

的情報は明らかではなかった。今回の事例では、HUS 発症が確定例の 40.0%にも上り、さらに HUS 発症例の 61.8%が脳症を発症し、14.7%が死亡するという国内でも過去に例を見ない事態となった。

今回の事例においては、HUS の発症は成人女性に多く、国内での O157 による HUS 発症の男女比と一致していた。また、腎臓における細胞レベルでのペロ毒素レセプターである Gb3 発現頻度が、女性で優位に高いという研究結果とも一致していた。成人男性では、透析を要する腎障害や脳症の発症は低く、重症化のリスクは低いと考えられた。

重症例では、早期に結腸壁の著明な肥厚が見られ強い腹痛が出現している。臨床症状の強い症例は、早期に画像診断を行い重症化を予測することが重要と思われる。また、HUS 発症例では尿蛋白が出現し持続する傾向にあった。尿蛋白定性検査は通常のクリニックにおいても可能であり、早期に HUS 発症を検知するためには有用であると思われた。脳症発症例においては血小板減少が急激かつ高度であり、病勢の進行が早いことが示唆された。尿蛋白陽性例では頻回に血小板数を測定することが望ましいと考える。

EHEC 感染症において、経過中に異常言動・行動、意識障害、けいれんなどの神経症状が見られる場合は脳症の発症が疑われるため、速やかに中枢神経系の画像診断を実施する必要があると考えられる。CT 検査による早期の異常の検出は困難で、可能な限り MRI 検査が推奨される。T2 強調・FLAIR 画像、あるいは拡散強調画像のみでも異常の検出は可能であるが、早期には拡散強調画像が有用と考えられた。

E. 結論

O111 による EHEC 感染症においても、小児と女性はリスクが高い傾向にあると考えられ、とくに早期から臨床症状の強い例は注意が必要であると思われた。重症化の早期検知には、臨床症状の注意深い観察に加え、画像診断や尿検査が有用であり、血小板数の推移は重症化予測の一助になると考えられた。治療効果や予後についても、今後更なる検討が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

本事例の調査内容の概要については厚生労働省医薬食品局食品安全部暑中毒対策室にすでに連絡済み。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

細菌学調査研究 小括

研究分担者 綿引正則（富山県衛生研究所・細菌部）、大西 真（国立感染症研究所・細菌第一部）、関塚剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター）

研究協力者 磯部順子、木全恵子、嶋 智子、金谷潤一（富山県衛生研究所・細菌部）小西良子、工藤由起子、山崎朗子（国立医薬品食品衛生研究所）石畝 史（福井県衛生環境研究センター）川上慶子（石川県保健環境センター）山田三紀子（横浜市衛生研究所）伊豫田淳、三戸部治郎、寺嶋 淳、泉谷英昌（国立感染症研究所・細菌第一部）黒田 誠、竹内史比古（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター）

A. 背景と研究目的

平成 23 年 4 月に発生した焼肉チェーン店「焼肉酒家えびす」で提供されたユッケを原因とする腸管出血性大腸菌（EHEC）O111 及び O157 が検出された集団食中毒は、患者数 181 名、うち死者 5 名を含む溶血性尿毒症症候群(HUS)患者 34 名と、過去の食中毒と比べて極めて重症化率が高い事例であった。2006 年に米国で発生したハウレン草を原因とする EHECO157 による食中毒、2008 年同じく米国のレストランを原因とする EHECO111 による食中毒、及び今回の食中毒と同時期に発生したドイツを中心とする欧州の EHEC O104 による集団食中毒事例と比較しても（表 1）、高い重症化率を示していることがわかる。さらに今回の食中毒は、これまで報告されている EHEC 食中毒あるいは感染症と比べて、細菌学的にも特徴的な食中毒であった。

その特徴は、

- ①血清群 O111（以下、O111）を原因とする食中毒事例であること、
 - ②食中毒患者 181 名、うち死亡 5 名を含む重症患者（HUS）34 名と極めて重症化率が高かったこと、
 - ③患者 181 名中、起因菌が分離できない患者が半分以上（102 名）で、そのなかに重症患者が 14 名いること、
 - ④VT2 を産生しない O111（以下、O111 VT-）が複数の患者から検出されていること、
 - ⑤患者便から検出された EHEC の毒素型は、血清群 O157（以下、O157）については VT1,2、VT1 及び VT2（以下、O157 VT1,2、O157 VT1 及び O157 VT2）で、O111 からは VT2（以下、O111 VT2）のみ検出され、多様であること、
- が挙げられる。

本研究の目的は、この特徴的食中毒事例の解明のため、起因菌の性状について一般の細菌学的、分子生物学的、あるいはゲノム・メタゲノム解析

手法を用いて明らかにすることであり、かつ高い重症化率について細菌学的要因を究明することである。

B. 研究方法

本研究班は、以下に示す研究内容で研究を分担した。詳細な研究方法是、各分担報告書に掲載されている。この小括では、患者検体番号、食中毒患者、感染症法による患者、性別、分離菌株及び症状を記載した一覧表を添付した（表 2）。分担報告書の一部に患者検体番号に基づき解析結果が記載されており、参考とされたい。

1. 富山県衛生研究所（富山衛研）

食中毒原因施設となった焼肉チェーン店を管内に持つ自治体（富山県、富山市、福井県、石川県、金沢市及び横浜市）と協力して、検体を収集した。EHEC が分離できない患者が多数報告されていたため、医療機関、厚生センターや保健所で菌が分離されなかった検体から、検出感度をあげるなどの検討を加えて菌分離を試みた。さらに、収集した患者血清中の EHEC LPS に対する抗体価を測定した。そのうえで、収集あるいは分離した株の性状解析、PFGE の実施、毒素産生性に関する試験等を実施した。

また、本研究を実施する他の研究機関の研究分担者、協力者に、収集した検体、分離菌の分譲等の手続きを行った。

2. 国立感染症研究所・細菌第一部

国内で発生する EHEC 感染症及び食中毒事例から分離される菌株を収集し、全国的な視野で、分子生物学的、生化学的な手法を用いて研究を行っており、今回の食中毒事例で分離された EHEC、特に EHEC O111 の性状解析による重症化要因の解明を担当した。

3. 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

次世代シーケンサーを用いた起因菌のゲノム解析、また患者便検体のメタゲノム解析を担当した。

4. 国立医薬品食品衛生研究所

細菌の病原因子遺伝子を対象とした集団遺伝解析法により、今回のえびす関連株の O111 と過去の O111 を比較することにより、今回の食中毒の EHEC の特徴を明らかにし、重症化要因の解明に向けた解析を担当した。

C. 研究結果と考察

1. EHEC の分離

今回の食中毒の探知は平成 23 年 4 月 26 日で最初に EHEC O111 が報告されたが、翌 27 日は別の医療機関から EHEC O157 が報告されたことにより、以後、患者から検索する EHEC は、O111 と O157 となった。そして、この時点から、砺波あるいは高岡厚生センター等の検査機関に徹底した菌の検索を依頼した。しかし、多くの患者やその家族検便、相談者の検便から、有症でありながら菌が分離できないという報告が相次いだ。そして、多数の患者が発生している中で、富山衛研が、菌の徹底検索を担当した。そこで、菌検索の感度を上げるために 3 つの工程を追加した。①検体の増菌培養、②免疫磁気ビーズを用いた特異的血清群のみの濃縮工程の追加、さらに③EHEC が一般細菌よりも酸に耐性であることを利用した酸処理による EHEC 選択法を取り入れた。この検索には、検査機関が実施した検査で生じた分離平板と便検体を用いた（綿引）。この結果、一部の検体から新たに O111 や O157 が分離できたが、O111VT-のみ検出された便検体からは、新たな EHEC はほとんど分離できなかった。この検索では、便増菌培養液の VT2 遺伝子 PCR で陽性となった検体について、この検体から分離培地に塗抹し、出現した疑いコロニーの VT2 遺伝子の有無を PCR によって検索したところ、比較的容易に O111VT2 株が分離できた検体と分離できなかった 2 検体があった。O111VT2 が分離できなかった一人の患者便検体は、最終的に 800 コロニーを検索したが分離できなかった。この 800 コロニーを検索した検体については分離平板上のコロニーのスワイプ PCR（複数のコロニーを釣菌、DNA 抽出し、鋳型として用いた PCR）では陽性であったが、単一コロニーからはまったく分離できなかった。この患者（TIH050）の血便メタゲノム解析から、検出された大腸菌由来の配列は、ほとんどが O111 由来であった（関塚）。この結果の説明は現時点では、情報が少なく困難である。今後、さら

