

「キュウリの浅漬け」が原因と推察された 腸管出血性大腸菌 O157 の集団感染事例

尾崎延芳¹・大庭三和子¹・樋脇 弘¹・藤代敏行²・衛藤真理子¹・
瓜生佳世¹・真鍋和義¹・宮代 守³・若月紀代子¹・武田 昭¹・

A Diffuse Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H- Infection , Probably Caused by Pickled Cucumbers

Nobuyoshi OZAKI , Miwako OBA , Hiroshi HIWAKI , Toshiyuki FUJISHIRO ,
Mariko ETOU , Kayo URYU , Kazuyoshi MANABE , Mamoru MIYASHIRO ,
Kiyoko WAKATSUKI and Akira TAKEDA

要 旨

2002年6月、福岡市内の某保育園において腸管出血性大腸菌 O157 の集団感染事例が発生した。6月26日、初発患者からの本菌検出に伴い、延べ1,540名の検便と調査が行われ、112名の感染者（初発患者含む園児86名、職員14名、園児の家族12名）が確認された。保育園では給食を提供していたことから、保存食129検体（調理済み食品59検体、原材料70検体）、給食室残品121検体、調理場のふき取り6検体、園が購入した食品の製造施設のふき取り等142検体、食品製造所従業員検便64検体および園内の使用水、砂場の砂、貸しおむつ、ペット等の飼育水等の検体21検体について検査した結果、6月21日の給食に供された「キュウリの浅漬け」から本菌が分離された。

すべての分離株は VT2 を産生し、疫学的調査およびパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）等による解析の結果、すべて同一菌と推察された。

Key Words : 腸管出血性大腸菌 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* :EHEC , 集団感染事例
Outbreak , O157 , 保育園 Nursery school , パルスフィールドゲル電気泳動
Pulsud-field gel electrophoresis (PFGE) , キュウリ Cucumber

はじめに

腸管出血性大腸菌（Enterohemorrhagic *Escherichia coli* , 以下 EHEC と略す）による感染症は、1999年4月から施行された「感染症の予防および感染症の患者に

対する医療に関する法律」により、第3類感染症とされ、全数把握の対象疾患となっている。感染症発生動向調査によると、患者および無症状病原体保有者は、毎年3,000人以上が報告され¹⁾、1996年の小学校での大規模な集団感染事例以降も小規模ながら依然として保育所、福祉・養護施設、病院等における集団発生や、牛タタキ・ローストビーフ、ビーフ角切りステーキや和風キムチを原因食品とする広域事例（diffuse outbreak）も報告されている²⁾。

福岡市においては、年間100人前後の EHEC 感染者がみられ、その大半は散発事例であるが、毎年、保育園において10人以上の集団感染事例が発生している。

-
- 1.福岡市保健環境研究所保健科学部門
 - 2.福岡市保健環境研究所保健科学部門
(現所属：保健福祉局 食品衛生検査所)
 - 3.福岡市保健環境研究所保健科学部門
(現所属：保健福祉局 生活衛生課)

本年も市内保育園において「キュウリの浅漬け」が原因と推察された集団感染事例が発生し、感染者 112 名(初発患者含む)が確認されたので報告する。

概要および方法

2002 年 6 月 26 日、市内医療機関から市内在住の 6 歳女児の EHEC O157 (VT2) 患者発生届けが管轄保健福祉センターにあった。この患児は市内の保育園に通園していたことから直ちに保育園(園児 145 名、職員 25 名)の聞き取り調査等が行われた。

調査等の結果、複数の下痢症状等を有する園児がいることが判明したため、6 月 27 日に全園児および職員の検便が実施された。

また、保育園では給食を提供していたことから、6 月 17 日～6 月 25 日分(発症日前日までの 9 日間)の保存食 129 検体(調理済み食品 59 検体、原材料 70 検体)、保存食以外の給食室残品 121 検体、給食施設のふき取り 6 検体、園内の使用水、砂場の砂、貸しおむつ、ペット(カメ)の飼育水等の環境調査と検体採取 21 検体、園が購入した食品の製造施設のふき取り等 142 検体(表-1)も搬入され、これらの検体についても EHEC O157 の検査を開始した。

