用いて型別を現してきているが、多様性が大きくなるに従いそのような分類は不可能に近く、又意味をなさなくなっている。

今後は、デンドログラムを用い、お互いの近縁度を数値で現して、比較できるようにしていくことを考える必要がある。

I型の中のIa亜型(Ia, I, I)を示す菌が、1997、1998年に関西～中国地方で7-9月にかけて多く分離された(表2、図5)。お互い散発事例であるが、パターンが全く同一であるので”diffuse outbreak”と考えられたが、原因をつかむことができなかった。不思議なことに、1999年度はその型の菌株がほとんど分離されなかった。理由は分からないが、共通の汚染原因と思われるものが関西～中国地方に出現らなくなったのであろうか。

図6-8にEHEC O157のファージ型の分布を示す。1997-1999年まで、毎年PT14, PT21, PT1, PT32, PT39, PT4, PT2, PT40を示す株が多く分離されている。年間の変動を図9、10に示す。1997年の3月頃のPT32のピークは、東海地方一帯のカイワレ汚染(確定していない)が原因と思われる事例である。1998年の5、6月にPT14の分離が多く見られるが、この分離菌の殆どがイクラ事件由来の菌株であった。PT14の菌でもイクラ事件と関係ないと思われる分離菌は、PFGE型は異なっていた。1997、1998年の7-8月辺りに多く分離されたPT21の菌は、上記のPFGE Ia型の菌によるものであった。PT型が同じでも必ずしもPFGE型は同一ではなく、又逆も存在するので、両者を交えた解析が重要である。

3. Non-O157の解析

O157以外のEHECとして、O26, O111等が増加傾向にある。それらの菌の解析にO157と同様にPFGE解析が有用であるかの検討を行った。1997-1999年までに分離されたO26菌についてXbaI制限酵素で切断後、PFGE

解析を行った結果を示す(図11-16)。1997年の株を例にとると、集団発生及び家族内感染等のお互いに因果関係のある患者から分離された菌株は、同一のPFGEパターンを示したが、事件が異なると異なるパターンを示すことが分かり、O157と同じように菌のゲノムは多様性を示すことが判明した。このことは、1998、1999年に分離された菌株を用いても同様の結果であった。クラスタリング解析を行うとさらにはっきりと区別が可能であり(図12、14、16)、お互いに相同性が95%以上あるものは黒く示され、それらは同一の集団事例由来株であった。これらの解析結果は、O26においても、菌のゲノムの多様性をPFGEを用いて検出可能であり、それらは疫学解析に有用であることを示していた。その異同を解析するためには、デンドログラムおよびクラスタリング解析が識別しやすく、有用であった。

4. EHEC O157の薬剤耐性

1999年度も1,711の分離株について、全国一斉に薬剤耐性の実態調査を行った。その結果を表3に示す。各ブロックにおける耐性菌の割合は、13~35%であり、平均で24%であった。1998年の18%より増加傾向にあった。1~3剤耐性を示すものが中心であったが、4、5剤に耐性を示すものもそれぞれ0.4、0.06%見られた。耐性は、主にABPC, TC, SM等に見られ、臨床的にはあまり使用されていない薬剤である。それらは家畜の飼料に使用されている薬剤であり、家畜の間で獲得された耐性菌がヒトに感染したことを示していると考えられる。そのことは、家畜から分離される菌に同様の耐性菌が分離されることから裏付けられる。ヒトの治療に主に使用されているFOMに対する耐性菌が4株、またNA

に耐性株が3株みられたが、CPFX 耐性株は認められなかった。1999年度のFOMの耐性率は1998年度と変わらないが、我が国では、治療にFOMが使われているので、今後の動向をさらに注意しておく必要がある。

5. *Salmonella Typhimurium* の薬剤耐性

サルモネラにおける耐性菌の問題が世界的に注目されてきている。とくに *S. Typhimurium* DT104 における多剤耐性菌の割合が欧米では増加してきているという報告がある。そこで、EHEC O157 の薬剤耐性を調査する機会に同時に本年度も *S. Typhimurium* の薬剤耐性を調査した。その結果を表4に示す。203株のうち144株が1剤以上の耐性を示し、71%を占めていた。耐性率は、昨年度の64%よりも増加していた。特に5剤以上の超多剤耐性を示す割合が、耐性菌のうち21%近くを占めていた。この傾向は、食品、豚肉、鶏肉からの分離菌においても同様であり、動物由来菌がヒトに感染していることを示唆しているように思われる。幸いにも、CTX, CPFX に耐性な菌は認められていない。サルモネラは、菌血症、敗血症を起

E. 発表業績

- 1) Murase, T., Yamai, S., and Watanabe, H. Changes in pulsed field gel electrophoresis patterns observed in clonal isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 associated with loss of shiga toxin genes. *Current Microbiol.* 38: 48-50. 1999
- 2) Jun Terajima, Hidemasa Izumiya, Akihito Wada, Kazumichi Tamura, and Haruo Watanabe. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg.*

し得るので、乳幼児、老人における感染時には、治療に抵抗する可能性があり、充分考慮しておく必要がある。

D. 結論

1999年度の調査の結果、EHEC O157 感染症は全国的に散発事例が多く発生しており、事件数に於いても分離菌株数に於いても、昨年度と代わりなく、かつ減少していない。PFGEの調査の結果、O157ばかりでなくO22のゲノムも多様性を示し、汚染原因が同一と考えられるもの以外はほとんどすべてがお互いに異なるPFGEパターンを示していた。このことは、PFGE解析は、集団事例の確認のため及びdiffuse outbreakを迅速に検知するために有効であることを示した。EHEC O157 およびサルモネラの薬剤耐性検査の結果、耐性率が本年度は昨年度と比べ明らかに増加しており、今後の動向をさらに調査すると同時に、その対策を考える必要性が急務である。ヒトには使用されていない薬剤の耐性菌が見られることから、家畜の飼料等に添加されている薬剤との関連性を調査することが必要であろう。

Inf. Diseases. 5: 301-302, 1999.

