

福岡市で分離された腸管出血性大腸菌 (型別不能株) の血清型と性状の比較

真子俊博¹・本田己喜子²・山下由美子¹
尾崎延芳¹・馬場純一¹

Comparison of biochemical characteristic and serovars of EHEC (OUT)
isolated in Fukuoka city

Toshihiro MAKO, Mikiko HONDA, Yumiko YAMASHITA
Nobuyoshi OZAK and Junichi BABA

要 旨

福岡市では平成 10 年度より腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査にモノクローナル抗体を利用した ELISA 法を導入している。それに伴い O157 以外の EHEC, 特に市販抗血清で型別不能の株が多数分離された。そこで今回, 国立感染症研究所に O 型別を依頼すると共に当所において糖分解能, 薬剤感受性試験, PFGE を実施し菌種間の性状を比較検討した。

血清型は 17 種類に分別され, O91:H10 が全体の 4 割を占めた。糖分解能では O145:H- がソルビトール非分解性を示した。薬剤感受性は, TC と SM に耐性を示す株が若干数あったが, ほとんどは 13 薬剤に感受性であった。O91:H10 の 17 株について PFGE パターンによる解析を行ったところ, 11 種類のパターンに分類され複数の由来による感染が示唆された。

Key Words : 腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *Escherichia coli*, ELISA Enzyme linked immunoassay, O 型別不能 O-serotype untypable, PFGE Pulsed field gelelectrophoresis

I はじめに

本市ではルーチン業務の一つとして, 保健所一般健康者検便, 食品従事者を対象とした勸奨検便及び学校給食従事者等について, 腸内病原細菌の検索を行っている。

平成 8 年に腸管出血性大腸菌は指定伝染病, 10 年には感染症新法 (略記) において第 3 類感染症になり, 検体数は増加した。平成 9 年度までは RPLA 法を導入していたが, 10 年度から ELISA 法に切り替えベロ毒素検出を優先し, それに伴い市販の抗血清では型別不可能の株が多数

分離されるようになった。そこで今回, 国立感染症研究所に O 型別を依頼すると共に, 当所において糖分解能, 薬剤感受性試験, PFGE (パルスフィールド電気泳動) による解析を実施し, 菌種間の性状を比較検討した。

II 材料および方法

平成 8 年 2 月から平成 11 年 10 月までに当所で EHEC と確認された 260 株のうち市販の O 型別抗血清で型別できなかった 29 株と医療機関より同定依頼があった 7 株の計 36 株を国立感染症研究所に型別依頼した。

糖分解能は基礎培地にアンドレイドのペプトン水を用いて 13 種類 (アラビノース・セルビオース・ラフィノ

1. 福岡市保健環境研究所 微生物課
2. 福岡市保健環境研究所 微生物課
(現所属: 福岡市市民病院 検査科)

ース・ラムノース・サッカロース・トレハロース・キシロース・アドニット・ズルシット・イノシット・マンニット・ソルビット・サリシン)の糖で1週間培養した。また薬剤感受性試験検査には1濃度ディスク(KB)でミューラーヒントン培地を用い、12種類(アンピシリン:ABPC・セファタキシム:CTX・カナマイシン:KM・ゲンタマイシン:GM・ストレプトマイシン:SM・テトラサイクリン:TC・クロラムフェニコール:CP・ジプロフロキサシン:CPFX・トリメトプリム:TMP・ナリジクス酸:NA・フォスфоマイシン:FOM・ST)の薬剤について実施した。

感染研で血清型が判明した中で特に分離頻度が多かったO 91と、複数株分離された型について制限酵素に Xba Iを用いた PFGE 法による解析を行った。

III 結 果

36株の血清型別結果は表1に示すように16種類に型別された。特に目立った血清型はO 91:H10で、12事例から分離され全体の4割を占めた。次に多いのはO 145:

H-の3例であった。糖分解能ではO 157の判定基準になっているソルビトール非分解性がO 145:H-すべてにみられた。またO 5の2株とO 121の計3株はラフィノース、サッカロース、サリシン等が非分解となり、他のEHECと異なる性状を示した。また薬剤感受性においては、殆どの株が12種類の薬剤に対して感受性を示したが、O 91:H10とO 103:H 2の2株がTCとSMに、O 8:H 8がTCに対して耐性を示した。

PFGE解析結果のデンドログラムを図1に示した。17株のO 91(O 91:H-を含む)は11種に分類され、3例に同一パターンが認められた。また、O 145の3株は遺伝子解析の結果80%の近似性が見られ、またO 5とORではそれぞれ解析結果が一致していた。

IV 考 察

O 157に代表される腸管出血性大腸菌は堺市での集団発生、全国各地の集団感染事例などから社会的な問題となり平成8年に指定伝染病に指定され、現在3類感染症となっている。その後、O 157以外にO 26、O 111などの集団発生が見られるようになりO 157以外の血清型も報告されるようになってきた。

