

福岡市内某保育園で発生した腸管出血性大腸菌 (O26:H11) の集団感染事例

尾崎延芳¹・真子俊博²・山下由美子³
衛藤真理子¹・馬場純一¹・大田耿三¹

An Outbreak of Serotype O26:H11 of Enterohemorrhagic Escherichia Coli in Fukuoka City

Nobuyoshi OZAKI, Toshihiro MAKO, Yumiko YAMASHITA
Mariko Eto, Junichi BABA and Kozo OTA

要 旨

2000年9月、福岡市内の某保育園において腸管出血性大腸菌 O26 (VT1) の集団感染事例が発生したが、1997年7月に同じ血清型の O26 (VT1) の集団感染がみられた施設であった。

9月14日初発患者からの O26 (VT1) 検出に伴い 194名の検便と調査が行われ、33名の感染者 (園児 29名、園児の家族 4名) が確認された。また、当保育園では給食を提供していたことから、保存食 23検体、給食施設のふき取り 14検体および砂場の砂、カメの飼育水について調査したが O26 は検出されなかった。1997年の集団発生時に分離された O26 菌株と今回分離された菌株を比較するため、パルスフィールド・ゲル電気泳動による解析を行った。今回分離された菌株は 90%以上の高い近似性が認められ、同一感染源と推定されたが、1997年に分離された保存菌株とは異なるパターンを示した。

Key Words : 腸管出血性大腸菌 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* , 福岡市 Fukuoka City
集団感染事例 outbreak , O26 , 保育園 Nursery school,
パルスフィールド電気泳動 Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

I はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*;EHEC) による集団感染事例は、1996年に小学校を中心として多発して以来、学校給食の衛生管理の強化が図られ発生はみられない。しかし、老人施設や保育園等衛生指導・管理が十分に行き届きにくい施設においては依然として集団感染が起こっている¹⁾。

福岡市では、1996年に O157 (菌陽性者 22名)、1997年に O26 (菌陽性者 28名)、1998年に O157 (菌陽性者 25名)、1999年には O111 (菌陽性者 21名) の集団感染事例がいずれも保育園において発生した。今回また保育園において O26 (VT1) の集団感染事例を経験したので報告する。同保育園は 1997年7月にも O26 (VT1) の集団感染 (園児 28名、家族 16名) があつた施設である。

II 概要および方法

1. 福岡市保健環境研究所 微生物部門
2. 福岡市保健環境研究所 微生物部門
(現所属：福岡市保健環境研究所 衛生化学部門)
3. 福岡市保健環境研究所 微生物部門
(現所属：福岡市立こども病院感染症センター 検査科)

平成12年9月14日、市内医療機関より市内在住の5歳児から O26 (VT1) を検出したとの発生届が管轄保健所にあつた。この患児は市内の保育園に通園していることから直ちに調査が行われた。

調査および検便の結果、患児が内服を途中で中止して保菌者の状態で登園していること、また同園では1997年7月にO26 (VT1) の集団感染 (園児28名, 家族16名) が起きていたことから全園児162名, 職員32名の検便を実施することとなった。

表1 初発患児の症状経過

月 日	症 状 等
9月10日	早朝より腹痛, 水様下痢 (毎時間おき) 夕方から血便, 9月11日受診, 検便.
9月12日	下痢改善, 軟便化, 通園.
9月13日	ほぼ普通便, 母親の判断で服薬中止.
9月14日	検便結果判明 (O26 : VT1), 再受診, 再検便実施.

表2 初発患児の喫食状況

月 日	朝	昼	夜
9月5日	パン	給食 ※1	パン, シチュー
9月6日	パン	給食 ※2	カレーライス
9月7日	パン	給食 ※3	ハンバーグ, スパゲティ
9月8日	パン	給食 ※4	豚汁, かにシューマイ, 鯖みりん
9月9日	パン	オムライス (外食)	焼肉, いかの刺身
9月10日	パン	エビフライ (外食)	おじや