- 3) Watanabe, H., J. Terajima, Izumiya, J., Wada, A., and Tamura, K. Molecular analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Japan and its application to epidemiological investigation. *Pediatrics International.* 41: 202-208, 1999.
- 4) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., and Watanabe, H. Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated ikura-sushi ingestion. *Jap. J. Infect. Diseases.* 52: 51-52, 1999.
- 5) Iyoda, S., Wada, A., Weller, J., Flood, J.A.S., and Watanabe, H. Investigation of

the AFLP, high resolution DNA fingerprinting methods, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol. Immunol.* 43:803-806.1999.

6) Izumiya,H., Tamura,K., Terajima,J., and Watanabe,H. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104 and other multi-drug resistant strains in Japan. *J. J. Infect. Diseases.* 52 : 133. 1999

7) Moriya,k. Fujibayashi,T. Yoshihara,T. Matsuda,A. Sumi,N. Umezaki,N. Kurahashi,H. Agui,N. Wada,A. and Watanabe.H Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 carried by the housefly in Japan. *Medical Veterinary Entomology.* 13:214-216.1999.

8) Kobayashi , M., Sasaki, T., Salto,N., Tamura, K., Suzuki, K., Watanabe, H., and Agui, N. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:625-629.1999.

9) Osaka,K., Inouye,S., Taniguchi, K., Okabe,N., Izumiya,,H , Watanabe,H., Matsumoto,Y., Yokota,T., Hashimoto,S., And Sagara,H. Electronic network for monitoring traveler's diarrhea and detection of an outbreak due to *Salmonella* Enteritidis among overseas tourists. *Epidemiol Infect.* 123:431-436.1999

表1。 Distribution of *stx* types in non-O157 EHEC isolates in Japan in 1998

Serogroup	<i>stx</i> type			Total
	<i>stx1</i>	<i>stx1 + stx2</i>	<i>stx2</i>	
O26	257	6	6	269
O111	50	42	3	95
O121	1	0	18	19
O91	10	2	0	12
O145	3	0	1	4
O103	2	1	0	3
O44	2	0	0	2
O119	2	0	0	2
O1	1	0	0	1
O6	0	1	0	1
O8	0	1	0	1
O18	1	1	0	2
O45	0	1	0	1
O55	1	1	0	2
O128	1	1	0	2
O144	1	0	0	1
O146	0	0	1	1
O161	1	0	0	1
OR*	1	0	1	2
OUT†	2	1	2	5
Total	336	58	32	426

*Rough.

†Untypable.

表2。 PFGE Type la strain の国内分布

データの個数 : 0	la*事例	
患者等の住所(都道府県)	la*	総計
愛知県	1	1
岡山県	9	9
岐阜県	3	3
京都府	11	11
広島県	1	1
埼玉県	4	4
三重県	2	2
滋賀県	5	5
神奈川県	1	1
大阪府	51	51
長野県	5	5
鳥取県	1	1
島根県	1	1
福井県	2	2
兵庫県	7	7
総計	104	104

1997年

データの個数 : 0	la*	
患者等の住所(都道府県)	la*	総計
愛媛県	2	2
岡山県	8	8
岐阜県	3	3
佐賀県	1	1
埼玉県	3	3
三重県	1	1
滋賀県	2	2
神奈川県	1	1
千葉県	1	1
大阪府	42	42
長野県	1	1
島根県	2	2
徳島県	1	1
奈良県	11	11
福井県	1	1
兵庫県	3	3
和歌山県	1	1
総計	84	84

1998年

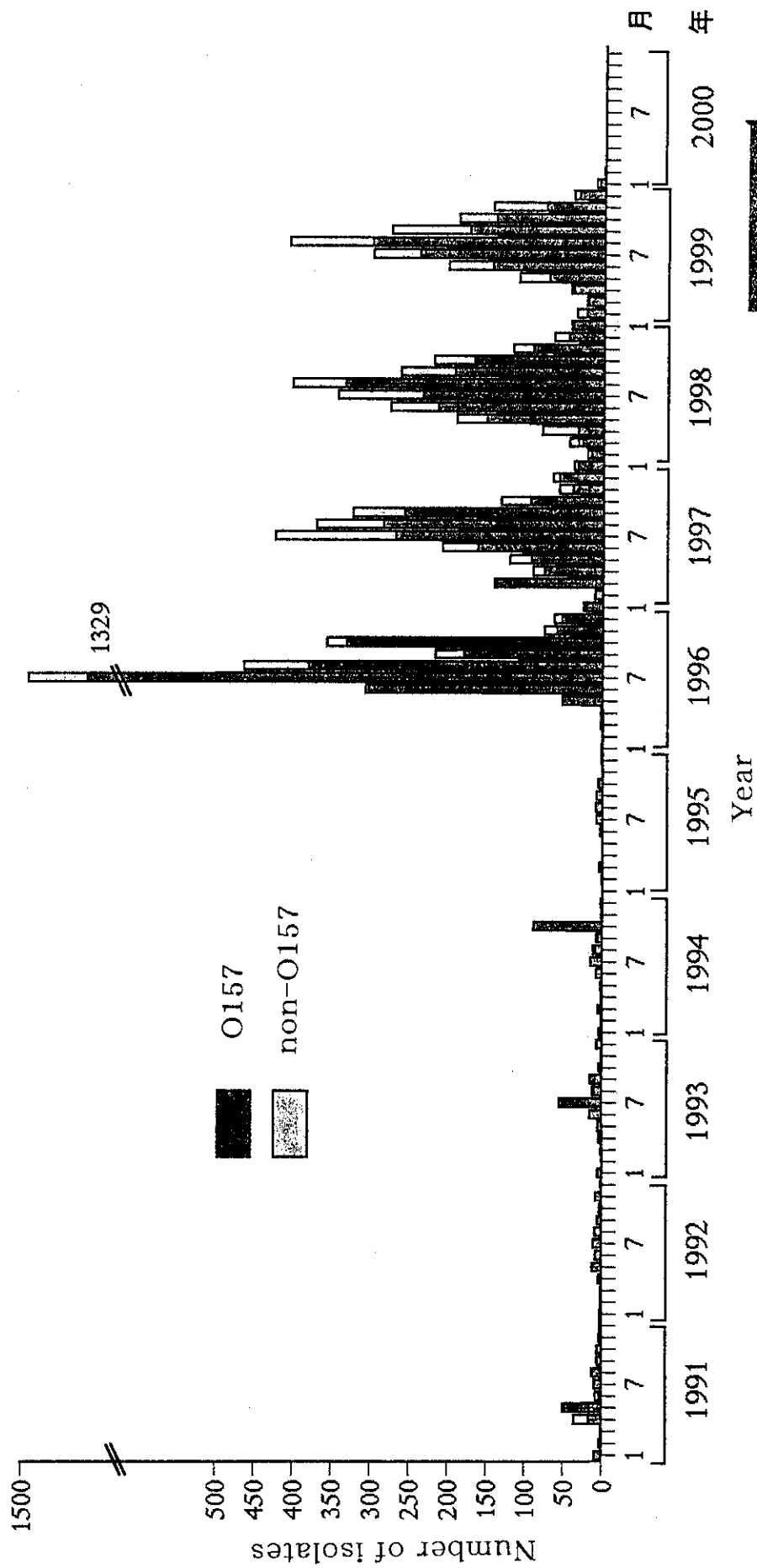
表3 散発事例由来 腸管出血性大腸菌O157の薬剤耐性(1999年分離株)

