

福岡市における腸管出血性大腸菌 O157 感染事例由来株の パルスフィールドゲル電気泳動法による解析 (2004 年度)

尾崎延芳・川内良介・武田昭

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains Isolated from Infection Caused in Fukuoka City by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (2004)

Nobuyoshi OZAKI, Ryousuke KAWAUCHI
and Akira TAKEDA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要旨

O157 を原因とする腸管出血性大腸菌感染症について、PFGE による解析を試みた。その結果、時間的、及び空間的にあまり関連性のない事例において菌の類似性が高かったり、同一家庭内での発生であるにもかかわらず時間的に差があると、同じ菌であっても類似性が減少する等の変化があった。このような状況を鑑み、菌の多様性や変異の実態を把握する為にも全国規模でのパルスネットの構築が急務であると考えられる。

Key Words: 腸管出血性大腸菌 *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), パルスフィールドゲル電気泳動 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

はじめに

腸管出血性大腸菌感染症は、1999 年 4 月から 3 類感染症とされ全数把握の対象疾患となった。その結果、感染症発生動向調査により感染者の報告がなされるようになり患者、及び無症状病原体保有者として毎年 3,000 名前後が報告されている。

材料および方法

1. 供試菌株

2004 年 4 月から 2005 年 1 月の間に、福岡市内で発生した 39 例の O157 感染事例から分離された 46 株を対象とした(表-1)。

2. ベロ毒素(VT)型別

分離菌株は One Shot PCR Typing Kit (TaKaRa) により VT 型別を実施した。

3. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

PFGE は国立感染症研究所のプロトコールに準じた九州ブロックマニュアルを一部変更して実施した。

1) 菌の培養

3mL の TSB に菌を接種し、35 - 37℃, 16 - 18 時間静置培養。

2) 集菌、アガーブロックの作成

培養液 1,000μL を 12,000rpm で 5 分間冷却遠心、上清を除去後、滅菌生理食塩水または PBS1,000μL を加え混和後、12,000rpm で 5 分間冷却遠心 (2 回洗浄)。

上清を除去後、滅菌超純水 500μL を加え懸濁させ、同量の 1.0% Seakem Gold Agarose (CANBREX) in 滅菌超純水と 63℃ 下で混和し、プラグを作成。プラグ

の作成は、サンプルプラグキャスター 0.7mm (BIO-RAD) を使用。

3) ProtienaseK 処理

1mg / mL Protienase K, 1%N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA を含むチューブに移し, 50 , 2h - over night 緩やかに浸漬 (30rpm 程度)。

4) ProtienaseK の不活化・洗浄

アガロースブロックを取り出し、メスやカバークラスを使って泳動時用の大きさにカット。500μL ずつ分注した 1mg (4mM) Pefabloc SC (AEBSF) / mL in TE にブロックを移し, 50 , 20 分以上の浸漬 2 回。

さらに, TE (1mg / sample) にバッファーを変えて, 50 , 20 分以上浸漬洗浄 2 回。

5) 緩衝液による平衡化及び制限酵素による消化

TE バッファーを抜き取り, 制限酵素を含まない制限酵素用のバッファー (200μL / sample) に変え, 37 , 20 分以上浸漬。

制限酵素の入ったバッファー 100μL (Xba , 30unit / sample plug) に変え, 37 , 2h - over night 浸漬。

6) アガロースプラグのコームへの貼り付け

酵素処理の終わったサンプルには, 400μL の 0.5 × TBE バッファー (TE でも可) を加え, 氷冷。

15 穴コームをゲルの作成台において, 先端が gel platform の底に接していることを確認。泳動方向を向いているコームの面を上側にして置き, 順にプラグを貼り付け, 5 - 10 分間乾かす。

プラグを貼り付けたコームをゲル作成台にセットし, 予め 55 - 60 に保温しておいた 1.0% Seakem Gold Agarose in 0.5 × TBE 100ml を流し込む。