表-1 食品等の検査件数

検体区分	検体数	
保存食・給食室残品(保存食以外)	調理済み食品	59
	原材料	70
保存食以外の給食室残品	121	
給食施設のふき取り	6	
園内の使用水	21	
砂場の砂		
貸しおむつ		
ペット(カメ)の飼育水		
その他		
食品製造施設のふき取り等	142	
計	419	

また、7 月初旬には、健康危機管理の観点から学識経験者および国立感染症研究所実地疫学調査専門官

(FETP)も含めた調査委員会が設置された。

便の検査は、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ソルビトールマッコンキー寒天培地、クロモアガー O157 寒天培地での直接分離培養と平行して、マイトマイシン C(最終濃度 100 μl / L)を添加した CAYE 培地で 37 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を行った。

また、菌陽性者の陰性化確認については、TSB で 37 6 時間一次増菌後、培養液 1ml を 10ml の CT-Mac ブロスで 37 18 時間二次増菌後、VIDAS I.C.E.coli O157 (bioMerieux)にて免疫濃縮法を実施した。

一方、食材等の検査は、ノボピオシン加 mEC 培地で 42 18 ~ 20 時間増菌後、分離培養と PCR 法を行った。ただし、保存食等の冷凍食品については Buffered Peptone Water(BPW)で 37 18 ~ 20 時間一次増菌後、培養液 1ml を TSB 培地で 37 18 ~ 20 時間増菌後、分離培養と PCR 法を行った。

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性状検査および血清学的検査を実施した。更に、EHEC O157 と確定された菌株のうち、16 株について 12 薬剤(ABPC・KM・GM・SM・TC・CP・TMP・CTX・OFLX・NFLX・NA・FOM)による薬剤感受性試験(KB法)、ペロ毒素の定量(RPLA法)、生物型別(Khakhria, Beutin), Plasmid type, RAPD type および制限酵素 Xba によるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行った。

結果及び考察

表-2 に感染者等の状況を示した。

当研究所において、6 月 27 日から 7 月 26 日の期間に園児、職員、園児家族等および園が購入した食品の製造所従業員等のべ 1,540 名の検便を実施し、園児 80 名、職員 13 名、園児家族等 11 名から EHEC O157 が検出された。医療機関を受診して感染が確認された者を含めると感染者数は園児 86 名、職員 14 名、園児家族等 12 名の合計 112 名(初発患者を含む)となった。うち 1 名は初回検便前日より抗菌剤の内服を開始しておりその後の検便結果でも陰性であったが、HUS、脳症を発症し、ペア血清で LPS の上昇を認めた例であった。これら感染者 112 名のうち有症状者は 90 名(80.4%)と感染者の約 8 割を呈し、最も多かった症状は下痢・軟便(74.1%)、次いで腹痛(49.1%)、発熱(21.4%)、血便(20.5%)

および嘔吐（13.0％）の順であった。さらに、有症状者のうち20名（園児19名、職員1名）が入院加療を要した。入院患者のうち11名（菌陽性者の9.8％、有症状者の12.2％）は溶血性尿毒症症候群（HUS）と診断され、6名（菌陽性者の5.4％、有症状者の6.7％）に脳症の合併が認められた。透析治療がなされた者は5名であった。

表-2 感染者等の状況 (単位：人)

区分	在籍者数	感染者数	健康保菌者数	発症者数	入院	HUS			脳症			透析		
						発症者数	入院	死亡者数	発症者数	入院	死亡者数	発症者数	入院	死亡者数
園児	145	86	15	71	19	11	6	5						
職員	25	14	3	11	1	0	0	0						
家族		12	4	8	0	0	0	0						
計	170	112	22	90	20	11	6	5						

- ・在籍者数は長期欠席者の1名を除く
- ・感染者の112名は初発患者を含む。

表-3 に園児・職員の感染率、図-1 に年齢別感染者数を示した。保育園は6クラスに分かれており、園児の感染は全クラスに広がっていた。クラス別感染者は0歳児クラス：11名中2名（18.2％）、1歳児クラス：17名中9名（52.9％）、2歳児クラス：24名中9名（37.5％）、3歳児クラス：27名中19名（70.4％）、4歳児クラス：34名中20名（58.8％）、5歳児クラス：32名中27名（84.4％）、職員：25名中14名（56.0％）で、5歳児クラスの感染が最も多く、0歳児クラスで最も低く、園児全体では59.3％の感染率を示していた。