7 Dvカ	耐性株数(%)						主なパターン(数)	
	供試数	耐性率数(%)	1剤	2剤	3剤	4剤		5剤
北海道、東北、新潟	176	24(13%)	9(4.6%) SM(5) TC(5) CP(1)	14(8.0%) SM.TC(13) ABPC.FOM(1)	1(0.6%) SM.TC.CP (1)			
関東、甲、信、静	587	137(23%)	26(4.4%) TC(11) SM(7) ABPC(8)	68(12%) SM.TC(48) ABPC.SM(16) others(4)	27(4.6%) ABPC.SM.TC(26) others(1)	10(2%) ABPC.SM.TC.TMP(10)	5(0.8%) ABPC.SM.TC.TMP.ST(5)	1(0.2%) TC.SM.KM.ST.ABPC.TMP(1)
東海、北陸	125	44(35%)	8(6%) TC(1) SM(5) FOM(1)	18(14%) SM.TC(10) ABPC.SM(8)	14(11%) ABPC.SM.TC(13) SM.TC.FOM(1)	4(3%) ABPC.SM.TC.KM(1) ABPC.SM.ST.TMP(3)		
近畿	445	111(25%)	12(3%) TC(2) SM(5) ABPC(4) NA(1)	58(13%) SM.TC(28) SM.KM(2) ABPC.SM(27) TC.NA(1)	39(9%) ABPC.SM.TC(38) TC.ABPC.NA(1)	2(0.4%) SM.ABPC.ST.TMP(2)		
中国、四国	192	43(22%)	14(7%) TC(8) SM(2) ABPC(4)	12(6%) ABPC.SM(3) SM.TC(8) KM.GM(1)	11(5%) ABPC.SM.TC(11)	4(2%) ABPC.SM.TC.TMP(4)	2(1%) ABPC.SM.TC.ST.TMP(2)	
九州	186	56(30%)	8(4%) SM(3) ABPC(2) others(3)	23(12%) ABPC.SM(12) SM.TC(11)	24(13%) ABPC.SM.TC(23) ABPC.TMP.FOM(1)	1(0.5%) ABPC.SM.TC.KM(1)		
合計	1,711	415(24%)	77(5%)	193(11%)	116(7%)	21(1.2%)	7(0.4%)	1(0.06%)

表4 *Salmonella Typhimurium* の薬剤耐性(1999年分離株; ヒト、食品などを含む)

ブロック	供試数	耐性株数 (%)	多剤耐性菌の株数(%;耐性菌数/供試数)								
			1剤	2剤	3剤	4剤	5剤	6剤	7剤	8剤	9剤
北海道・東北・新潟	78	67(86%)	20	6	5	18	11	2	5	0	0
関東・甲・信・静	87	55(63%)	9	1	3	24	10	3	4	1	0
東海・北陸	7	9(78%)	1	0	0	3	5	0	0	0	0
近畿	31	13(42%)	0	5	2	2	3	0	0	1	0
中国・四国	報告なし										
九州	報告なし										
合計	203	144 (71%)	30 (15%)	12 (6%)	10 (5%)	47 (23%)	29 (14%)	5 (2%)	9 (4%)	2 (1%)	0

图 1。Number of isolates of enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC)