7) 泳動

30 - 45 分間アガロースを固化させた後, コームをアガロースから抜き, 泳動槽 (2L の 0.5 × TBE) にブロックを充填したゲルを装着し, 泳動。泳動装置は GenePath System (BIO-RAD) を使用。泳動条件は, 6.0V / cm, 2.2 to 54.2 sec, 19 時間, 14 。

8) 染色・写真撮影

0.3μg / ml の Ethidium bromide 300ml (TBE) で 30 分 (時間厳守) 浸漬・染色 (遮光)。染色後, 蒸留水で浸漬しながら 2 時間洗浄 (10 分 10 分, 20 分, 20 分, 20 分, 20 分, 20 分)。Gel-Doc EQ (BIO-RAD) で撮影し, 8bit・TIFF 形式、圧縮無しで保存。

4. PFGE解析

遺伝子解析用ソフト「Fingerprinting JapaneseEdition」(BIO-RAD) により解析を行った。

類似性係数には Jaccard, デンドログラム計算式は UPGMA を選択した。

実験結果および考察

1. ペロ毒素 (VT) 型別結果

PFGE 解析した菌株 46 株のうち 34 株が VT1&2 産生菌, 12 株が VT2 産生株であった。家族内感染及び同一グループ内感染と推定された事例から分離された菌株は, それぞれの事例内で同一の毒素産生性がみられた。

2. PFGE 解析結果

PFGE の結果, 1 例の集団感染事例と 8 例の家庭内感染事例 (~) では, それぞれの事例内で 80 ~ 100 % の近似度を示した。

(1) 集団感染事例

2004 年 8 月 30 日, 大学の部活仲間と市内の飲食店にて, 鶏刺し, 生レバー等を喫食後, 9 月 10 日に発熱・腹痛・下痢等の症状を呈し 9 月 18 日に O157: VT1&2 が検出された事例である。喫食者及び接触者の検便により, 初発患者と会食した 2 名から同菌が検出された。これら 3 名から分離された菌の PFGE パターンの近似度は 100% を示した (図-1)。

O157 : *表 1 及び図 11 の検体 No.40,41,42

集団感染事例の PFGE パターン (近似度解析)

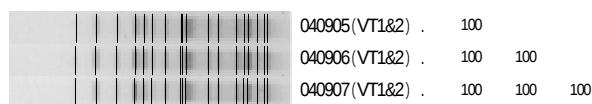


図-1 *表 1 及び図 11 は後に掲載してあります

(2) 家庭内感染事例

初発患者は 1 歳 8 ヶ月の保育園児。2004 年 5 月 27 日より粘血便 (5 回 / 日) を呈し, 5 月 30 日に O157:VT2 検出。接触者検便により父親からも同菌が検出された。2 名の PFGE パターンの近似度 100%。患者等はハンバーグ, 焼き鳥等は喫食しているものの原因は不明 (図-2)。

O157 : 表 1 及び図 11 の検体 No.22,23

家庭内感染事例の PFGE パターン (近似度解析)

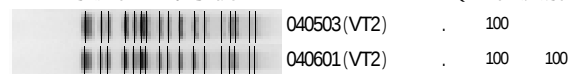


図-2

初発患者は4歳男児。2004年6月24日より下痢・水様（血便）便・腹痛を呈し、6月26日にO157:VT1&2検出。家族検便の結果、父親、母親、弟の3名からも同菌が検出され、計4名の感染が確認された。4名中3名のPFGEパターンの近似度は100%であったが、1名については近似度が88.2%であった。家庭内で焼肉は喫食しているが原因不明（図-3）。

O157：表1及び図11の検体 No.8,9,10,11

家庭内感染事例 の PFGE（近似度解析）

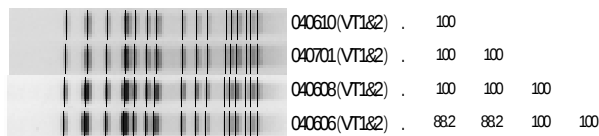


図-3

初発患者は21歳女性。2004年6月29日より腹痛・下痢を呈し、7月1日にO157:VT1&2検出。家族検便の結果、弟からも同菌が検出された。2名のPFGEパターンの近似度100%。原因不明（図-4）。