なる解析が必要である。

2. 起因菌の特定

今回の食中毒では、当初より重症患者から O111VT2 が検出されており、起因菌であると推定された。しかし、検査機関から、多数の重症患者で菌が分離できないという報告があり、血清抗体価検査法を導入した。その結果、血清抗体価陽性を示したのは、ほとんどは O111 に対するものであった。この結果から今回の食中毒の起因菌は、O157 ではなく O111 であることが推定された（磯部）。さらに次世代シーケンサーによるメタゲノム解析が、一部の重症患者の便検体で実施された（関塚）。その結果、便 DNA 配列中から、検出された大腸菌由来配列を抽出して調べたところ、今回解析した便検体すべてから O111 由来の配列が検出された。一方で、O157 由来の配列は極めて少なかった。従って、これらの結果は、血清抗体価上昇が O111 に対するものであるという検査結果と矛盾しなかった。一方で、O111VT2 分離株を用いた毒素産生試験において、VT2 産生が確認されたことから（綿引、大西）、起因菌は VT2 を産生する O111 であると結論づけた。

3. VT 非産生性大腸菌 O111VT-の存在

EHEC 食中毒あるいは感染症事例で VT 非産生性株が検出されたという報告はそれほど多くはないが、文献調査をしたところ、2007 年に 1996～2006 年に発生した EHEC 関連の HUS 患者のデータが報告されており、このデータと比較した（表 3）。この報告では、HUS 患者 787 名中、EHEC O157, O26, O111, O103, O145 の血清群について解析したものである。その中で O111 については、VT-は検出されていないが、その他の血清群における VT-株の分離は、43 株（5.5%）であった。一方、今回の食中毒事例では、O111VT-のみ検出された患者は 24 名であり、O157 のみ検出された患者（13 名）を除いた患者 168 名をベースとすると、17.3%とかなり高率となるが、HUS 患者に限定（32 名）すれば、VT-株のみ検出された患者は 2 名（6.3%）であり、それほど相違する数字ではなかった。しかし、今回の食中毒事例では、同一患者から O111VT2 及び O111VT-株が同時に検出されており、これまで同時に検出されたという報告されていないなかで興味がある現象である。一方で、今回の食中毒事例から分離された O111VT2 と O111VT-は遺伝的に極めて近いことは、分担研究及び協力研究の報告のなかで結論付けられた（綿引、大西、関塚、小西）。それによると、O111VT-株の検出は、O111VT2 株に存在する VT2 プロファージの脱落（宿主である大腸菌から約 60K 塩基対の VT2 プロファージが抜けること：不安定 VT2

プロファージ)によるものと推定された(綿引、大西)。しかし、一方で便から分離された複数の O111VT2 株は、継代中に VT2 プロファージの脱落は観察されず(安定 VT2 プロファージ)、プロファージ誘導剤であるマイトマイシンCを用いた毒素産生性試験を行うと VT2 の産生が増大することが観察されている(綿引)。従って、今回の食中毒の主な起原因菌は O111VT2 であり、また、不安定な VT2 プロファージを持つ菌と安定な VT2 プロファージを持つ菌が存在したことが推定された(綿引、大西)。しかし、この不安定 VT2 プロファージの存在の意味については現時点では不明であり、重症化との関連も分かっていない。今後の課題である。

4. 病原性関連遺伝子のスクリーニング

今回の食中毒の重症患者が多かった理由として、分離株が強毒株か、毒素高産生株など、起原因菌の性状にその強く依存しているのではないかと考えられた。通常の EHEC 感染症では、これまでの統計では、重症患者は、低年齢児か高齢者に多かった。しかし、今回の食中毒は、20~40 代も含めた幅広い年齢層に広がっていることから、菌性状によるところが大きいと推定することができる。そこで、まず、これまで報告されている病原性大腸菌に存在する主要な病原因子遺伝子の有無を PCR で検索した。この結果、今回の O111VT2 については、VT2 以外に、EHEC の病原性に強く関連していると言われている *eaeA* や *hlyA* は陽性であった以外は、ほぼ陰性であった。また、大腸菌が産生するコリシンによるものと思われる抗菌活性も検出されている。しかしながら、このような病原因子が今回の高い重症化にどのように関わっているのか不明である(綿引、大西、小西)。

5. 患者血清抗体価測定の有用性

患者便から、菌が分離できない、あるいは分離できても VT-株しか取れないという患者は、感染症法上、患者とは診断できない。従って、感染症法の基準で患者の診断のため、患者血清中の大腸菌抗 LPS 抗体検査法を導入した。通常の EHEC 感染症や食中毒の際、そのほとんどは便中から菌が分離されるため、これまで地研で血清抗体価検査はあまり実施されることはなく、仮に実施が必要になった場合には、感染研に送付して検査していた。しかし、今回は、重症患者が同時に多数発生し、迅速な血清抗体価検査の要望が高くなり、導入となった。EHEC 食中毒や感染症が発生したとき、血清抗体価検査法の実施については、検体の入手が簡単ではないため、実施されることは少ないのが実情であり、検査法の評価も十分に行われ

ていない。しかし、今回の食中毒では多数の血清検体が集まり、EHEC 感染症にかかる血清診断による検査法を改めて評価する機会となった。今回検査により、HUS 患者だけでなく、血便患者からも高い比率で血清から O111 に対する抗体の上昇が観察された。このことから、菌が検出されない場合の迅速な検査法として、有用であることを示唆している(磯部)。

6. 次世代シーケンサーを用いたゲノム解析手法による分離菌や臨床検体の解析

次世代シーケンサーは、従来の塩基配列決定法とは原理を異にし、検体から抽出したすべての DNA 塩基配列を決定することができる。また、一回の検査で出力される塩基配列データは、細菌のゲノム配列を短期間で解析する能力を持っている。そこで今回の食中毒で分離された O111VT2 と O111VT-株の塩基配列が決定され、比較された(関塚)。その結果、VT2 プロファージの存在の有無の違いだけで、その他の配列は同一であることが強く示唆された。そして、結果は、PFGE やその他の解析結果と矛盾せず、改めて次世代シーケンサーの有用性を確認することとなった。さらに、重症患者の血便メタゲノム解析を実施した。その結果、いずれも大腸菌 O111 の配列が検出された。そして、菌が検出できない HUS 患者の便からも検出された大腸菌 DNA の半分以上は、大腸菌 O111 由来であるなど、極めて興味深い結果となった。今後、さらに詳細に検討を加え、EHEC 食中毒や感染症の病態との関係を知る手がかりになること、また今後迅速診断に向けた新たな検査法の開発へ繋がる貴重なデータとなることが期待された(関塚)。

7. 細菌学的特徴と高い重症化率との関係

これまで得られた分離株の病原遺伝子の有無、毒素産生能力は、過去の散発あるいは集団発生事例より分離された EHEC O111 と比較した結果、高いとは言えなかった。近年、ゲノム配列を利用した解析が進み、EHEC の重症化因子として可能性のある遺伝子がいくつか報告されていた。*ospG* と *norV* の存在は、前者の機能が O111 と関連性が高い因子として、後者の機能は VT2 の発現に影響を与え、重症化に関する因子として報告されていた。そこで今回、この 2 つの遺伝子が、今回の食中毒で分離された O111 と O157 に存在するかどうかを、PCR により確かめた。その結果、*ospG* については、O111 及び O157 から検出された(綿引)。*norV* についても、重症化因子の一つとして報告されているが、今回の分離株の検索では O111 株に検出されたが、O157 株では検出されなかった。また、参照株として同時に検査した O111(VT1,2) 2