※1 わかめとコーンのスープ・レバーのオーロラ煮

【ごはん・わかめ・人参・玉葱・コーン (缶)・卵・牛レバー・レタス・生姜・片栗粉・牛乳】

※2 豚汁・切り干し大根の煮付け

【ごはん・豚肉・豆腐・薄揚げ・里芋・糸こんにゃく・人参・葱・ごぼう・大根・切り干し大根・干椎茸・牛乳】

※3 野菜スープ・牛肉とコーンのソテー

【パン・牛肉・じゃがいも・玉葱・人参・ピーマン・パセリ・コーン・キャベツ・ごぼう・牛乳】

※4 味噌ラーメン・三色野菜の中華漬け

【パン・ラーメン玉・焼き豚・卵・人参・もやし・大根・きゅうり・わかめ・ごま・ごま油・牛乳】

表3 初発患児の登園等の状況

月 日	登園	症 状 等	FOM 内服
9月8日	登園	なし	なし
9月9日	休園	なし	なし
9月10日	休日	腹痛, 下痢, 血便	なし
9月11日	休園	腹痛, 下痢, 血便	受診 あり
9月12日	登園	軟便	あり
9月13日	登園	普通便	なし
9月14日	登園	普通便	なし
9月15日	9 / 14	O26VT1(+)	のため以後休園

初発患児について症状経過 (表1), 喫食状況調査 (表2), 登園等の状況 (表3), 給食の献立および材料について※1~※4にそれぞれ示した。初発患児は, 9月10日早朝より腹痛, 水様下痢 (毎時間) に加え夕方から血便を呈したため, 翌11日に医療機関を受診し検便が実施された。9月12日には下痢が改善し, 軟便となったため保育園に通園した。9月13日にはほぼ普通便となったところから, 母親の判断で服薬を中止 (5回服用; 3回/日) していたが, 9月14日検便結果が判明 (O26 : VT1 検出) したため, 再受診し再検便を実施した。家族は全員無症状であった。

初発患児が通う保育園は, 園児総数168名, 職員25名 (給食, 乳幼児担当職員は10名) で給食従事者および乳幼児担当職員は月1回の定期検便を実施しており, 8月24日の検査では, 全員陰性であった。

検査方法は, シードスワブ (トランスシステム) により採便し, 2.5mg/L 亜テルル酸カリウム加ラムノースマツコンキー寒天培地での直接分離培養と平行して, マイトマイシン (200ng/ml) を添加した CAYE 培地で 37°C 18時間以上振盪培養後, ノバパスペロ毒素 EIA キット (BIO-RAD) によりペロ毒素の測定も行った。分離された疑わしいコロニーは PCR 法によりペロ毒素遺伝子の型別を行い, 型別できたものについては生化学的性状検査および血清学的検査を実施した。更に O26 と確定された菌株について12種類 (ABPC・CCL・CFDN・FOM・NFLX・NA・KM・MINO・DOXY・TC・CP・OFLX) の薬剤感受性検査およびRPLA法による毒素の定量を行った。

保育園では給食を提供していたことから, 保存食 (昼食12検体, おやつ11検体), 給食施設内のふきとり14検体および砂場の砂, 飼育動物 (カメ) の飼育水について

も検査を実施した。

また、1997年のO26集団感染時に感染が認められた園児のうち4名においては今回もO26が分離されたところから、前回分離された菌株と今回分離された菌株を比較するため制限酵素Xba I を用いてPFGE電気泳動を行った。

III 結果及び考察

当所において9月16日から21日の期間に園児、職員および園児家族等の検便を実施し、園児28名（初発園児含む）、保護者4名からO26（VT1）が検出された。

（表5）更に27日には20日に下痢の症状を呈し、21日に医療機関を受診した園児1名から、新たにO26（VT1）が検出され、感染者は合計33名となった。

食品等の検体からO26を検出することはできなかった。

表5 検便実施状況および結果

月 日	実 施 対 象	検便 人数	陽性者 人 数
9月16日	園児 職員	111 23	19 -
9月18日	園児 帰省中園児（鹿児島実施）	47 2	6 -
9月19日	園児 9/16の陽性園児の家族	2 49	2 2
9月20日	9/18の陽性園児の家族 陽性園児の家族（熊本実施）	12 1	2 -
9月21日	9/19の陽性園児の家族	3	-
9月27日	医療機関受診園児	1	1
	計	250	32