O157：表1及び図11の検体 No.12,13

家庭内感染事例 の PFGE（近似度解析）

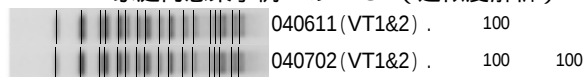


図-4

初発患者は4歳男児。2004年7月20日より腹痛・下痢・血便を呈し、7月23日にO157:VT2検出。調査の結果、患者及び保護者は7月18日及び20日に馬刺を喫食していたことが判明した。馬刺は患者の叔母が熊本県で購入したもので、この叔母及び同居人も同日に馬刺を喫食し、叔母が22日に腹痛・下痢の症状を呈していたことから、患者家族及び叔母とその同居人の検便を実施したところ、父親、叔母、同居人の3名からも同菌が分離された。患者と叔母の共通食は馬刺のみであるが、その後の調査により、叔母と同居人は馬刺喫食前の12日にレバ刺しも喫食していたことが判明した。これら4名のPFGEパターンの近似度は、患者と叔母については100%，同居人及び父親については、それぞれ90.5%，81.8%を示した（図-5）。

O157：表1及び図11の検体 No.17,18,19,20

家庭内感染事例 の PFGE（近似度解析）

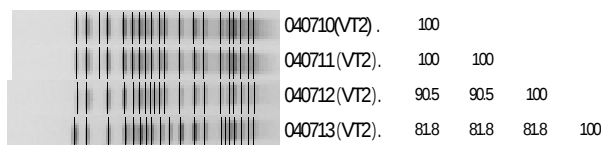


図-5

初発患者は6歳女児。2004年8月6日より腹痛下痢を呈し、8月7日にO157:VT1&2検出。家族検便の結果、父親から同菌が分離された。PFGEパターンの近似度は100%。原因不明（図-6）。

O157：表1及び図11の検体 No.3, 4

家庭内感染事例 の PFGE（近似度解析）



図-6

初発患者は60歳女性。2004年8月26日より下痢・水様便を呈し、8月28日にO157:VT1&2検出。家族検便の結果、夫から同菌が分離された（健康保菌者）。初発患者家族は、市内でミートショップを営む。PFGEパターンの近似度は100%。原因不明（図-7）。

O157：表1及び図11の検体 No.1, 2

家庭内感染事例 の PFGE（近似度解析）

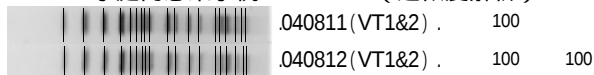


図-7

初発患者は8歳女児。2004年10月5日より腹痛・下痢を呈し、10月6日にO157:VT1&2検出。家族検便の結果、弟より同菌が分離された。同家族で10月1日、市内焼肉店で焼肉喫食。PFGEパターンの近似度は100%。原因不明（図-8）。

O157：表1及び図11の検体 No.37,38

家庭内感染事例 の PFGE（近似度解析）

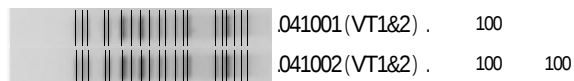


図-8

初発患者は 81 歳女性。2004 年 11 月 21 日より下痢・腹痛・嘔気を呈し、11 月 26 日、O157:VT2 検出。家族検便の結果、息子から同菌が分離された。PFGE パターンの近似度 100%。原因不明（図-9）。

O157：表 1 及び図 11 の検体 No.26,27



図-9

初発患者は 3 歳男児。7 月 26 日に腹痛・下痢を呈し、7 月 29 日、O157:VT1&2 検出。家族検便の結果、全員陰性であったが約 1 ヶ月後の 8 月下旬に兄が発症し同菌が検出された（図-10）。