株（富山県分離株と愛媛分離株）にも存在しており、O111には共通に存在している可能性もある。この遺伝子の機能と高い重症化とどのような関係にあるかは今後の課題である。

D. 結論

現時点では、分離菌の性状から、高い重症化を説明することは出来なかった。しかし、様々な因

子の相乗効果により、VT2の毒性が増加するという可能性は残っている。今回の食中毒の重症化要因として、重症となった患者の年齢層が児童から高齢者まで、各年齢層に広がっていることから、菌が持つ何らかの特徴が、今回重症化をもたらしていると考えられる。今後、さらに検討する必要がある。

表1. 最近の EHEC 集団食中毒との比較

	患者合計 (名)	重症患者(名)	
		HUS	死亡
USA Spinach O157 outbreak, 2006 ¹⁾	199	31 (15.6%)	3 (1.5%)
USA Restaurant O111 outbreak, 2008 ²⁾	341	26 (7.6%)	0 (0.0%)
EUROPE O104 outbreak, 2011 ³⁾	4,073	908 (22.3%)	50 (1.2%)
日本 (富山県、他3県) O111集団食中毒, 2011	181	34 (18.8%)	5 (2.8%)

1) www.cdc.gov/foodborne/ecoli/2006/september/updates/

2) Piercefield, W., et al. *Arch. Intern. Med.*, 170:1656 (2010)

3) www.forth.gov.jp/moreinfo/topics/2011/07221518.html

表2. 集団食中毒事例における食中毒患者、無症状病原体保有者等一覧表

TIH番号	食品衛生法 患者認定	感染症法 患者認定	性別	大腸菌血清・毒素型	症状	区分
TIH001	○	○	男	O157:H7VT1, O157:H7VT1,2, O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便、腎不全、HUS、脳症、 嘔気、嘔吐、発熱、せん妄、傾眠	喫食者
TIH002	○	○	女	O157:H7VT1, O111:H8VT2, O111:H8VT-, O111:H8VT-	下痢、腹痛、発熱、HUS、脳症、血便、嘔 気、嘔吐	喫食者
TIH003			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH004	○	○	女	O111:H8VT-	腹痛、血便、腎不全、HUS、脳症、下痢、 嘔吐、嘔気、発熱、意識混濁	喫食者
TIH005	○	○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便、腎不全、HUS、脳症、 嘔吐、発熱、けいれん	喫食者
TIH006	○	○	女	O157:H7VT1,2, O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便、嘔吐、HUS、脳症、発 熱、不穏、頭痛	喫食者
TIH009	○	○	男		下痢、腹痛、腎不全、HUS、脳症、DIC、血 便、嘔吐、発熱、ミオクローヌス、けいれん	喫食者
TIH010	○	○	男	O157:H7VT1,2, O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、HUS、血便	喫食者
TIH011	○	○	男	O157:H7VT1,2, O111:H8VT-	血便、腹痛	喫食者
TIH012		○	女	O111:H8VT-, O111:H8VT2	なし	喫食者
TIH013	○	○	女	O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便、HUS、嘔気、微熱	喫食者
TIH016			女	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH017	○	○	男		下痢、腹痛、血便、腎不全、HUS、嘔気、 嘔吐、微熱、頭痛	喫食者
TIH018			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH019	○	○	女	O157:H7VT1,2, O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便、HUS、脳症、発熱、不 穏、けいれん	喫食者
TIH020	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH021	○	○	女		下痢、腹痛、血便、嘔吐、HUS、脳症、嘔 気、微熱	喫食者
TIH022	○	○	女	O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便、微熱	喫食者
TIH023	○	○	男	O111:H8VT-, O111:H8VT2, O157:H7VT1,2	下痢、腹痛、血便、嘔吐、頭痛、微熱	喫食者
TIH024		○	男	O111:H8VT2	なし	喫食者
TIH027	○	○	女		下痢、腹痛、血便、嘔吐、HUS、脳症、嘔 気、発熱、傾眠	喫食者
TIH029	○	○	女	O157:H7VT1,2, O111:H8VT2, O111:H8VT-, O111:H8VT-	腹痛、血便、HUS、脳症、下痢、嘔吐、発 熱、けいれん	喫食者
TIH031	○	○	男	O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、血便、HUS、脳症、腹痛、嘔吐、発 熱、けいれん	喫食者
TIH033			女	O111:H8VT-	下痢	喫食者
TIH034	○	○	男	O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便、DIC、血小板減少、微 熱	喫食者
TIH036	○	○	女	O157:H7VT1, O157:H7VT1,2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便、嘔吐、HUS、嘔気、頭 痛	喫食者
TIH037	○	○	男	O111:H8VT-, O157:H7VT1, O157:H7VT1,2	下痢、倦怠感	喫食者
TIH038	○		男		下痢	喫食者
TIH039	○	○	女	O157:H7VT1,2, O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便、DIC、血小板減少、嘔 気、微熱	喫食者
TIH040	○	○	女	O111:H8VT-, O111:H8VT2	下痢、腹痛、HUS、血便	喫食者
TIH044	○	○	男	O157:H7VT1,2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便	喫食者
TIH046	○	○	女	O157:H7VT1,2, O111:H8VT2	下痢、腹痛	喫食者
TIH047	○	○	男	O111:H8VT-, O111:H8VT2	下痢、腹痛	喫食者

TIH048	○	○	男	O157:H7VT1,2	下痢、腹痛	喫食者
TIH050	○		男	O111:H8VT-	下痢、血便、腹痛	喫食者
TIH051	○	○	男	O157:H7VT2, O157:H7VT1,2, O111:H8VT2	腹痛、発熱、下痢、血便	喫食者
TIH052		○	男	O157:H7VT1,2	なし	喫食者
TIH054		○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH055		○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH057	○	○	男	O157:H7VT1,2, O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便、発熱、HUS	喫食者
TIH058	○	○	男	O111:H8VT2	下痢、腎不全、HUS、脳症、DIC、血便、腹痛、異常行動、傾眠	喫食者
TIH059	○	○	女	O157:H7VT1,2	下痢、腹痛	喫食者
TIH060	○	○	男	O157:H7VT1	下痢、腹痛	喫食者
TIH061	○	○	男	O157:H7VT1	下痢、腹痛	喫食者
TIH063	○	○	男	O157:H7VT1	なし	喫食者
TIH065	○	○	男	O111:H8VT2	下痢、腹痛	喫食者
TIH068	○		女	O111:H8VT-	下痢	喫食者
TIH069	○	○	男	O111:H8VT-, O111:H8VT2	下痢、腹痛	喫食者
TIH070	○	○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH071	○	○	女	O111:H8VT-, O111:H8VT2	下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH072			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH073	○	○	女	O157:H7VT1,2	下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH075			女	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH076	○	○	男	O111:H8VT-, O111:H8VT2	下痢、腹痛	喫食者
TIH078	○	○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH081	○	○	女	O157:H7VT1,2, O157:H7VT2	嘔吐、発熱	喫食者
TIH082	○	○	男	O157:H7VT1,2, O157:H7VT2	下痢、嘔吐、発熱	喫食者
TIH084	○	○	男	O111:H8VT2, O111:H8VT-	腹痛、血便、HUS、脳症、下痢、嘔気、嘔吐、発熱、けいれん	喫食者
TIH085	○	○	男	O111:H8VT2	腹痛(軽度)	喫食者
TIH086	○	○	女	O111:H8VT-, O111:H8VT-, O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便、HUS、脳症、嘔吐、発熱、せん妄、	喫食者
TIH088	○	○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、嘔吐、HUS、脳症、嘔気、発熱、傾眠、幻覚幻視	喫食者
TIH089		○	男	O157:H7VT1,2, O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH090		○	女	O157:H7VT1,2, O111:H8VT-, O111:H8VT2	なし	喫食者
TIH091		○	女	O111:H8VT-, O157:H7VT1	なし	喫食者
TIH092	○	○	女		下痢、腹痛、嘔吐、HUS、脳症、血便、嘔気、微熱、せん妄、意識障害	喫食者
TIH093	○	○	男	O111:H8VT-, O157:H7VT1,2	腹痛、下痢	喫食者
TIH094	○	○	女	O111:H8VT-, O111:H8VT-	下痢、血便、HUS、腹痛、嘔吐、発熱	喫食者
TIH095	○	○	男	O157:H7VT1	下痢、腹痛	喫食者