Infectious Agents Surveillance Report

Fig. 2. PFGE types of isolates in 1997

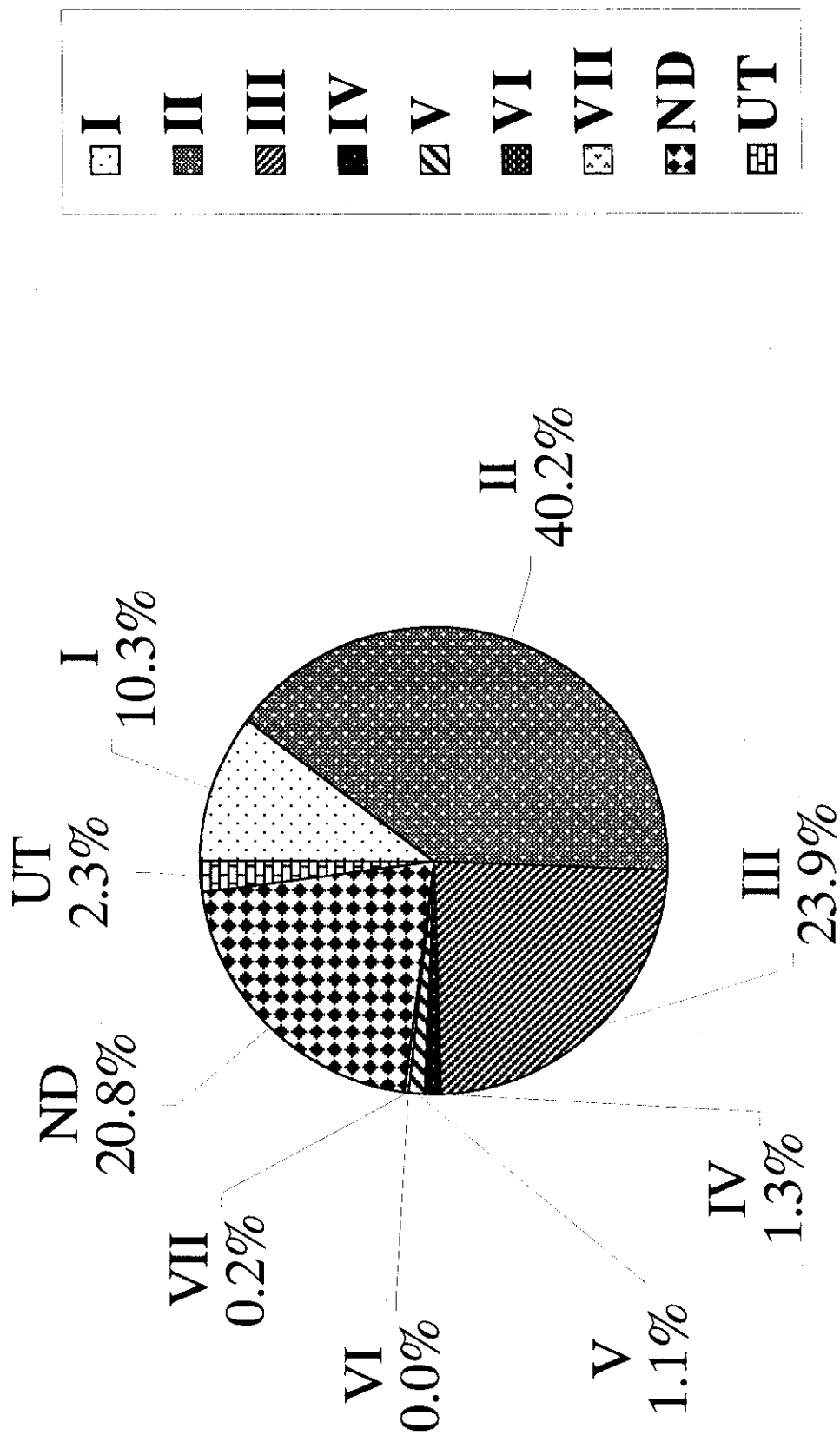