O157：表 1 及び図 11 の検体 No.32,34

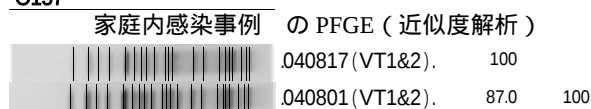


図-10

2004 年度に発生した O157 事例 39 件中 46 株についてデンドログラムを作成した（図-11）。

同一の感染事例と思われる事例間ではそれぞれの事例で近似度 80 ~ 100%を示したが（図-1 ~ 9）、散発例と思われる事例から分離された菌株と集団感染事例及び家庭内感染事例と思われる菌株間及び散発事例の菌株間でも近似度 80 ~ 100%を示した菌株もみられた。

菌株 No. 1, 2, 3, 4, 5 は、No.1, 2 が同一家庭内感染事例で No.3, 4 は別の家庭内感染事例、No.5 は散発事例である。No.3, 4, 5 は近似度が 100%を示し、No.1, 2 と No.3, 4, 5 ではバンド数で 2 本違い、近似度は 90%を示した。発生時期は同時期であるものの、居住区は異なっており共通する食材等も見受けられなかった。

菌株 NO.16 ~ 19 は患者及び保護者は馬刺を喫食していた。馬刺は患者の叔母が熊本県で購入したもので、この叔母及び同居人も同日に馬刺を喫食し、叔母も腹痛・下痢の症状を呈していたことから、患者家族及び叔母とその同居人の検便を実施したところ、父親、叔母、同居人の 3 名からも同菌が分離された。患者と叔母の共通食は馬刺のみであるが、その後の調査により、叔母と同居人は馬刺喫食前の 12 日にレバ刺しも喫食していたことが判明した。菌株 NO.17（初発患者）と No.18（叔母）は近似度が 100%、No.17, 18 と No.19（叔母の同居人）ではバンド数で 1 本、近似度は 95%を示し、No.16（初発患者の父親）とはバンド数で 2 本、近似度は 85.7%を示した。しかも、No.16 と散発事例である NO.15 がバ

ンド数で 1 本、近似度 95%を示し近縁関係にあることが明らかになった。菌株 NO.15 は NO.16 ~ 19 の発症 2 週間前に発症しているが NO.16 ~ 19 とは居住区も異なり、発症前 3 ~ 7 日前に自宅で牛レバニラ炒め、鶏レバーは喫食しているものの馬刺は喫食していなかった。しかし、国立感染症研究所における PFGE 解析の結果では、菌株 NO.15 と NO.16 は大分県の馬刺関連株と同一パターンを示していた。

菌株 NO.26, 27, 28 でも近似度 100%を示した。No.26 と No.27 は同一家庭内感染事例であるが No.28 は散発事例由来株である。これらの事例は発生時期は近いものの、居住区も異なっており共通食も見受けられなかった。

菌株 NO.30, NO.31 はいずれも散発事例であるが、バンド数の違いは 2 本、近似度で 89.5%を示した。これらの発生時期は約 2 ヶ月の差があり、居住区も異なり共通食も見いだすことはできなかった。

菌株 NO.32 ~ 35 で近似度 82.4 ~ 95.9%を示した。No.32 と No.34 は兄弟である。初発は NO.32（弟）で当初の家族検便においては初発患者以外は陰性を呈していたが、1 ヶ月後に NO.34（兄）が発症した事例である。No.32 と No.34 はバンド数で 1 本、近似度は 87%であり、何らかの要因で 1 ヶ月後に兄が発症したものと考えられる。No.32 と No.33 についてはバンド数の違いが 1 本、近似度で 95.5%を示しているが、居住区も異なり、発生時期も 1 ヶ月の差があり共通食もなかった。また、菌株 NO.35 もこれらの菌株間とバンド数で 3 ~ 4 本の違い、近似度で 82.4%を示したが居住区も異なり発生時期は約 4 ヶ月の差があり、共通食も見受けられなかった。