TIH096		○	女	O157:H7VT1	なし	喫食者
TIH097	○	○	女	O157:H7VT1, O157:H7VT1,2, O111:H8VT2,	下痢、腹部満腹感、HUS、脳症、血便、腹痛、嘔気、嘔吐、発熱、せん妄、傾眠	喫食者
TIH098	○		男		下痢(軽度)、腹痛	喫食者
TIH099	○	○	男	O111:H8VT-, O111:H8VT2	腹痛、下痢、発熱	喫食者
TIH101		○	女	O157:H7VT1	なし	喫食者
TIH102		○	男	O111:H8VT-, O111:H8VT2	なし	喫食者
TIH104	○	○	女	O157:H7VT1,2, O157:H7VT1	腹痛、下痢	喫食者
TIH105	○		女	O111:H8VT-	下痢	喫食者
TIH107			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH109	○	○	女	O157:H7VT1,2	腹痛、下痢	喫食者
TIH110	○	○	男	O157:H7VT2, O157:H7VT1,2	下痢	喫食者
TIH111			女	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH113		○	女	O157:H7VT1,2	なし	喫食者
TIH115	○	○	女	O111:H8VT2	下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH116	○	○	男		腹痛、血便、HUS、DIC、下痢、発熱	喫食者
TIH117			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH120	○	○	女		下痢、腹痛、血便、HUS、脳症、嘔気、嘔吐、発熱、せん妄、興奮、めまい、けいれ	喫食者
TIH121	○	○	女	O157:H7VT1,2	腹痛、微熱	喫食者
TIH122	○	○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT-	腹痛	喫食者
TIH123	○		女	O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH124	○	○	男		下痢、腹痛、血便、発熱、HUS、嘔気、嘔吐	喫食者
TIH126	○	○	女		下痢、腹痛、発熱、HUS、嘔気、嘔吐、頭痛	喫食者
TIH128	○		女		下痢、腹痛、血便、嘔気、嘔吐、発熱	喫食者
TIH129	○	○	女	O111:H8VT2, O111:H8VT2	下痢、嘔気、発熱、血便、腹痛	喫食者
TIH132	○	○	女		下痢、腹痛、発熱、血便、HUS、嘔気、嘔吐	喫食者
TIH133	○		女		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH135	○		女	O111:H8VT-	下痢	喫食者
TIH136	○		女		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH140	○	○	女	O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便、嘔吐、頭痛	喫食者
TIH141	○	○	男		下痢、発熱、血便、HUS、腹痛	喫食者
TIH143	○		男		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH145	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH146	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH148	○	○	女		下痢、腹痛、血便、HUS(5/1)、脳症(5/9)、発熱、不穏、せん妄、傾眠	喫食者
TIH149	○	○	女	O111:H8VT2	下痢、腹痛	喫食者

TIH156	○		男		下痢、腹痛、血便、発熱	喫食者
TIH160	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH161	○		女	O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH166	○		女	O111:H8VT-	下痢、腹痛、頭痛	喫食者
TIH167	○		男	O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH170	○		女		下痢、腹痛、発熱、嘔吐	喫食者
TIH176	○		女	O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH177	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH178	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH181			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH192	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH196	○		男		下痢、腹痛、発熱、頭痛	喫食者
TIH205	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH210			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH212	○		女		下痢	喫食者
TIH214	○		男	O111:H8VT-, O111:H8VT-	下痢	喫食者
TIH215			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH216	○		男	O111:H8VT-	腹痛	喫食者
TIH222	○		男		下痢、腹痛、血便	喫食者
TIH223	○		男		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH228	○		男	O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便	喫食者
TIH245	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH248	○		男	O111:H8VT-	下痢、血便	喫食者
TIH249	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH250	○		男		下痢、嘔吐	喫食者
TIH255	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH256	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH257	○		男		下痢、腹痛、嘔吐	喫食者
TIH261	○		女		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH266	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH269	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH270	○		女		頭痛、腹痛、嘔気、下痢	喫食者
TIH275	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH285			女	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH292	○		男		下痢、腹痛	喫食者

TIH309	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH321	○		男		下痢、腹痛、嘔気	喫食者
TIH322	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH323	○		女		下痢、腹痛、嘔気	喫食者
TIH324	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH325	○		男	O111:H8VT-, OUT:VT-	下痢	喫食者
TIH326	○		女		下痢、腹痛、血便	喫食者
TIH327	○		男	O111:H8VT-	下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH328	○		男	O111:H8VT-	発熱	喫食者
TIH329	○		女		下痢、腹痛、嘔吐、血便、発熱	喫食者
TIH330	○		男		下痢、腹痛、血便	喫食者
TIH335	○		男		腹痛、下痢	喫食者
TIH336	○		女		腹痛、発熱、頭痛	喫食者
TIH338	○		男		腹痛、発熱、下痢	喫食者
TIH341	○		女		下痢、腹痛、発熱、嘔気、頭痛	喫食者
TIH343	○		男		嘔吐、下痢	喫食者
TIH345	○		男		腹痛、下痢、嘔気	喫食者
TIH349	○		女		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH353	○		男		嘔気、下痢	喫食者
TIH355	○		男		腹痛、下痢、嘔吐	喫食者
TIH362	○		女		腹痛、嘔吐	喫食者
TIH363	○		男		下痢、腹痛、発熱、嘔吐	喫食者
TIH365	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH368	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH369	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH370	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH371	○		男		下痢、嘔吐、発熱	喫食者
TIH372	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH373	○		女		下痢、嘔気	喫食者
TIH374	○		女		下痢、嘔吐、発熱	喫食者
TIH375	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH376	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH379	○		女		腹痛、下痢	喫食者
TIH380	○		男		嘔吐、腹痛	喫食者
TIH381	○		女		下痢、腹痛	喫食者

TIH386	○		女		嘔吐、下痢、発熱	喫食者
TIH387	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH388	○		女		嘔吐、下痢	喫食者
TIH389	○		男		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH390	○		男		腹痛、下痢	喫食者
TIH391	○		男		下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH392			男	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH393	○		男	O111:H8VT-	下痢、腹痛、発熱	喫食者
TIH394	○		男	O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH395	○		男	O111:H8VT2, O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便、HUS、脳症、嘔気、発熱、けいれん	喫食者
TIH396	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH397	○		女		血便、HUS、脳症、意識障害、下痢、腹痛、嘔気、嘔吐、発熱、幻視	喫食者
TIH399	○		女		下痢、嘔吐、発熱、腹痛	喫食者
TIH400	○		女		腹痛	喫食者
TIH401	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH402	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH404	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH405	○		男	O111:H8VT-	下痢、嘔吐、嘔気、微熱	喫食者
TIH406	○		男		下痢、腹痛、嘔吐、嘔気、発熱	喫食者
TIH407	○		女		下痢、腹痛	喫食者
TIH408	○		女		水様性下痢、腹痛	喫食者
TIH409	○		男		下痢	喫食者
TIH410	○		男		水様性下痢、嘔気、腹痛	喫食者
TIH411	○		女		水様性下痢、嘔吐、嘔気、腹痛	喫食者
TIH412	○		男		下痢	喫食者
TIH413	○		男		水様性下痢、発熱、嘔気、悪寒、腹痛	喫食者
TIH414	○		女		発熱、嘔気、悪寒、下痢、腹痛	喫食者
TIH415	○		女		水様性下痢、腹痛、嘔気	喫食者
TIH416	○		女		水様性下痢	喫食者
TIH417	○		男		水様性下痢、発熱、腹痛	喫食者
TIH418	○		女		水様性下痢、嘔吐	喫食者
TIH419	○		男		下痢、腹痛	喫食者
TIH420	○		男		不明	喫食者
TIH421	○		男		下痢	喫食者
TIH422	○		男		水様性下痢、腹痛	喫食者