今回の事例では合計33名（初発園児含む）からO26が分離されたが、そのうち16名（48.5%）が発熱、軟便、下痢等何らかの症状を呈し、菌陽性者は園児29名およびその保護者等家族4名で、家庭での感染拡大は比較的少なかった。これは感染園児が4～6歳の年長組が過半数を占めていたことによるものと推察される。1997年のO26集団感染の時は1歳児が中心で、園児25名、保護者等家族16名からO26が分離されていた。このことはオムツや汚染物等の処理により二次感染が起り得ることが示唆され、手洗い等の衛生意識の徹底が二次感染の予防につながり今後とも啓発の必要性があると思われた。

当該保育園は鉄筋コンクリート陸屋根2階一部3階建てで、それぞれのクラスは1階にはうさぎ組（2歳児）・はと組（3歳児）・ほし組（4歳児）・つき組（5歳児）、2階にはひよこ組（0歳児）・あひる組（1歳児）・ばら組（2歳児）が配置され、それぞれのトイレは1階（うさぎ専用、はと・ほし・つき共用）と2階（ばら専用、ひよこ・あひる）に設置されていた。

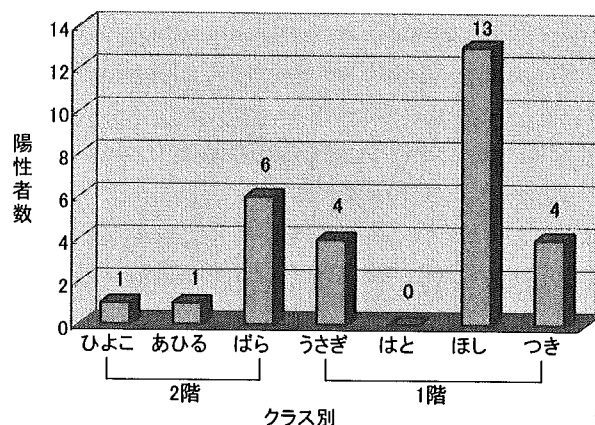
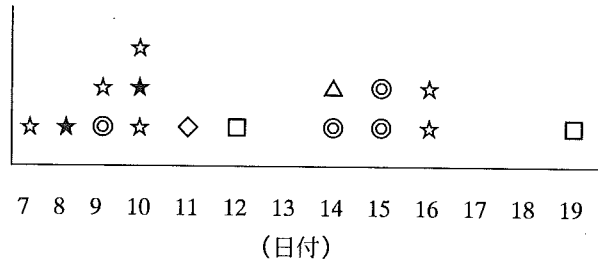


図1 O26 陽性園児クラス別状況

図1に今回の事例のO26陽性園児クラス別検出状況を示した。初発園児（5歳児）は、つき組であったにもかかわらず、O26陽性者が一番多かったのは、ほし組（13名）であった。次いでばら組（6名）、うさぎ組（4名）、つき組（4名）、ひよこ組（1名）あひる組（1名）の順で、はと組に菌陽性者はいなかった。ほし組とつき組の部屋は隣り合わせて、トイレおよび手洗い所も共有していたことから感染が広がった可能性も考えられる。しかし、同じフロアでトイレも共有のはと組には菌陽性者がいなかった。これについては不明であるが、はと組の横にも別の手洗い所があることからトイレは共有していたものの、ほし・つき組とは別の手洗い所を使用していた可能性は考えられる。また、はと組は3歳児のため年齢差があることや部屋の立地条件等の問題で交流があまりなかったことも考えられる。ただし、部屋が2階にあるばら組、ひよこ組、あひる組には菌陽性園児の存在が認められた。これは、ばら組の菌陽性園児6名の中4名においては同園に通園している兄弟（ひよこ組、うさぎ組、ほし組、つき組）があり、ひよこ組とあひる組においてもそれぞれ、ばら組、ほし組に兄弟が通園している。また、部屋は1階に位置し、専用トイレを使用していたうさぎ組にも菌陽性園児が存在した。このうさぎ組の菌陽性園児4名中2名は双子の兄弟で、他の1名にはばら組に兄弟がいた。これらの兄弟からもすべてO26が検出されていることから兄弟間感染が確認された。