菌株 NO.40 ~ 42 は、市内の飲食店で鶏レバー、牛レバー刺し、馬刺し等を喫食したグループ 3 名から分離された菌株で近似度は 100%を示しているが、これらの菌株と菌株 NO.43 がバンド数の違いが 2 本、近似度で 86.3%を示した。No.40 ~ 42 と NO.43 の発生時期は約 2 週間の差であるが居住区は異なっている。しかし、No.43 はバーベキュー、馬刺しを喫食しており肉類の流過程において共通していた可能性も否めないとされた。

ま と め

2004 年度に発生した O157 事例に於いて、検出された 46 の菌株について状況を概説した。一般的に EHEC を原因とする事例が発生した場合は、菌の確定が先であるために原因食の究明にまで至らないのが通常である。しかし一部では全く異なった事例から原因施設、および原因菌が特定されたケースも見られる¹⁾²⁾。このような事例の際に非常に重要視されるのが PFGE という検査法であ

と考える。ここ数年来、全国的に EHEC を原因とする散在的集団発生(Diffuse Outbreak)の報告が為されており³⁾、PFGE の有用性は衆目の一致する所である⁴⁾。このような状況下において、日本全国の地方衛生研究所を結ぶPFGEネットワーク(パルスネット)が一日でも早く構築されることを期待する。

文 献

- 1) 甲斐 明美：ベロ毒素産生性大腸菌 O157 による食中毒の多発，東京都微生物検査情報,第 17 巻,5 号
- 2) 甲斐 明美：焼肉店を原因とした腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事例について，東京都微生物検査情報,第 17 巻,11 号
- 3) 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
- 4) 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

表-1 解析の対象とした分離菌の VT 型別と発生状況：検体 No. 及び菌株 No. は図 11 と同じ

No.	菌株 No.	発生時期	ベロ毒素産生性		発生状況
			VT1	VT2	
1	040811	2004.8	+	+	家庭内
2	040812	2004.8	+	+	家庭内
3	040804	2004.8	+	+	家庭内
4	040805	2004.8	+	+	家庭内
5	040808	2004.8	+	+	散発
6	040809	2004.8	+	+	散発
7	040810	2004.8	+	+	散発
8	040610	2004.6	+	+	家庭内
9	040701	2004.6	+	+	家庭内
10	040608	2004.6	+	+	家庭内

11	040606	2004.6	+	+	家庭内
12	040611	2004.6	+	+	家庭内
13	040702	2004.6	+	+	家庭内
14	040708	2004.7	+	+	散発
15	040704	2004.7	-	+	散発
16	040713	2004.7	-	+	家庭内
17	040710	2004.7	-	+	家庭内
18	040711	2004.7	-	+	家庭内
19	040712	2004.7	-	+	家庭内
20	040703	2004.7	-	+	散発

21	040603	2004.6	-	+	散発
22	040503	2004.5	-	+	家族内
23	040601	2004.5	-	+	家庭内
24	040402	2004.4	-	+	散発
25	040709	2004.7	-	+	散発
26	041103	2004.11	+	+	家庭内
27	041104	2004.11	+	+	家庭内
28	041106	2004.11	+	+	散発
29	040802	2004.8	+	+	散発
30	040803	2004.8	+	+	散発

31	041004	2004.10	+	+	散発
32	040801	2004.8	+	+	家庭内？
33	040909	2004.9	+	+	散発
34	040817	2004.8	+	+	家庭内？
35	041201	2004.12	+	+	散発
36	041005	2004.10	+	+	散発
37	041001	2004.10	+	+	家庭内
38	041002	2004.10	+	+	家庭内
39	040605	2004.6	+	+	散発
40	040905	2004.9	+	+	集団

41	040906	2004.9	+	+	集団
42	040907	2004.9	+	+	集団
43	040818	2004.8	+	+	散発
44	040816	2004.8	-	+	散発
45	040901	2004.9	+	+	散発
46	040814	2004.8	+	+	散発