TIH424		○	女	O111:H8VT2	下痢	接触者
TIH425		○	女	O111:H8VT2	下痢、腹痛、血便	接触者
TIH426			女	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH427			女	O111:H8VT-	なし	喫食者
TIH428			男	O111:H8VT-	不明	喫食者
TIH429	○		男	O111:H8VT-	腹痛、下痢(血が付着すること有)、発熱	喫食者
TIH430			不明	O111:H8VT-	不明	喫食者
TIH431	○		男	O111:H8VT-	下痢、嘔気、腹痛	喫食者
TIH433			男	O157:H7VT1,2	なし	喫食者
TIH444	○		男	O111:H8VT-	下痢、血便、腹痛、微熱	喫食者
TIH445	○		女	O111:H8VT-	下痢、腹痛、血便、頭痛、HUS、嘔気、嘔吐、発熱	喫食者
TIH446			男	O111:H8VT-	なし	接触者
TIH447			女	O111:H8VT-	なし	接触者
TIH448			女	O111:H8VT-	下痢、腹痛	喫食者
TIH449			女	O111:H8VT-	下痢	喫食者
TIH450			男	O111:H8VT-	下痢、発熱	喫食者
TIH451			-	O111:H8VT-	-	食肉

表3. ペロ毒素非産生性大腸菌が分離された HUS 患者の報告例との比較

	分離菌なし 患者数 (%)	VT- 患者数 (%)	VT-/VT+ 患者数 (%)	VT+ 患者数 (%)	Total 患者数 (%)
I					
① O26:H11/NM		13		58	
② O103:H2/NM		4		15	
③ O111:H8/H10/NM		0		11	
④ O145:H28/NM		5		31	
⑤ O157:H7/NM (NSF*)		2		221	
⑥ O157:NM(SF*)		15		76	
⑦ Others		4		28	
⑧ Total	304 (38.6)	43 (5.5)	0 (0)	440 (55.9)	787 (100)
II					
⑨ O111:H8 (Total)	102 (60.7)	24 (17.3)	23 (13.7)	14 (8.3)	168 (100)
⑩ O111:H8 (重症)	14 (43.7)	2 (6.3)	13 (40.6)	3 (9.4)	32 (100)

I . Bielaszewska, M., et al. PLoS ONE, 2(10): e1024 (2007)より一部データを抜粋。株数は1996～2006のHUS患者からの分離データである。

*NSF, non-sorbitol-fermenting; SF, sorbitol-fermenting.

II . えびす食中毒関連の食中毒患者から分離された血清群O111の大腸菌を対象としたデータ

検体からの細菌分離と細菌学的性状解析

研究分担者 綿引正則（富山県衛生研究所・細菌部）

研究協力者 磯部順子、木全恵子、嶋 智子、金谷潤一（富山県衛生研究所）
石畝 史（福井県衛生環境研究センター）、川上慶子（石川県保健環境センター）、
山田三紀子（横浜市衛生研究所）

研究要旨 患者 181 名、死者 5 名を含む重症患者 34 名を数えた集団食中毒事例において分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）及びその関連株を収集し、細菌学的な特徴を調査した。分離された EHEC 及びその関連株を含めた本食中毒の特徴は、①EHEC O111 が起因菌であったこと、②高い重症化率、③EHEC の分離が困難な多数の患者がいたこと、④毒素を産生しない血清群 O111 株が重症患者を含む多数の患者から検出されたこと、⑤分離株の多様性（血清群 O111 と血清群 O157 に多様な毒素型）、であった。特徴①～④の現象については、明らかになった分離株の性状から、重症患者を含む有症者から血清群 O111 の検出が多いことや HUS 患者の血清抗体価上昇は血清群 O111 に対してであったこと、VT2 プロファージを持つ血清群 O111 が毒素産生を伴う強い溶菌現象によって菌が死滅していること、さらに VT2 プロファージには不安定なファージと安定なファージが存在していることから、O111VT2 プロファージの脱落により O111 が生じると推定された。また、未開封のクック用肉から分離された O111 と患者から分離された O111 株の PFGE 型は同一であり、また、O111 株と VT2 プロファージ配列部分を除いて、同一株であった。以上のような分離菌の特徴と多様性が、今回の食中毒事例の高い重症化率とどのように関連するのか未だ不明である。今後、さらに研究を継続することが必要である。今回の食中毒の細菌学的な特徴は、今後の EHEC 感染症や食中毒の検査や予防について、有用な情報になると考えられる。

A. 研究目的

平成 23 年 4 月に焼肉チェーン店「焼肉酒家えびす」で腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団食中毒（以下、えびす食中毒）が発生した。このチェーン店は本店を石川県に置き、富山県、福井県および神奈川県に 20 店舗を展開し、そのうち 6 店舗が原因施設となり、181 名の食中毒患者が報告され、うち 34 名が溶血性尿毒症症候群(HUS)を発症し、5 名が脳症で死亡した。この HUS 及び死亡者については、はこれまで報告されている EHEC 食中毒集団事例のなかでも極めて高い事例の一つとなった。

調査のなかで明らかとなった今回の食中毒の特徴としては、

- ①血清群 O111（以下、O111）を原因とする食中毒事例であること、
- ②食中毒患者 181 名、うち死亡 5 名を含む重症患者（HUS）34 名と極めて重症化率が高かったこと、
- ③患者 181 名中、起因菌が分離できない患者が半分以上（102 名）で、そのなかに重症患者が 14 名いること、
- ④VT2 を産生しない O111（以下、O111 VT-）が

複数の患者から検出されていること、

- ⑤患者便検体から検出された EHEC の毒素型は、血清群 O157 については VT1,2、VT1 及び VT2（以下、O157 VT1,2、O157 VT1 及び O157 VT2）が、O111 からは VT2（以下、O111 VT2）が検出され、多様であること、
が挙げられる。

本研究は、以上のようなきわめて特徴的な食中毒事例のなかで、起因菌として分離された O111 及び O157 について、病原性因子の有無、薬剤感受性、毒素産生性等、基本的な細菌学的特徴を明らかにし、さらに分離菌の遺伝的関係や毒素産生性に関する特徴を解明することにより、今回の食中毒の原因究明のための基礎データを収集することを目的とした。

B. 研究方法

1. 検体

本報告書の患者とは、平成 23 年 4 月に焼肉チェーン店を利用し喫食時間から 10 時間以上経過して発症し、次のいずれかに該当する者とした。

- a) 血便を呈している者
- b) 消化器症状（下痢、吐き気又は嘔吐、腹痛、

渋り腹)が2つ以上あった者

c) 消化器症状が1つとそれ以外の症状(発熱37.5℃以上、倦怠感、頭痛など)が1つ以上ある者

d) 便から大腸菌 O111 あるいは EHEC O111、O157 を検出し、1つ以上の症状を呈する者。

検体とは、この患者から由来する臨床検体、あるいはこの患者の接触者調査等によって収集された検体や食品残品等を含み、また、検査途中に生じる便培養の結果生じた細菌集落が形成されている寒天培地や純化された分離菌も含むものとする。本研究では以下の検体を用いた。

1-1. 分離菌

食中毒発生に伴い当研究所に搬入された分離菌は、高岡厚生センター、砺波厚生センター、中部厚生センター、富山市保健所、及び食中毒の発生した原因店舗を管轄する福井県、石川県、金沢市及び横浜市で患者診断あるいは原因究明のために分離されたもので、O111VT2、O111VT、O157VT1,2、O157VT1及びO157VT2である。

1-2. 分離寒天培地

砺波厚生センター、高岡厚生センター及び各厚生センター管内の医療機関から菌培養検査中に生じた分離寒天培地を収集した。

1-3. 臨床検体

患者便は、患者の受診した医療機関及び管轄する厚生センターで検査に供された618検体を収集した。また、便検体の一部は、本研究班の分担研究機関である国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで、メタゲノム解析の試料とした。

1-4. 食肉検体

砺波厚生センター、高岡厚生センター及び金沢市保健所が食中毒発生施設から収去したものである。ユッケ、ももブロック等、合計19検体を収集された。いずれも、検査機関で検査済みである。