しかし、これまで大腸菌の血清型は市販抗血清による型別が中心で、44種の抗血清のうちEHECでは19種が市販されているにすぎない。このた

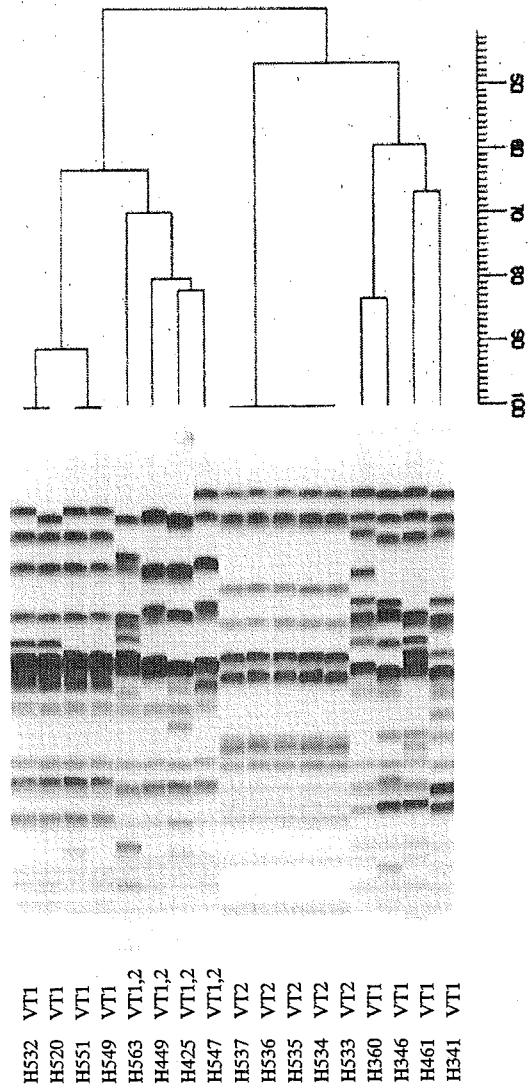
表1 血清型別と菌の概要

No	分離年月日	症状	血清型	V T型
H304	H8.9.27	保菌者	O 169 : H -	1, 2
H335	H9.4.1	保菌者	O 160 : H21	2
H339	H9.4.22	保菌者	O 50 : H2	1
H341	H9.5.14	保菌者	O 91 : H10	1
H346	H9.5.27	保菌者	O 91 : H10	1
H360	H9.7.21	保菌者	O 91 : H10	1
H425	H.10.1.12	保菌者	O 91 : H -	1, 2
H446	H10.4.13	保菌者	O 145 : H -	1
H447	H10.6.5	保菌者	O 18 : H -	1
H449	H10.4.16	保菌者	O 91 : H10	1, 2
H461	H10.8.19	保菌者	O 91 : H10	1
H462	H10.8.19	保菌者	O 44 : H8	1, 2
H492	H10.9.7	保菌者	O 145 : H -	1
H520	H10.11.6	保菌者	O 91 : H10	1
H523	H10.11.11	保菌者	O 8 : H8	2
H532	H10.12.8	保菌者	O 91 : H10	1
H533	H10.12.16	保菌者	O 91 : H10	2
H534	H10.12.18	保菌者	O 91 : H10	2
H535	H10.12.18	保菌者	O 91 : H10	2
H536	H10.12.18	保菌者	O 91 : H10	2
H537	H10.12.18	保菌者	O 91 : H10	2
H547	H10.12.18	有症者	O 91 : H10	1, 2
H549	H11.3.10	保菌者	O 91 : H10	1
H551	H11.4.15	保菌者	O 91 : H10	1
H556	H11.5.17	保菌者	O 149 : H -	1, 2
H560	H5.2.22	有症者	O 5 : H -	1
H561	H11.5.22	保菌者	O 5 : H -	1
H563	H11.5.23	有症者	O 91 : H10	1, 2
H565	H11.6.25	保菌者	O R : H33	2
H566	H11.6.25	保菌者	O R : H33	2
H571	H11.7.3	保菌者	O 55 : H8	1, 2
H591	H11.8.26	有症者	O 145 : H -	1, 2
H601	H11.9.21	保菌者	O 82 : H25	2
H602	H11.9.23	有症者	O 121 : H33	2
H603	H11.10.1	有症者	O 103 : H2	1
H606	H11.10.8	保菌者	O 162 : H21	2