表-3 園児・職員の感染率

区分	在籍者	感染者	感染率
0歳児	11	2	18.2%
1歳児	17	9	52.9%
2歳児	24	9	37.5%
3歳児	27	19	70.4%
4歳児	34	20	58.8%
5歳児	32	27	84.4%
園児計	145	86	59.3%
職員	25	14	56.0%
計	170	100	58.8%

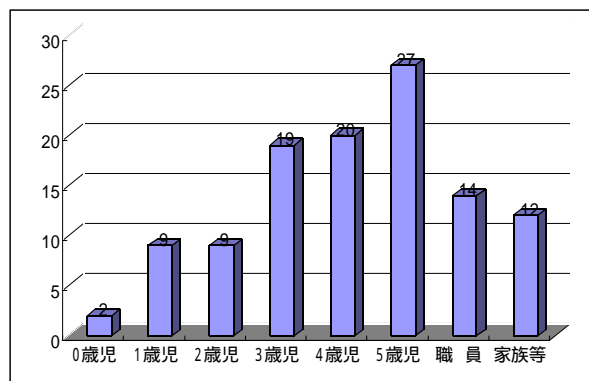


図-1 年齢別感染者数

図-2 に有症者の発症日、図-3 に EHEC O157 菌陽性者の日別検出状況を示した。疫学的調査等から、有症者の症状は6月21日に始まり、6月24日にピークがみられた。また、EHEC O157 菌陽性者の日別検出状況は、初回検便の6月27日に感染者の約80％に当たる80人から EHEC O157 が検出されている。これらを考慮すれば、園児・職員は、短期間に感染曝露を受けたと考えられた。6月29日からの有症状者は菌陽性園児の家族等であり、これら家族等は二次感染と考えられた。

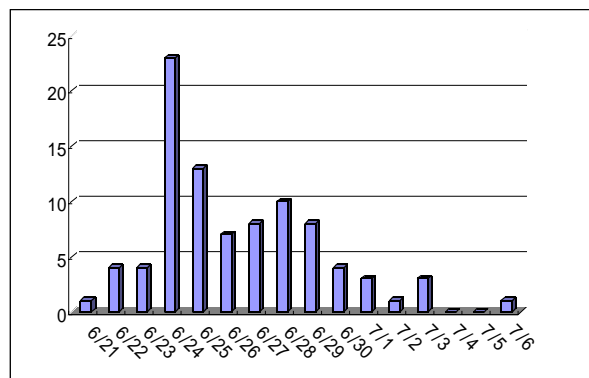


図-2 有症者の発症日

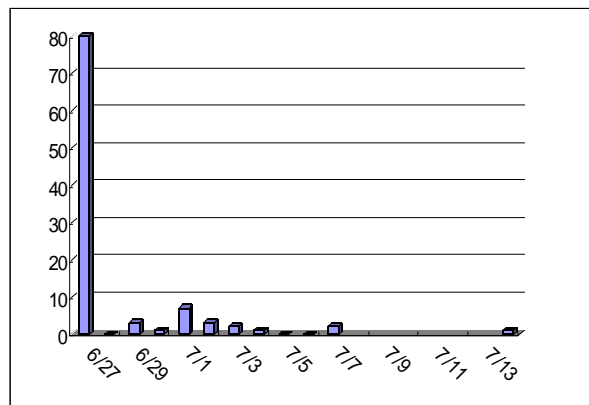


図-3 EHEC O157 菌陽性者の日別検出状況

食材等からの EHEC O157 検査で、6月21日、園の給食で出された「キュウリの浅漬け」(保存食)から EHEC O157 が分離された。他の食材等からは EHEC O157 を分離することはできなかった。しかしながら、数日間冷蔵保存した「キュウリの浅漬け」について、改めて EHEC O157 菌数定量 (MPN5 本法 + Beads 集菌およびコロニースweep PCR 法の組み合わせ) を実施したが、EHEC O157 を検出することはできず、冷蔵保管中に死滅したものと考えられた。