1-5. 環境検体

砺波厚生センターから拭き取り14検体が搬入された。いずれも、検査機関で、陰性と判定されているものである。

2. EHEC の検索

EHEC の検索は、便検体からの場合は、富山県感染症検査マニュアル(検査編)、または食品(食肉)材料を利用する場合には、通知法(食安監発第1102004号)に準拠して実施した。

2-1. 供試検体

分離元平板あるいは便検体からのEHECの検索は、厚生センター、保健所あるいは医療機関で、①EHECが分離できなかった検体、②O111あるいはO157のいずれか一方のみしか検出されなかった検体、③O111VTのみ検出された検体を中心に、

それぞれ、①EHECの検索、②異なる血清型EHECの検索、を目的に実施した。方法は、mEC培地あるいはノボビオシン加mEC(NmEC)培地にて一晚培養後、分離平板培地(CT-SMAC、CT-ソルボースMAC、クロモアガー-TAM、CT-クロモアガー-TAM、クロモアガー-O157やクロモアガー-STEC等)に塗抹した。また、O157あるいはO111の選択的濃縮のため、磁気ビーズ処理を行い、回収した菌液を直接、あるいは等量の1.25N塩酸を加え、30秒処理した後(酸処理)を分離平板培地に塗抹し、35℃一晚培養した。疑いコロニーについて、分離菌の血清型別及び遺伝子増幅法によるベロ毒素遺伝子の有無を検査し、EHECと推定した(図1)。以下、検体別の工程を示した。

2-1. 食品

検体25gにmEC培地あるいはNmEC培地100mL加え、手揉みにて均一化し、35℃あるいは42℃にて一晚培養した。

2-2. 便検体

10mLのmEC培地及びNmEC培地に白金耳1エーゼの糞便検体あるいは水様性下痢便については100μLを添加し、35℃あるいは42℃にて一晚培養した。

2-3. 分離平板

元平板培地上の菌集落を掻きとった白金耳1エーゼを10mLのmEC培地に懸濁し、35℃あるいは42℃にて一晚培養した。

3. 分離菌の解析

3-1. 供試菌

使用した分離菌は、便検体からの分離状況や臨床症状を勘案して選別、解析代表株として、以下に示した検体(便検体)番号を用いた。尚、TIH451は食肉検体である。

a) O111VT-: TIH No.

001, 004, 047, 050, 084, 086, 091, 097, 102, 107, 122, 451

b) O111VT2: TIH No.

001, 005, 029, 047, 051, 084, 086, 097, 102, 122, 395

c) O157VT1,2: TIH No.

036, 091, 095, 096, 097

d) O157VT1: TIH No.

029, 036, 046, 052, 081, 097

e) O157VT2: TIH No.

051, 081

また、解析データの評価のため、EHEC O111の参照株として、EC2429(O111:H28VT1,2、平成17年富山県散発事例臨床分離株)及びEC3298(O111:NMVT1,2、昭和61年集団感染事例臨床分離株、愛媛県衛生環境研究所より譲受)を用いた。また、EHEC O157の参照株として、O157VT1,2(sakai株、以下、Sakai株)および富山県で発生

した集団感染事例から分離された EC2610 (O157 VT1,2、平成 16 年)を用いた。

3-2. 病原遺伝子の検出

検体の一晚増菌液や分離株の毒素遺伝子や病原遺伝子の存在を確認するために、遺伝子増幅法である PCR、RealTimePCR あるいは LAMP 法を実施した。PCR は、目的遺伝子の特異的に検出するプライマー(後述)を用いて、主に GoTaq Master Mix (プロメガ)を用いた。

鋳型 DNA の精製 一晚増菌液 1mL を遠心し、上澄みを捨て、沈殿を 100 μ L 5%(W/V)キレックス 100 に再懸濁し、100 $^{\circ}$ C 10 分間処理を行い、再度遠心した後、その上清を PCR の鋳型とした。分離株を検体とする場合には、新鮮な菌体コロニーを 100 μ L 5%(W/V)キレックス 100 に懸濁し、100 $^{\circ}$ C 10 分間処理を行い、再度遠心した後、その上清を PCR の鋳型とした。LAMP 法を実施する場合には、一部、LAMP キットの方法を準拠し、アルカリ抽出法で精製したものを LAMP 法の鋳型とした。

ベロ毒素遺伝子の検出 PCR に用いたプライマーは、VT1 遺伝子及び VT2 遺伝子を同時に検出する EVC-1/EVC-2、VT1 遺伝子を検出する EVT-1/EVT-2、VT2 遺伝子を検出する EVS-1/EVS-2 (タカラバイオ)を用いた。また、RealTimePCR は、Cycleave O157 VT1/VT2 Typing Kit (タカラバイオ) 及び LAMP 法には、Loopamp Verotoxin Typing Kit (栄研化学)を用いた。

病原遺伝子の検出 Kimata らの方法 (*Microbiol. Immunol.*, 49:485-492, 2005)に基づく Multiplex PCR により実施した。対象病原遺伝子は、CVD432、接着性病原因子遺伝子 *eaeA*, *aggR*、ベロ毒素遺伝子である VT1 遺伝子 (*stx*₁) 及び VT2 遺伝子 (*stx*₂)、*invE*, *elt* (LT 遺伝子)、*esth* (STh 遺伝子)、*estp* (STp 遺伝子)、*bfp*, EAF, *astA* である。

重症化関連遺伝子の検出
norV 遺伝子の検出は、既にゲノム塩基配列が報告されている *E.coli* O111 の配列 (AP010960) の *norV* 遺伝子配列から *norV*-337f (5'-CAT ACC TCA CCG AGT G-3') 及び *norV*-914r (5'-GAG CGG AAG ACA TTG GTC AGG-3') を設計し、使用した。*ospG* 遺伝子の検出は、Nobe, R., et al. らによって報告 (*Microbiol.*, 155:3214, 2009) されている *ospG*-F (5'-CCA TTT GAG AAT AAT AAT TCT CAT GCT G-3') 及び *ospG*-R (5'-GCA TTT GTA ATC GTC GGT CGA TAA TC-3') を用いた。

3-3. ベン毛抗原型の決定 (PCR/RFLP typing)

EHEC O111 の H8 の決定は、Beutin, L. らの方法 (*J. Clin. Microbiol.*, 45:333-339, 2007) に準拠し、*fliC* を PCR で増幅し、制限酵素切断断片の多型解析 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) を

行った。供試株は、本食中毒事例の分離株である O111VT- (TIH086、TIH097、TIH451 からの分離株) および O111VT2 (TIH084、TIH395 からの分離株) を用い、参考株として EC2429 及び EC3298 を用いた。また、PCR のためのプライマーは *fliC*-H8/40-F (5'-CAT TAA TAC AAA CAG CCT GTC G-3') と *fliC*-H8/40-B (5'-TTC GCT AGT TCT GTT GCA TC-3') を使用し、PCR 後の増幅産物は制限酵素 *HhaI* で消化し、2%アガロースゲル電気泳動で検出した。

3-4. 薬剤感受性試験

分離株の薬剤感受性試験に使用した薬剤は、テトラサイクリン (TE)、カナマイシン (K)、シプロフロキサシン (CF)、ゲンタマイシン (GM)、クロラムフェニコール (C)、アンピシリン (AM)、ミノサイクリン (MI)、セファゾリン (CZ)、ホスホマイシン (FF)、ストレプトマイシン (S)、コリスチン (CL)、ナリジクス酸 (NA) の 12 薬剤で、CLSI のプロトコールに準拠し、Kirby-Bauer 法に基づいたディスク法 (センシ・ディスク、日本ベクトン・ディッキンソン) で実施した。

3-5. 毒素産生試験

大腸菌のベロ毒素の検出は、VTEC-RPLA 「生研」(デンカ生研)を用い、添付文書の方法に従い、実施した。即ち、CAYE (デンカ生研)を用いて一晚培養した遠心上清及び新鮮コロニーをポリミキシン B 溶液 (デンカ生研) に懸濁後、35 $^{\circ}$ C で 30 分静置後の遠心上清を検査検体とした。