Fig. 3. PFGE types of isolates in 1998

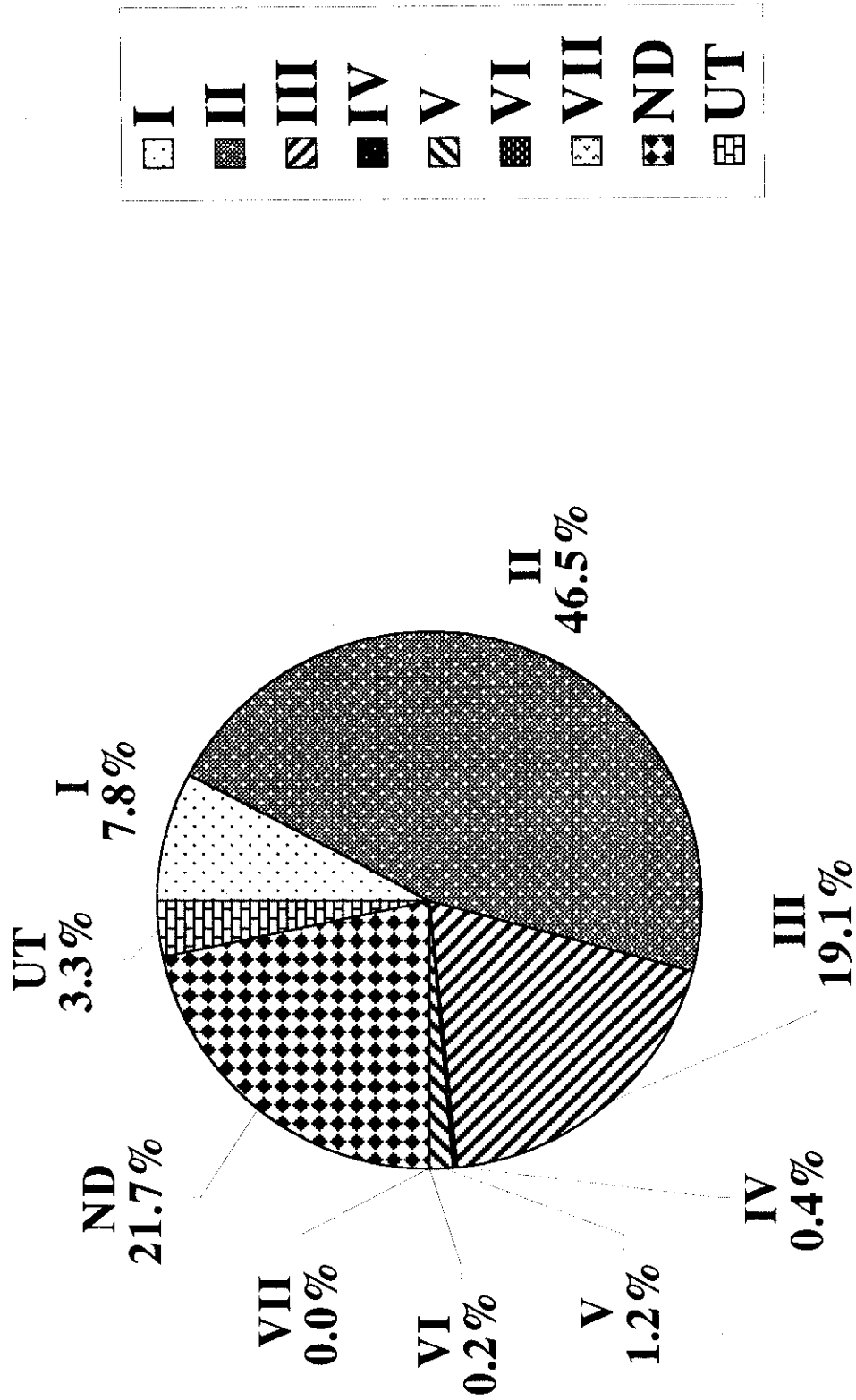
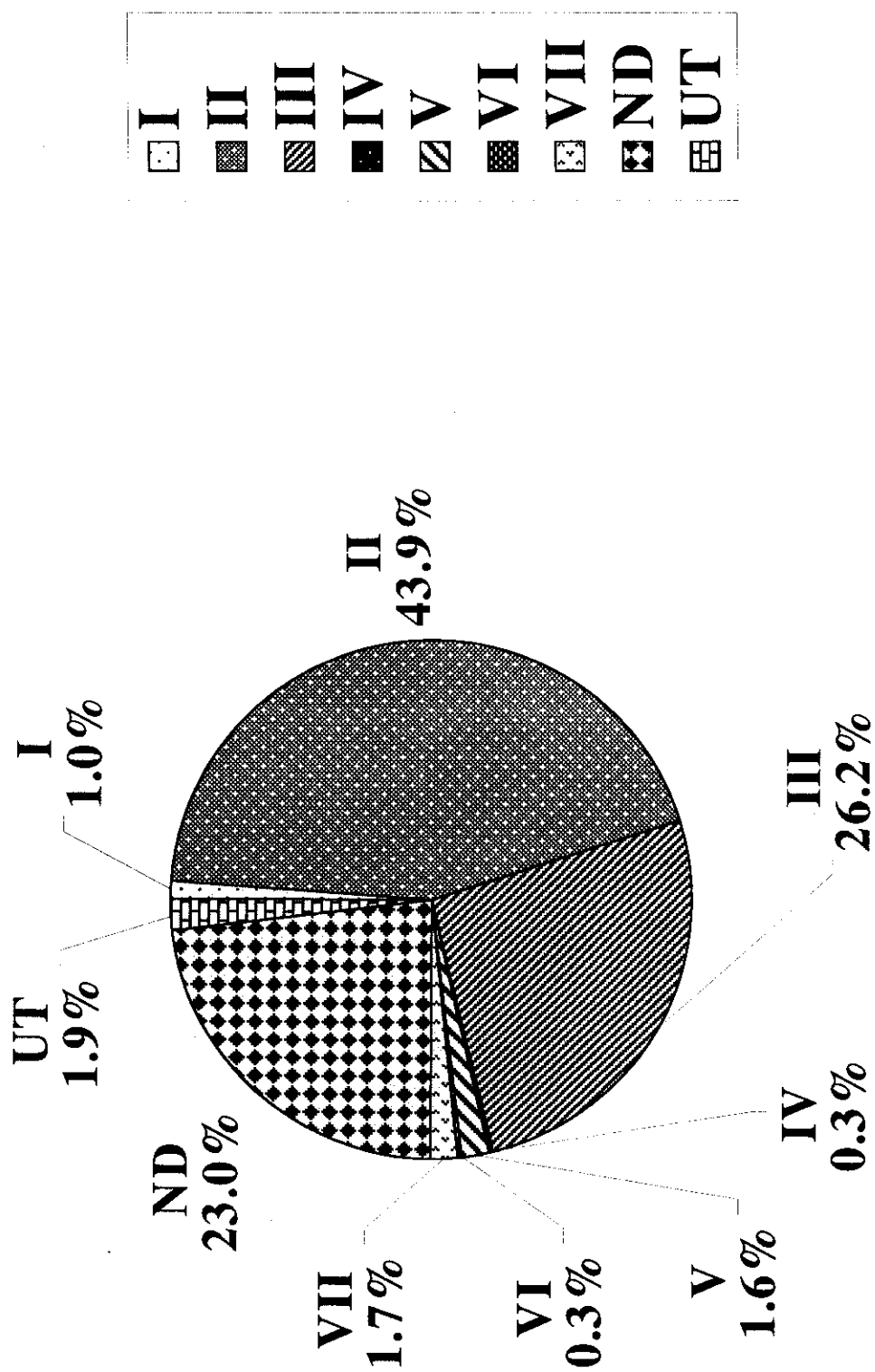