「キュウリの浅漬け」から EHEC O157 が検出されたことから、保育園が購入した浅漬けの製造所に保管してあったキュウリの浅漬け (参考品) 1 検体、ぬか床等の食材 9 検体、漬け物樽、落とし蓋等のふき取り 60 検体、汚水環境調査等の検体 15 検体の合計 85 検体および従業員検便 4 検体 (従業員 2 名でそれぞれ 2 回検便) が当所に搬入され、検査を実施したが、これらの検体からは EHEC O157 を検出することはできなかった。

分離されたすべての菌株は PCR 法で VT2 遺伝子を確認し O157:H-VT2(+) と同定された。これら患者分離株のうち 13 株、初発患者株 1 株および「キュウリの浅漬け」から分離された 2 株の計 16 株について、分離株の解析を行った。

プライマー 2 プライマー 3 プライマー 4
M 1 2 15 16 M 1 2 15 16 M 1 2 15 16 M

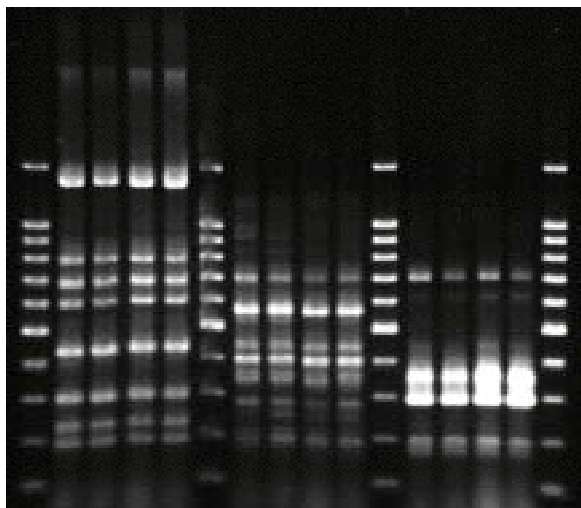


図 4 RAPD 解析

1, 2: 感染者由来菌株
15, 16: キュウリの浅漬け由来菌株
M: 100bp DNA Ladder

薬剤感受性試験 (KB 法) については、すべての菌株で 12 薬剤 (ABPC・KM・GM・SM・TC・CP・TMP・CTX・OFLX・NFLX・NA・FOM) に感受性を示し、生物型別 (Khakhria ,Beutin) ,Plasmid type ,RAPD type(図 4)

および制限酵素 Xba によるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) (図 5) でも同一のパターンを示し、同時に依頼した国立感染症研究所での PFGE 結果も一致していた。

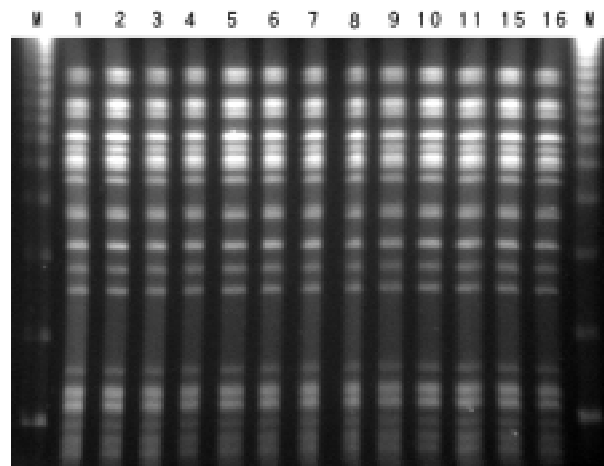


図 5 PFGE 解析 (Xba)

(レーン 15・16 は、キュウリの浅漬け分離株)

これらの菌株のペロ毒素の産生性を RPLA 法にて定量した結果、32,000 倍と一様に高値を示した。我々は 1999 年、市内保育園での EHEC O157(VT2) 集団感染事例 (患者数 25 名) で、初発患者を除き菌陽性者のすべてに下痢等の症状が全くみられず、VT2 の定量値は 2 倍から 128 倍と極めて低い値であった事例を経験している³⁾。

通常、EHEC O157 の産生する VT2 毒素は VT1 に比べて毒素の活性が高く、ペロ毒素産生性の高い O157 では重い下痢や血便、HUS を併発する可能性が高い。2001 年に当所保存株の EHEC についてペロ毒素産生性を調べた結果 VT2 の定量値は最低 2 倍から 20,480 倍、平均値で 5,120 倍 (n = 78) という実験結果を得ている⁴⁾。今回の VT2 定量値が 32,000 倍と一様に高値を示したことが、入院患者 20 名、11 名が溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症、透析治療者 5 名という重篤な健康危機に陥った要因の可能性も否めないと思われた。