また、供試菌にマイトマイシン C (MMC; 和光純薬) を添加して実施する場合には、MMC を適宜添加し、標準ブイオン 2mL でマクファーランド (McF.No.) 0.5 の菌液を調製し、透明なプラスチック試験管を密閉して、巡回しながら 37 $^{\circ}$ C で培養した。必要であればデンシマット (ビオメリュー) を用いて McF.No. を継時的に測定、記録した。一晚培養後、その遠心上清の毒素を測定した。

3-6. コリシン活性の検出 (パッチテスト)

大腸菌の産生する抗菌物質 (バクテリオシン) であるコリシンの産生性を検査した。コリシン感受性大腸菌である *E.coli* C600 (非病原性) を指示菌として使用した。トリプチケースソイ寒天培地上に、*E.coli* C600 の新鮮培養液を添加し、0.7%寒天を含んだ標準ブイオンを重層した。供試菌の新鮮コロニーから白金線を用いて、固化した重層寒天の表面に軽く穿刺し、35 $^{\circ}$ C で一晚培養後、*E.coli* C600 の生育を阻害する阻止帯が観察される供試菌をコリシン活性陽性とした。

3-7. DNA タイピング

PFGE パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis; PFGE)は、国立感染症研究所パルスネット標準化プロトコールに準拠して実施した。寒天培地上に生育した供試菌の新鮮集落から McF.No. 1.6~1.7 の菌液を調製して、プラグを作製した。プラグ中で溶菌させ、制限酵素 *Xba*I 処理を行い、1%アガロースゲル(0.5×TBE 緩衝液)にて 6V/cm, 2.2sec-54.2sec, 12°C, 19 時間の泳動後、臭化エチジウムで染色後、写真撮影を行い、泳動像を記録した。

IS-Printing EHEC O157 のサブタイピング法の一つである IS-printing System (Toyobo) を用いて、添付の取扱説明書に準じた方法で実施した。本キットでは、2種類のプライマーセット(1st set/2nd set) を用い、検出される増幅バンドの有無により比較する株の型をコード化して示した。コード化は、陽性コントロールに含まれる 36 種の PCR 産物と比較して、増幅ありを「1」、なしを「0」として 36 桁の数値を作成し、この数値を 3 文字、6 グループに分け、各グループの数値毎に第 1 列に「1」、第 2 列に「2」、第 3 列に「4」の数値を乗し、グループ毎に加算した。1st set PCR、2nd set PCR をあわせ、12 桁のコードとして表記した。また、本キットを用いることにより、病原性関連遺伝子 *stx*₁(VT1 遺伝子)、*stx*₂(VT2 遺伝子)、*eae*、*hlyA* を同時に検出することができる。

3-8. 塩基配列決定

塩基配列の決定は、PCR ダイレクトシーケンシング法を基本として、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Version 3.1 (アプライドバイオシステム)、及び DNA シーケンサーは ABI3130xl Genetic Analyzer を用いた。得られた塩基配列は、Sequencher V4.7 及び Blastn アルゴリズムにより、相同性解析を行い、細菌の同定あるいは PCR 産物の確認を行った。

4. 便中毒素の検出

便検体中のベロ毒素の測定は、VT1 及び VT2 を区別せず検出することが可能な DRG® *E.coli* Verotoxin 1+2 Ag ELISA (DRG International, Inc./コスモバイオ) を用いた。操作は、本キットに添付のプロトコールに準拠し、便検体 200mg あるいは 200µL を直接測定に用い、また 200mg あるいは 200µL はキットに添付されている増菌用培地 4mL 及び MMC (終濃度 50ng/mL) を添加した増菌用培地 4mL で一晚培養し、その培養上清を検査検体とした。カットオフ値の取扱いは、吸光度 0.2 以下は陰性、1.0 以上を陽性と判断した。

供試した便検体は、TIH036、TIH004、TIH017、TIH039、TIH050、TIH092、TIH010 及び TIH034 から由来する 8 検体である。これらの便検体は、

重症度、血便の有無、分離菌の状況を勘案して選定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、平成 23 年 7 月 4 日、富山県衛生研究所の倫理審査委員会に於いて審査され、同 8 月 9 日に承認された。

C. 研究結果

1. 検体からの EHEC の再検索

富山衛研で実施した再検索の結果については、表 1 にまとめた。元平板からの再分離の結果は、いずれも EHEC は検出されていない 5 検体のうち、EHEC が検出されたのは、TIH058 の検体だけであった。その他は TIH004 から、O111 VT が検出されたが、残りの 3 検体からは検出できなかった。また、37 検体の便の再検査の結果(図 1、検査手順②)、25 検体からは、目的の EHEC は検出できなかった。しかし、7 検体から EHEC (O111 あるいは O157) が検出され、そのうち 2 検体からは O111VT-株も同時に検出された。また、5 検体からは、O111VT-のみが検出された。以上の結果、検査機関では感染症法に基づく患者認定基準を満たさなかった食中毒患者のうち、TIH058、086、099、122 の 4 名が、感染症法による患者と診断された。

原因施設から収去された食品検体(ユッケ、ももブロック等) 19 検体については、高岡厚生センターから搬入された肉以外は、すべて EHEC 陰性であった。高岡厚生センターから搬入されたユッケ用ももブロックは、高岡厚生センターの増菌液の PCR で、VT2 遺伝子が陽性であったため、肉と増菌液が搬入された。当所における肉の再検査からは、VT2 遺伝子は検出されなかったが、搬入された増菌液の PCR の再検査の結果、陽性が確認され、菌の分離を試みた。PCR を指標にした菌検索で、VT2 陽性の *E.coli* が分離され、血清群は O111、O157 ではなく O8 であった。

砺波厚生センターから、原因店舗内のふき取り 12 検体が搬入された。この検体は、すでに陰性と判定されていたが、増菌及び濃縮工程を加えて再検査を実施した(図 1、検査手順②)。しかし、すべて陰性であった。

2. 患者と分離菌の集計

行政検査として富山県内の厚生センター及び衛生研究所で分離された O111 及び O157 だけでなく、O111 VT-株もできるだけ検索の対象として収集した。さらに、食中毒患者が報告された原因施設の店舗を有する他県からの情報も収集した。その結果分離株パターン別の患者数の概要を図 2 に示した。

今回の食中毒事例から検出された EHEC は O111 だけではなく O157 も検出され、重複感染でも多数報告されたが、EHEC が全く検出されない患者が 102 名と最も多かった。また、検出された EHEC の毒素型は、O111 については VT2、O157 については VT1、VT2 及び VT1,2 の 3 つの毒素型が検出された。また、ベロ毒素を産生しない O111 VT-株も患者 52 名から検出された。

3. 分離菌の特徴

3-1. EHEC O111 株の運動性と H 抗原型の決定

本食中毒事例の EHEC O111 株は、37°C で培養した場合には、運動性が弱く、30°C で培養した場合、運動性が強い傾向にあることが判明した。また、この H 型については、国立感染症研究所の検査では H8 との報告もあったため、PCR-RFLP を実施し確認したところ、H8a であった (図 3)。図 3 の(B)Lane 1~4 は臨床分離株であり、Lane 1,2,5 は VT-、Lane 3,4 は VT2 株であり、Lane 5 は肉から分離された O111 VT-株である。Lane 6,7 は参照株の VT1,2 株であり、いずれの RFLP 型も、(A) の Lane 1 と同一であり、H8a 型 (以下、ここでは、H8 と表記する) であると判定した。

3-2. 病原因子、重症化関連遺伝子の検出

病原性大腸菌の病原性因子、重症化関連遺伝子を PCR により検索した (表 2)。O111 については、VT2 遺伝子を保有する株と保有しない株が存在し、O157 については、VT1、VT2 および VT1,2 の毒素型の 3 種類が当初から検出されており、いずれも *aeuA* 陽性であった。しかし、その他の病原性大腸菌が持っていると思われる遺伝子を Multiplex PCR で調べたところ、CVD432、*aggR*、*invE*、*elt*、*esth*、*estp*、*bfp*、EAF、*astA* は検出されなかったが、*hlyA* は、解析した O111、O157 のすべての大腸菌株陽性であった。

norV については、O157 株では検出されなかったが、O111 株は検出された。また、参照株である EC2429 及び EC3298 でも検出された。

ospG については、O111 及び O157 すべての株で検出された。

3-3. 分離株の薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果は表 3 に示した。今回の食中毒事例の O111 株はいずれも、テトラサイクリン、アンピシリン、ストレプトマイシンに耐性を示し、O157 株は、アンピシリンに対して中等度耐性であり、O111 株と異なっていた。しかしその他の薬剤については、いずれの血清群においても感性あるいは中等度耐性であり、今回の分離株は薬剤に対して高度耐性ではなかった。