图4. PFGE types of isolates in 1999



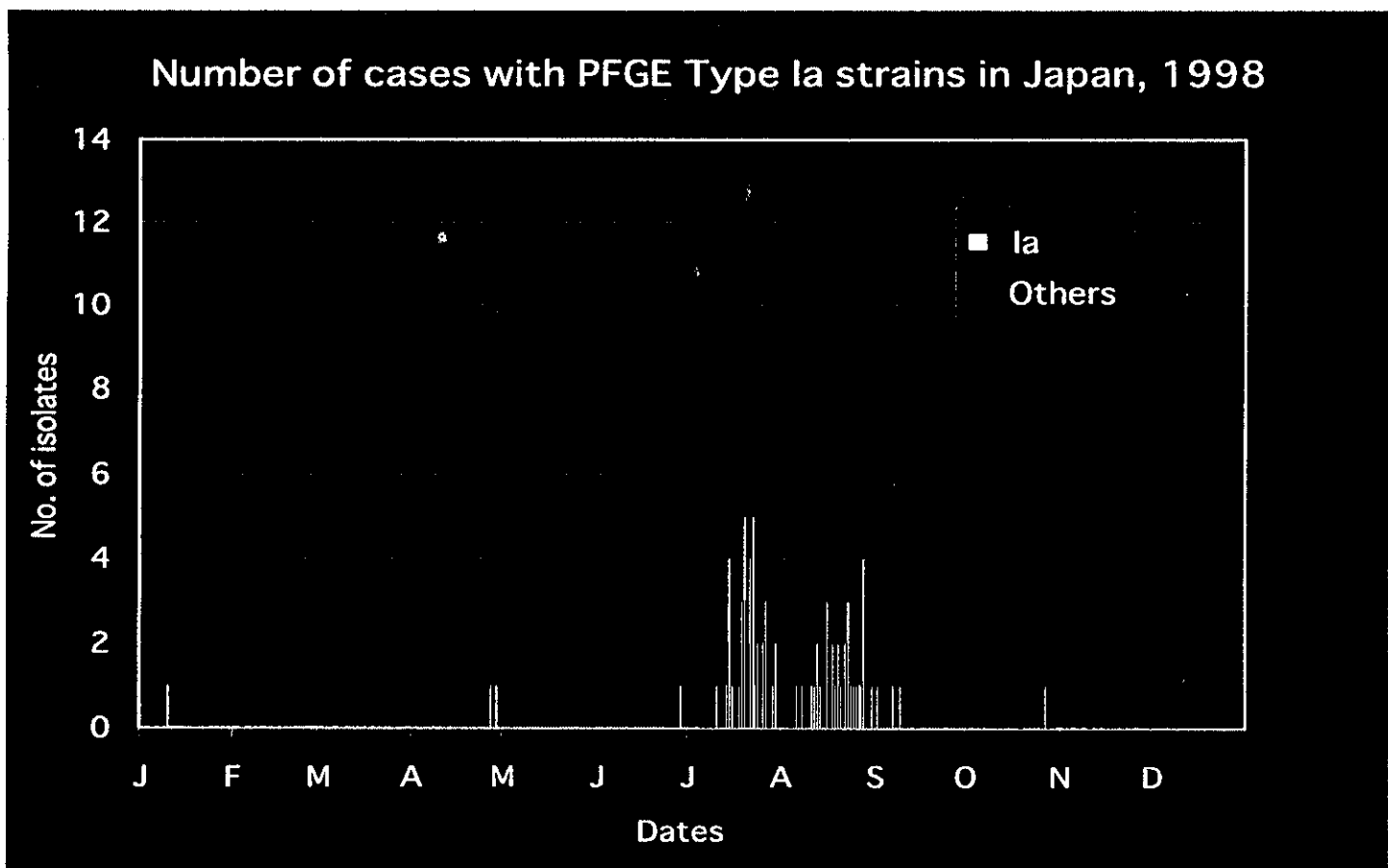
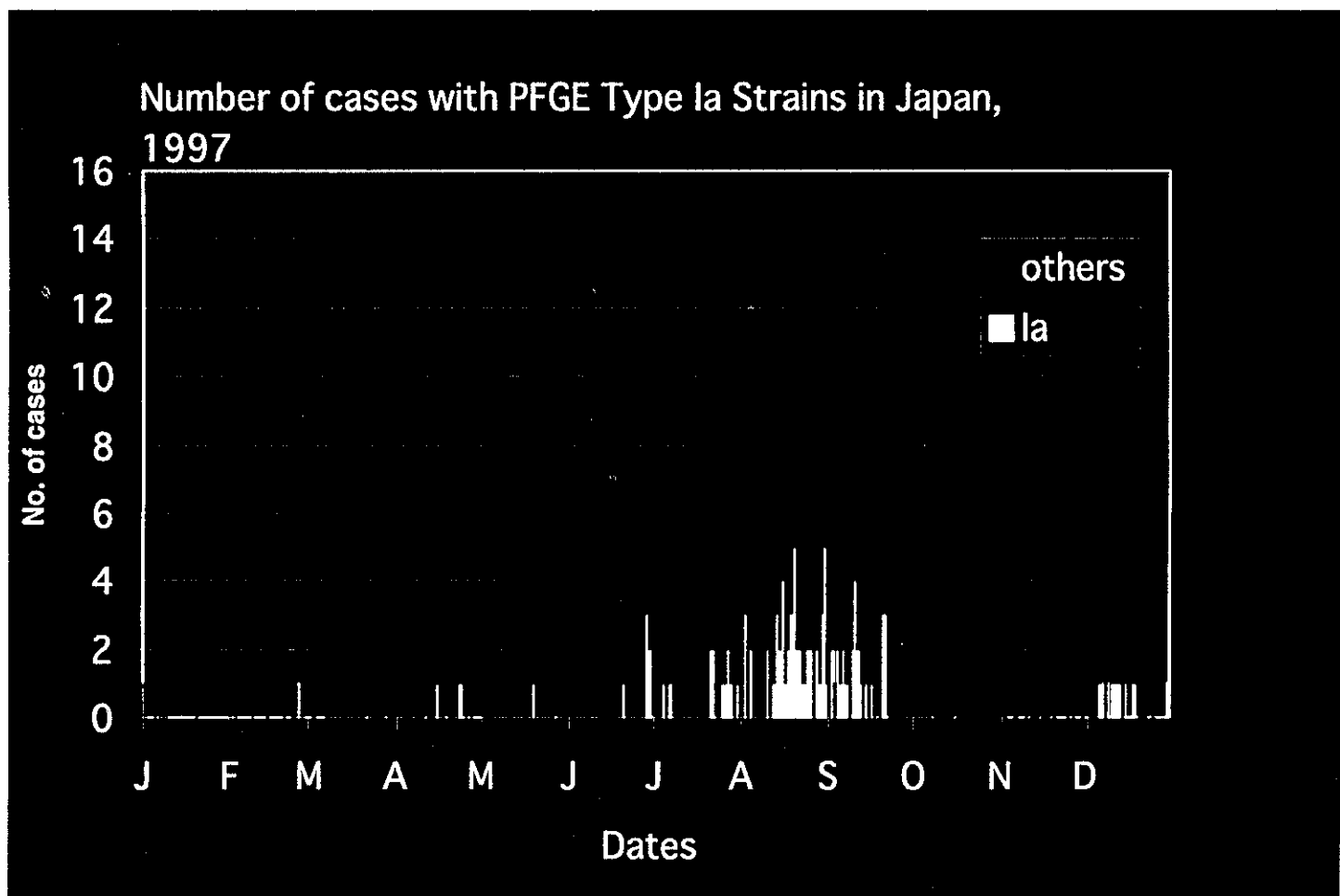