一方、O26菌陽性園児の中で何らかの症状を呈した16

名の日別の症状出現状況を図2に示した。初発園児が血便を呈した9月10日以前にほし組に軟便を呈していた園児が存在し、菌陽性園児がほし組に多かったことを考慮すれば、ほし組からの感染拡大の可能性は否めないが、感染経路を明らかにすることはできなかった。有症者の発生状況から判断して保育園の給食を介したものは考えにくく、person-to-personの可能性が示唆された。



◇ひよこ ◎はら △うさぎ ☆ほし ★つき □家族
図2 O26 菌陽性者 (有症者) の日別症状出現状況

今回併用した直接分離培養と CAYE 培養液中からペロ毒素を検出する EIA 法とは良好な相関を示し、分離培養で O26 菌陽性検体は EIA 法でもすべて陽性で一致した。

検出された 33 株 (初発園児含む) すべてにおいて PCR 法で VT1 遺伝子を確認した。RPLA 法によるペロ毒素の定量は、6,400 培の 2 名を除いて 3,200 倍と比較的低い毒素量を示した。12 種類の薬剤に対してはすべて感受性を示し、生化学的性状はすべて同一であった。

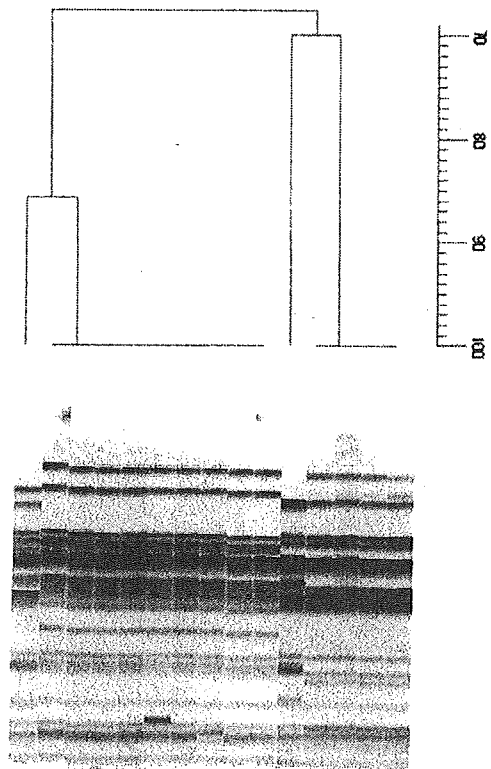
また、PFGEパターン (図3および図4) は、今回分離されたO26の菌株間では90%以上の近似性が認められた。しかし、1997年に分離された菌株と今回分離された菌株間では違うパターンを示した。

直接分離培養と増菌培養液中のペロ毒素を検出するEIA法を平行して菌検索を実施し、O26が分離された検体ではEIA法でもすべてペロ毒素陽性で、両者の相関は良好であった。これは昨年(0111)集団事例²⁾でも経験していることであるが、検体の前培養にマイトマイシンC加CAYE培地で18時間以上振盪培養することにより毒素産生量が良くなったことに加え、検体希釈液にもポリミキシンB (最終濃度5,000単位) 添加したことで、通常の方法でのEIA法に比較してペロ毒素の検出感度が向上し、極小数の菌しか分離できなかった検体についても陽性となったものと考えられた。これはマイトマイシン C 添加によりバクテリオファージの溶菌ファージへの多コピーによってペロ毒素の産生が高まったものと考えられた。