3-4. 分離株の毒素産生試験とコリシン活性

分離株の代表株について毒素産生性試験の結果を表 5 にまとめた。O111 株の毒素産生性については、O111 VT-では、いずれの毒素産生性試験においても毒素は検出されなかった。しかし、TIH086 から分離された株では若干の VT2 産生が観察された。また、O111 VT2 では、VT1 は全く検出されなかったが、VT2 の産生については、ほとんど検出されないものから、64 倍でも毒素が検出されるものなど、株によると思われるバラつきが見られた。この傾向は、参照株として使用した O111 株である EC2429 と EC3298 でも見られたものの、いずれも、本食中毒事例と比較して、その毒素の産生量は多かった。O111 株の VT2 の産生量は、MMC による誘導試験により、きわめて顕著に増大した。TIH395 で約 16,000 倍であったが、EC3298 はそれよりも毒素の産生量は多く、今回の食中毒事例で分離された O111 株の VT2 の産生量はその約 1/2 であった。

O157 株は、保有毒素型が VT1 及び VT2 型が検出されていた。VT1 の産生に関しては、CAYE 及びポリミキシン B を用いた産生試験では、株間のバラつきが観察された。また、MMC 誘導実験において、それほど毒素産生性は誘導されなかった。しかし、VT2 の産生量は、O111 株で見られた毒素産生量には及ばないものの、顕著に増大した。

また、今回供試した菌の一部について、コリシン産生性については、O111VT-、O111VT2 と参考株として使用している O111VT1,2 である EC3298 にコリシン活性が観察された (図 4)。

3-5. 分離株の MMC 添加による毒素産生試験

MMC の培養中の濃度は、予備実験において、添加する MMC の濃度に依存して、毒素産生量が増加することが観察された。そこで、毒素産生能を最大限とするため高濃度の MMC (15µg/mL) を添加することとし、それによる濁度の上昇と毒素量の影響について調べた (図 5)。

その結果、MMC の O111 株の生育に及ぼす影響については、添加後 2 時間ほどで生育が鈍り、そのあとは濁度が減少していくことが観察された。この現象は、本食中毒事例で分離された O111VT2 あるいは VT-に関係なく、また参考株として使用した O111VT1,2 株 (EC2429) においても観察された。しかし、O157 株については、MMC 添加後、4~5 時間まで生育し、その後濁度が減少したが、O111 株ほどではなかった。また、今回の事例で食肉から検出された EHEC である O8 VT2 については、濁度の減少が最も少なかった。次に、一晚培養後の培養上清のベロ毒素量を RPLA 法で測定した (表 4)。

毒素産生は、O111VT2 である TIH005、TIH395、

TIH029でMMC添加によりVT2の産生量が増大した。しかし、TIH029については、毒素量は、他の2株と比較すると低かった。また、参照株として、使用したEC2429株については、VT2産生量は今回の食中毒事例のO111VT2と比較して、4倍高いという結果となった。O157株については、VT1及びVT2ともにMMC添加効果により、産生量は増大していた。また、今回、食肉から分離されたO8VT2株も並行して、試験したが、VT2の産生量はMMCを添加しても誘導効果はほとんど見られなかった。

そこで、異なる血清群の菌株においてMMCによる反応の違いがあるかどうかを確認するために、各血清型および毒素型の違いによるMMC(2µg/mL;予備実験より、毒素量の産生を最大にする最低濃度)による分離菌の生育に対する影響について調べた(図6)。この結果、O157の毒素型がVT1,2、VT1とVT2を保有する分離株に対するMMCの影響は、ほぼ同じような効果を示し、約5時間程度濁度が増加した後、濁度上昇は停止し、18時間後に若干濁度が低下することが観察された。しかし、O111VT2株は、4時間までO157と同程度まで濁度上昇するがその急激に濁度は低下し、2時間程度で最小濁度まで低下した。

そこで、次にこの培養上清中のベロ毒素をRPLA法で定量した(図7)。検出された毒素型は遺伝子型と一致していた。その産生の特徴として、VT1の産生は、MMC添加の誘導効果はVT2よりも小さく、またVT1はMMC誘導なしでも若干培地中で検出された。VT2については、MMC誘導の効果は大きく、産生量はVT1よりも数百倍以上の産生増大が観察された。また、VT2単独で保持したO157、及びO111のVT2産生量は高いことがわかる。特にO111VT2は、MMC無添加及びMMCによる誘導後のVT2の産生量は、O157よりもその増大率が高かった。

4. 分離菌の遺伝子型別

PFGE型については、本食中毒事例で分離されたEHEC O111株及びO157株の典型的な電気泳動像を図8に示した。電気泳動パターンは目視により行い、O111株については「a」を、O157株については「b」を付加した数字によって区別した。今回の食中毒事例で分離されたEHEC O111、O157及びO111VT-株の報告総数は213株、そのうちPFGEを実施した株は、総数177株、その内訳は、O111126株、O15751株である。

今回、認められたPFGE型は、O111株については、9つの型、O157株については10の型に分類され、供試した株における各PFGE型の検出頻度は、図9にまとめた。その結果、O111VT2株については、a1型、O111VT-株については、a5型が主

な型であった。このa1とa5型の違いは、a1型で最もDNAサイズが大きな(移動度の小さな)バンドがa5型では消失し、新たにDNAサイズの小さなバンドが出現しており、1バンドがシフトした違いであった。a2~a4及びa6~a9を示す菌株の分離頻度は低いが、2~3バンドの相違であり、Tenoverらの基準(*J.Clin.Microbiol.*, 33:2233,1995)に従うと、いずれも同一集団発生株と推定される。O157株については、b3型が28と最も多かったが、VT1,2、VT1及びVT2の異なる毒素型でもPFGE型は同一であった。次に多かった型はb6であったが、すべて毒素型はVT1,2であった。

また、ここで図8において、a3、a4、a6及びa7型については、分離直後の株のPFGEでは検出されなかった型である。その後、菌の純粋培養の継代過程で、検出された型であり、EHECの分離株ではしばしば株の継代中に観察される多型現象である。

IS-Printingによる型別結果については、現在利用できるキットがO157のみであり、O111の結果は参考データとした。但し、キットに病原性遺伝子が含まれているため、この結果については採用することとし、表6に示した。キット中の2種類のプライマーセットである1st set及び2nd setを用いた結果については、コード化した数値をIS Code-1及びIS Code-2で表記した。その結果、O111株については、TIH084を除いて、すべて同じ型であった。しかし、このTIHについても、IS Code-2の違いは1バンドのみの違いであり、PFGE型も同じであった。O157株については、毒素型に関係なく、IS Code-1及びIS Code-2に若干の相違が検出された。以上の結果から、今回の食中毒事例で分離されたO111株およびO157株は、同一集団発生株であると推定された。

5. 便中の毒素の検出

毒素検出の結果は、図10に示した。TIH036、TIH004、TIH017、TIH039、TIH050、TIH092については、便乳剤の上清、一晚増菌液の上清及びMMCを添加して一晚増菌した培養液上清には、いずれもほとんどベロ毒素は検出されなかった。しかし、TIH010及びTIH034については、便乳剤に毒素が検出され、MMCを添加した一晚培養液上清に毒素が検出された。

また、今回、供試した便8検体のうち、5検体については、本研究班の別の分担研究グループによって、便検体DNAの塩基配列解析(メタゲノム解析)が実施されている。

D. 考察

1. EHECの検索と分離株

従来の食中毒事例発生時の便培養においては、