図6。 1997年フアージ型分布

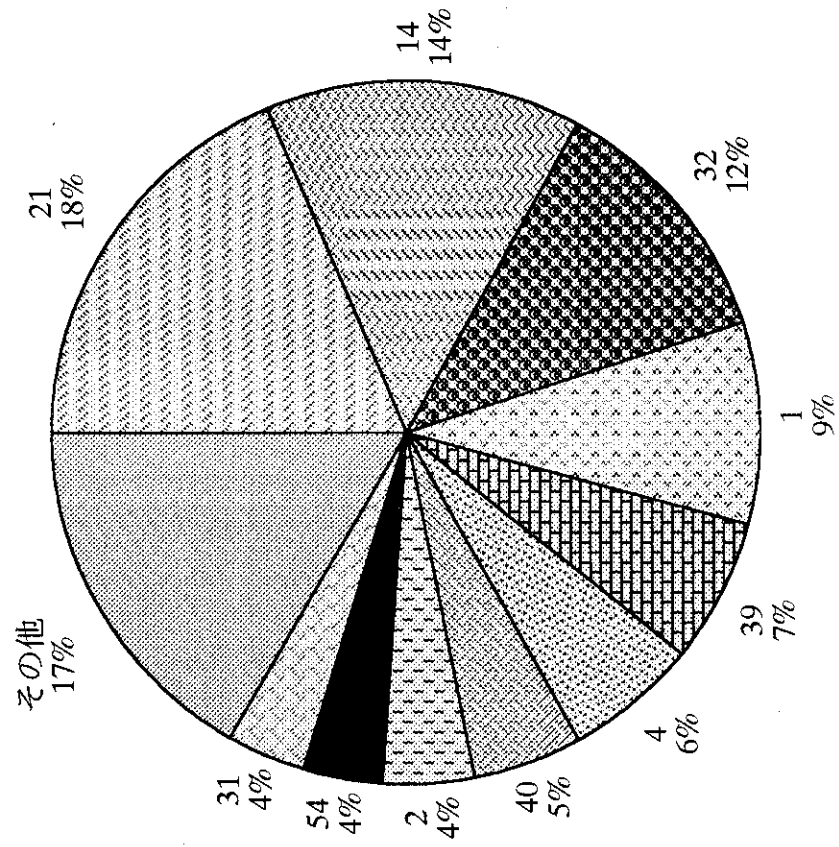


図7。 1998年フアー型分布

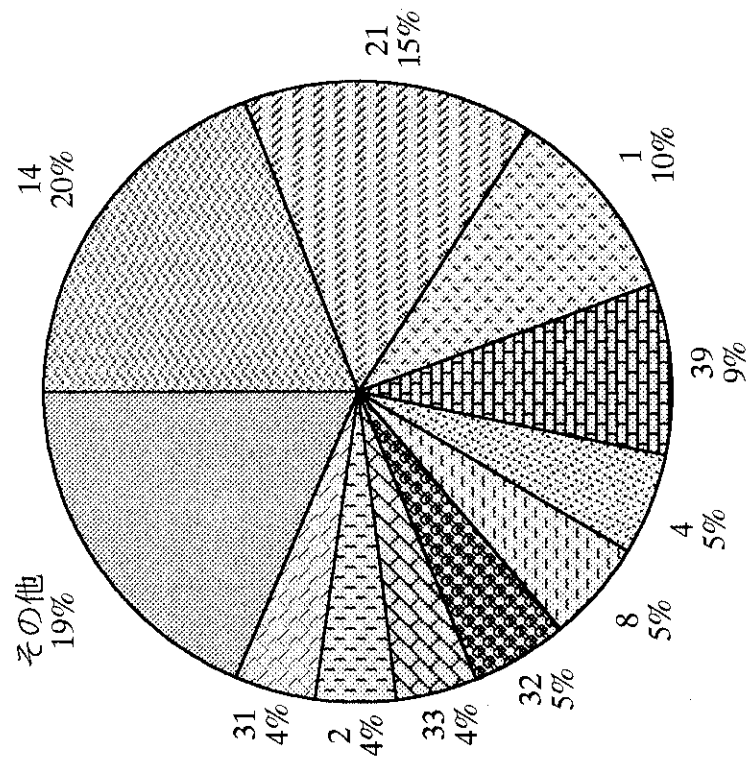


図8。 1999年フアージ型分布