7 月初旬、原因究明と再発防止を目的として設置された調査委員会は、防疫・臨床・感染経路の 3 班が組織され、各班それぞれ活動・検討をすすめた。全体会としての総合的な検討会は 3 回開催された。その結果、感染源として 6 月 21 日に園で提供された給食の関連が最も強いことが示唆された。

同時期の 2002 年 6 月以降全国で O157:H-VT2 が広範囲に発生し、千葉・島根でも集団発生事例が発生している旨の情報により、diffuse outbreak の可能性も考えられたが、国立感染症研究所での PFGE においてもそのパタ

ーンの相同性は認められず、いずれの事例においても本事例との疫学的関連性は認められなかった。

2002年、全国で10人以上の集団発生事例は17事例報告されている¹⁾。大半の10事例が保育園等における人-人感染による集団発生であるが食品媒介と推定された事例が本市の事例を含めて3事例報告されている¹⁾。兵庫県等関西地区2府4県の事例は焼き肉チェーン店および食肉センターの保存牛肉から菌が分離され、2001年から頻発しているdiffuse outbreakと考えられる。また、宇都宮市の病院・老人保健施設で9名の死亡者が出た事例では、「香味和え」から菌が分離され、「香味和え」へのEHEC O157添加実験により調理室内の温度が上昇した環境中での食品の取り扱いが菌の増殖を招き、食中毒発生の要因となったと推定された⁵⁾。

本市の事例においても給食に供された「キュウリの浅漬け」からEHEC O157が分離され、患者分離株と「キュウリの浅漬け」から分離された株はPFGE解析で同一のパターンを示した。調査委員会の結論も感染源として6月21日に園で供された給食の関連が最も強いことが示唆され、検査および疫学的調査等の結果から「キュウリの浅漬け」が原因食品と推定された。

調査委員会検討資料として行われたキュウリの漬け物中におけるEHEC O157の消長についての予備実験結果では、生キュウリ(NaClを2%および4%添加)に 10^3 個/gのEHEC O157を添加後25-24時間後の菌数を測定した系では、いずれの塩分濃度においても 10^6 個/g以上の菌数の増殖を示した。しかし、市販の「キュウリの浅漬け」においても同様に測定したところ、 10^3 個/g以下に減少することが確認された。

保健福祉センターの調査によると、今回園に納入された「キュウリの浅漬け」は、本格的に発酵させたものではなく、塩漬けしたキュウりにぬか床をまぶしただけのものであったことが判明した。

もしこの製造業者が製造したキュウリの浅漬けにEHEC O157が付着していたと仮定すると、有意に菌が増殖していく可能性があることが実験結果から推察された。

しかし、浅漬けの製造所から採取された検体のいずれからもEHEC O157は検出されず、浅漬けの製造過程、保育園での保管状況および調理過程のどの行程で汚染されたのか解明することはできなかった。また製造所より出荷された浅漬けのさかのぼり調査においても、その他の購入者からの苦情や医療機関からの届出もなかった。

ただし、保育園としては、「キュウリの浅漬け」は生ものとして取り扱うべきで、本来、加熱、消毒をしていないものは提供してはならないものである。園の給食施設における取り扱いについても、食品衛生上、生もの前日購入、保管、カットから園児が喫食するまでの時間的経過等、細菌汚染および増殖の可能性がいくつか見受けられたことも調査の結果判明している。今後は、「大量調理施設衛生管理マニュアル」に基づき、行政としてマニュアルの指導を徹底し、食中毒予防に最大の注意を払っていく必要があると思われる。

文 献

- 1) 国立感染症研究所厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報，24，6，129～130
- 2) 国立感染症研究所厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報，23，6，137～138
- 3) 真子俊博他：福岡市内保育園で発生した腸管出血性大腸菌(O157)の集団無症感染例，福岡市保健環境研究所報，24，99～103，1999
- 4) 真子俊博他：マイトマイシンCによるEHECのstx産生性，亜テルル酸カリウム感受性，溶血性に関する疫学的検討，福岡市保健環境研究所報，26，82～87，2001
- 5) 国立感染症研究所厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報，23，12，318