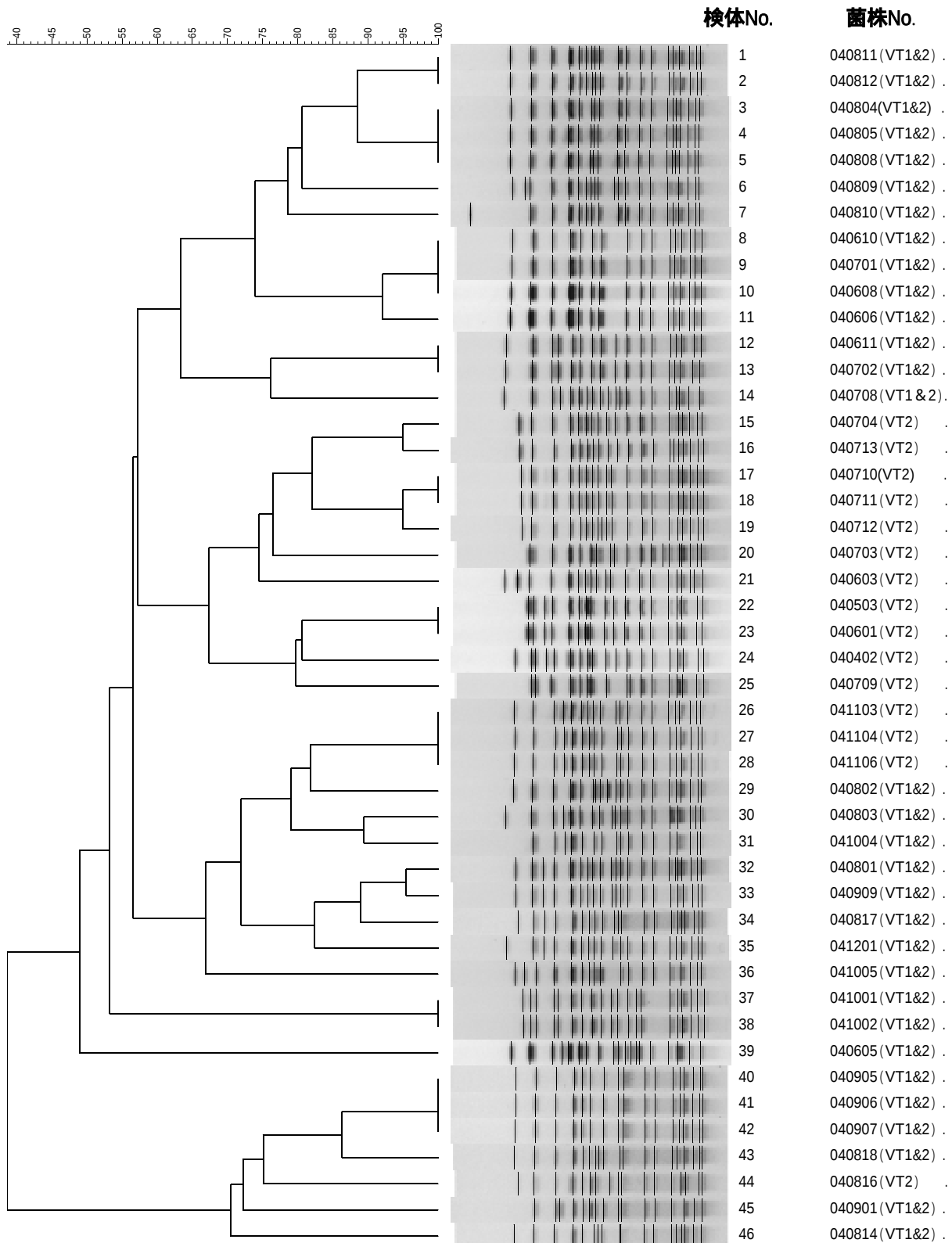


図 11：平成 16 年度に発生した O157 事例 39 件中 46 株についてのデンドログラム