* H560, 591は医療機関からの依頼株

* H547, 563, 565, 602, 603は民間検査センターからの依頼株

図1 O91における17株のPFGE解析結果



め、市販血清で型別できない場合は疫学的調査を行うことができない状況にある。

当所では、平成9年度までRPLA法による検出法を行っていたが、平成10年度から大量処理が可能なEIA法を導入した。本法はペロ毒素を直接検出するサンドイッチELISA法で2.5時間で検査が可能である。このEIA法導入に伴い、市販抗血清で型別不能のEHECが多数分離されるようになった。

これは、ペロ毒素を産生するEHECが存在するとRPLA法よりも高感度に陽性反応としてとらえるため、血清型に関係なくペロ毒素産生菌を検索できることによる。しかも、O157以外では

表2 年度別EHECの検体数と分離状況

年度	8	9	10	11
検体数	30056	14683	24336	24017
陽性数	18	88	102	89
(%)	(0.06)	(0.6)	(0.42)	(0.37)
O157	16	30	75	39
non157 ¹⁾	1	51	6	35
OUT ²⁾	1	6	26	15

1) 市販抗血清による型別

2) 型別不能株

直接分離培養よりはるかに効率よくEHECの有無が推定可能である。

国立感染症研究所による型別不能株の血清型別の結果、16種に型別され、さらにペロ毒素の型との組み合わせでみると23種にのぼり、多種類の型が分離されたことになる。

最も多く分離されたO91についてPFGEによる遺伝子解析を行ったところ、O91の17株は11種に分類され、複数の由来株が示唆された。

全体の4割を占めたO91:H10は、H9年に3株、H10年11株そしてH11年には2株と毎年のように分離され、現時点で全国的に見ても福岡市に多く見られる血清型である¹⁾。

図1のPFGEの解析結果から遺伝子パターンが一致したのは3グループになった。一つは職場の仲間での牛のタタキを喫食した事例で、他は散発事例間でありながら共に一ヶ月の期間内に分離されたもので、短期間のうちになんらかの要因を経て感染したものと思われた。

分離された16種類の型を全国の分離状況と比べると²⁾、福岡市においてのみ検出された型はO5・18・44・50・82・149・160・162・169の9種類に及んだ。しかし、これら型別不能株が当市においてのみ分離されるものか否かは全国的な調査や検査が行われていない現状から判断はできないが、かなりの数で型別不能株が分布しているものと考えられる。

糖分解能ではO157の判定基準の一つになっているソルビトール非分解性がO145:H-にみられ、O157以外にもあることを念頭に入れて検査を進める必要性を感じた。

現在、広く用いられているCT-SMAC培地はセフィキシムと亜テルル酸が添加されているが、多くの型別不能株は亜テルル酸の影響で発育が阻止され

た。O 157 の検査においては CT-SMAC 培地でも検査可能であるが、型別不能株を含む EHEC の検査では選択性の弱い分離培地の併用が必要であろう。

薬剤感受性試験の結果、TC・SM2 剤及び TC1 剤に耐性を示すものが一部認められたが、多くの株では 12 薬剤に感受性を示していた。EHEC の薬剤感受性については、埼玉県³⁾が AMPC・TC・SM 等に耐性を示す株があると報告しているように、当所でもほぼ同様の傾向であった。

当所では毒素の検出法を RPLA 法より感度が高い ELISA 法に変更したことにより、EHEC の検出率、型別不能株が共に増加が認められた。表 2 に H8 年から H11 年までの検体数と分離された EHEC の分離株数を示した。年度により集団発生の関係から検出率は異なるものの、健康者からの型別不能株の検出率は、H10 年には 9 年の 2 倍となり ELISA 法は有効と思われた。当所のように多くの健康者検便を実施しているところは全国的にみても少なく、また検査を行っているところを比較しても明らかに高い検出率を示した。このようなことから毒素からの検出を優先することに意義があると思われ、2.5 時間で検査を行える EIA 法は現在のところ集団事例や疫学調査に最も有効な方法と考えられる。

ちなみに、当所における検便で型別不能の EHEC が検出された者の中に有症者はいなかった。最後に、市販抗血清に存在する血清型が当所で型別できない株がみられた。これは市販抗血清の力価や吸収不足などに問題があるのかどうかは不明であるが、不一致の報告⁴⁾も見られることから、市販抗血清はもとより自家製免疫血清を必要に応じて準備しておく必要があると思われた。

謝 辞

血清型別を行って頂いた国立感染症研究所 細菌部 田村和満先生に深謝いたします。

分 献

- 1) 病原微生物情報 1996～1999
- 2) 病原微生物情報：〈情報〉，2，20，9，1994
- 3) 山田文也，他：埼玉県における下痢症患者から分離された腸管出血性大腸菌の細菌学的性状について，感染症学雑誌，68，1451～1458，1994，
- 4) 斉藤志保子，他：牛が感染原と考えられた Vero 毒素産生大腸菌 O103:H2 による家族内感染事例，感染症学雑誌，20(7)，707～713，1998