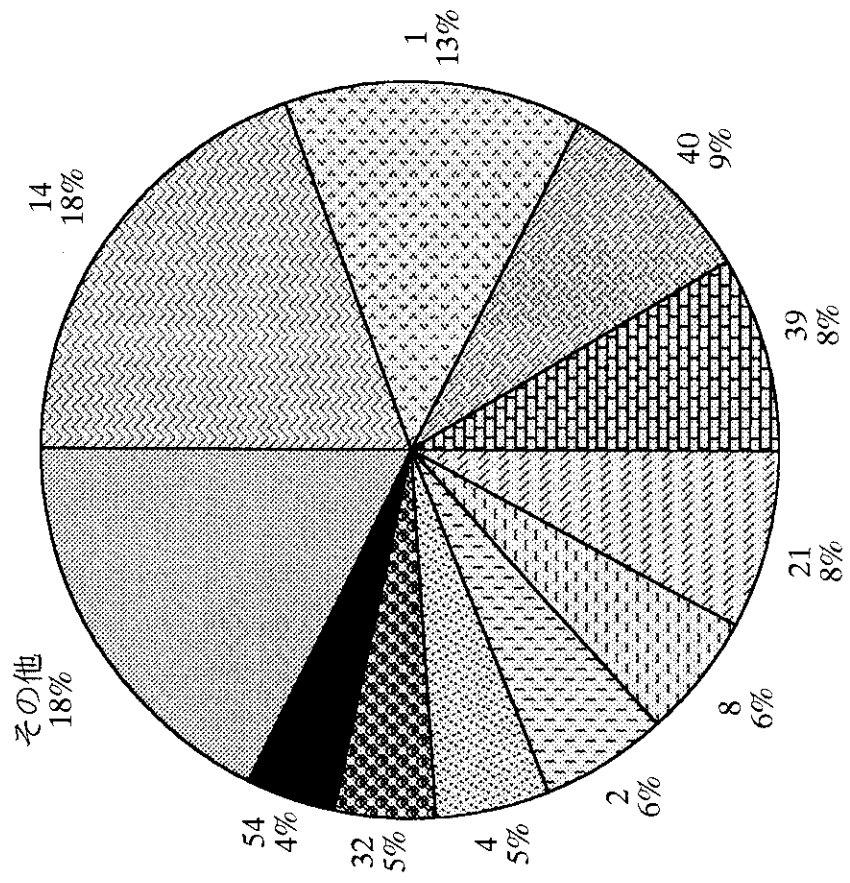


図9。1997年フアージ型月別動向

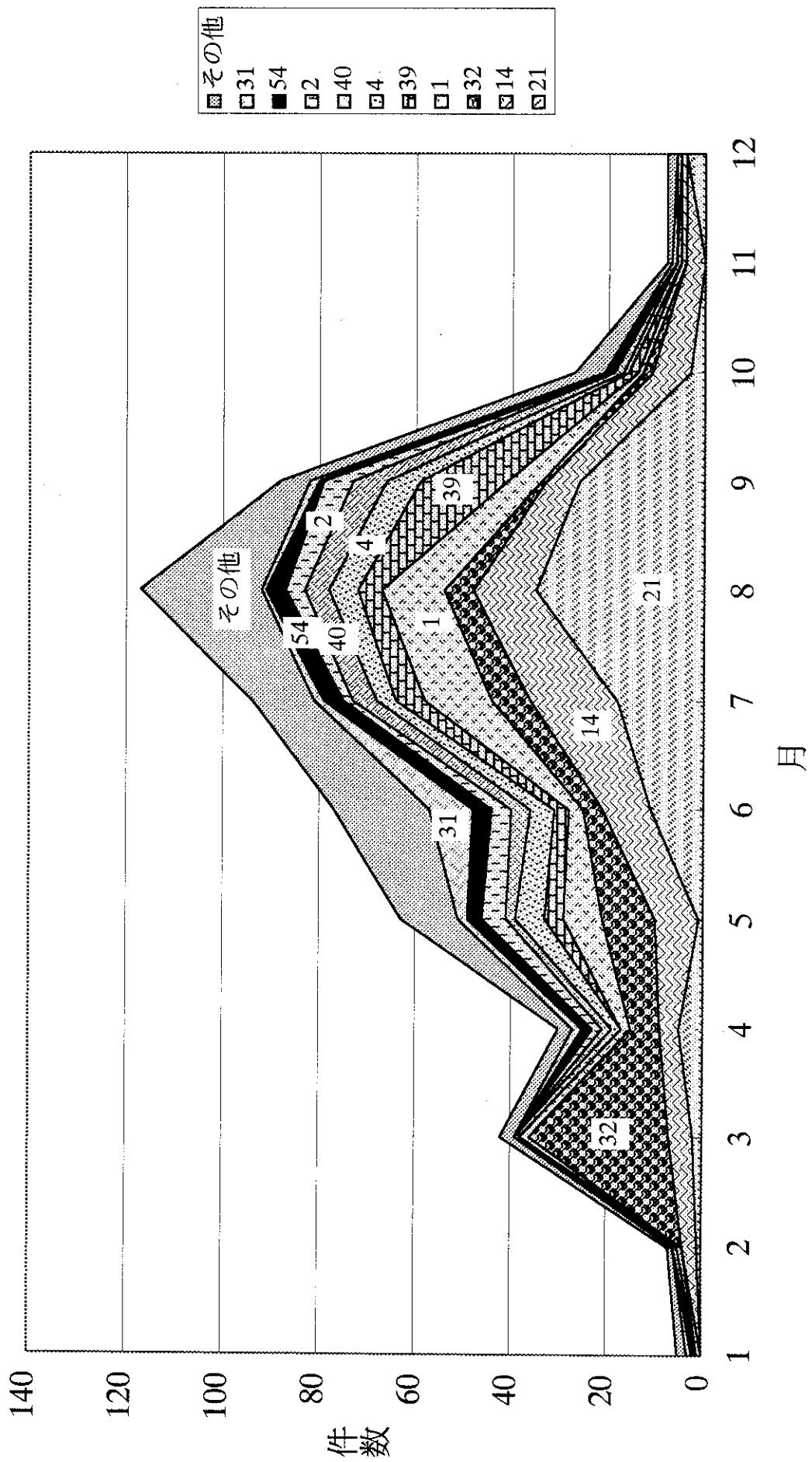


図10。1998年フーシ型月別動向