1997年のO26による集団感染事例においてO26に感染していた4名の同一園児から今回も当該菌が検出されたことから、これらの事例の因果関係を解明するために、

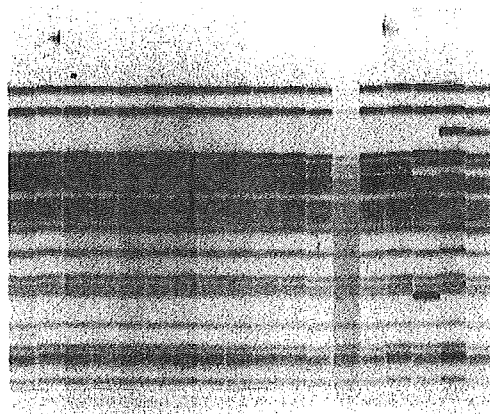
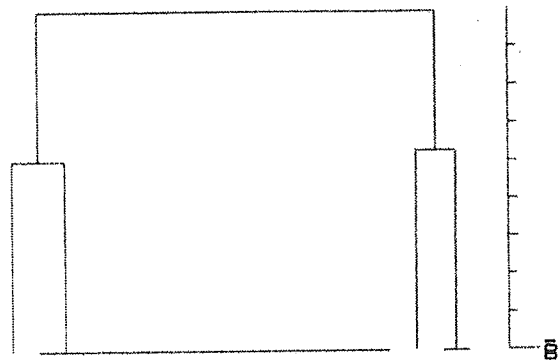
両者の分離株について PFGE による遺伝子解析を行った。(図3)

今回の集団感染事例における分離菌 (2000年9月発生の代表菌株; ②~⑩) と1997年7月発生時の保存菌株⑫~⑮とでは明らかに遺伝子レベルで異なる結果となり、前回と今回の感染源は由来が異なるものと示唆された。しかし、今回分離された一連の菌株間での PFGE 解析 (図4) は同一園児から分離された菌株間 (L, P, R) および A, Q の園児に若干のバンドの相違が見られ、すべて同一のパターンは認められなかったが、近似度で90%以上のパターンを示していることから、今回の集団感染は同一の感染源に由来するものと考えられた。これは Tenover³⁾ が2本あるいは3本程度のバンドが違う菌株は相互に密接な関連がある株と提案していることや、刑部⁴⁾ が PFGE の変化について分離後14~18日間室温放置されたO157の菌株を再分離した2株のそれぞれ44, 43個のコロニーからそれぞれ7コロニー (16%), 1コロニー (2%) にパターンの変化が見られたと報告していること等から、菌株の保存状態やその方



①②③④⑤⑥⑦⑧⑨⑩⑪⑫⑬⑭⑮
②③④⑤⑥⑦⑧⑨⑩ . . . 2000年12年分離株
⑫⑬⑭⑮ . . . 1997年分離株
(① O157, ⑪ OUT は対照)

図3 患者由来 O26 の PFGE パターン



A B C D E F G H I J K L M N O P Q R
(L, P, Rは同一園児からの分離菌)

図4 2000年事例の分離菌のPFGE

法により変化が起こったものと考えられる。また、L, P, Rと3パターンを示した園児は治療のため抗生物質を投与されていること等を考慮すれば1996年帯広市某幼稚園で発生したO157集団感染事例の持続排菌患者株の調査で、牧野ら⁵⁾が報告しているように菌が体内を通過

する際に受けた薬剤の影響やプラスミドの付加など種々の条件による変異が起こることも考えられる。

また田口ら⁶⁾は時期的にあるいは地理的に異なった菌株の関連性をより詳細に解析するためには、複数のコロニーについて、プラスミドプロファイルやPFGE等複数の方法を組み合わせる必要性を述べている。今回の事例では、保存食等からは当該菌は検出されず、感染源を追求することはできなかった。

文 献

- 1) 国立感染症研究所 厚生省保健医療局結核感染症課：病原微生物検出情報，21，92～93，2000
- 2) 山下由美子，ら：福岡市某保育園における腸管出血性大腸菌 O111:H-の集団感染事例，福岡市保健環境研究所報，25，119～122，2000
- 3) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV *et al.* : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis, criteria for Bacterial strain typing, J. Clin. Microbiol., 33, 2233～2239, 1995
- 4) 刑部陽宅，ら：牧場牛舎における腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染例について—富山県，病原微生物検出情報，19，9～10，1998
- 5) 牧野壯一，ら：帯広市における腸管出血性大腸菌 O157 集団感染—薬剤感受性およびプラスミドプロファイルについて—，感染症学雑誌，72，89～96，1998
- 6) 田口真澄，ら：志賀毒素産生性大腸菌 O157 による家族内感染事例の疫学マーカー解析，感染症学雑誌，74，104～111，2000