

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 (2005 年度)

川内良介・真子俊博・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 (2005)

Ryousuke KAWAUCHI Toshihiro MAKO
and Akira TAKEDA

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

要約

昨年に引き続き、O157 を原因とする腸管出血性大腸菌感染症について、パルスフィールドゲル電気泳動による解析を試みた。昨年と同様、同一家庭内で発生した場合等においては、菌の類似値は非常に高くなった。今年度の事例において目に着いたのは、健康保菌者(carrier)の増加で、親から子へと考えられる事例が多くなっている。同様に食品取り扱いの業者等で実施されている定期検便においても保菌者が検出され EHEC キャリア増加の兆しが伺える。手洗いの励行等、基本的な衛生概念の普及を今一度喚起する必要があると思われる。

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), 健康保菌者(carrier)

はじめに

福岡市における平成 17 年度発生の腸管出血性大腸菌感染症は、46 事例で感染者は 58 名であった。菌種の内訳は O157 によるものが 31 事例で、感染者 38 名と圧倒的に多数を占めている。そこで今年度も昨年に引き続き O157 を原因とする事例について、PFGE による解析を実施した。なお今回は、近親者からの感染が強く疑われた O26 を原因とする家庭内感染事例も 2 例紹介している。

材料および方法

1. 供試菌株

2005 年 4 月から 2006 年 1 月の間に、福岡市内で発生した 31 例の O157 感染事例から分離された 38 株を対象とした(表-1)。

2. ペロ毒素(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 づつ分注した 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)。Gel-Doc EQ (BIO-RAD) で撮影し, 8bit・TIFF 形式, 圧縮無しで保存。

4. P F G E 解析

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

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

実験結果と考察

1. ペロ毒素 (VT) 型別結果

PFGE 解析した O157 菌株 38 株のうち VT1&2 産生株は 29 株, 残りの 9 株は VT2 産生株であり, VT1 産生株は無かった。通常 O157 による感染事例の場合, O26 や O111 を原因とする事例とは異なり, VT1 のみ産生株が検出されるのは希である。また疫学的見地からみると, 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 5 例の家庭内感染事例 (~) , 及び O157 以外での家庭内感染事例 (~) において, それぞれの事例内で 90 ~ 95 % 以上の類似度を示した。

(1) 集団感染事例

2005 年 6 月 27 日, 市内保健所より同保健所担当地区の養護学校に通学する生徒より O157, VT1&2 検出の報告があった。初発患者の年齢は 6 歳, 発症日は 6 月 24 日であったが, 発症の 3 日前にプール遊びが実施されており, 用心のため学校関係者全員の検便を実施することとなった。総数 485 名の検便を行った結果, 同じ学年の児童より O157 が検出された。毒素の型は同じ VT1&2 で初発患者との類似度は 82% を示した。初発患者の原因食は不明。(図-1)。

集団感染事例

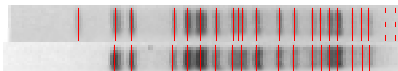
O157 etc PFGE	No	菌株番号
	14	20050605
	15	20050608

図 1 (図中の No, 菌株番号は後述の図 9 と同じ)

(2) 家庭内感染事例：O157 を原因菌とする症例

初発患者は 7 歳女児となっているが, この女児に先立って 10 歳の兄が腹痛で入院している。保健所への届け出では 7 歳妹が先になっているが, 実際の初発患者は兄の方であると考えられる。毒素型は VT1&2, 2 人の菌の類似度 97% であり, 兄→妹の感染様式が推測される。発症の原因食は不明。(図-2)

O157 etc PFGE 家庭内感染事例

No	菌株番号
21	20051201
22	20051203

図 2

初発患者は2歳男児。接触者検便として同居の家族3名を実施したところ、2名(母親と兄)から初発患者と同じO157,VT2が検出された。兄弟同士(20051103及び20051106)での菌の類似度は100%であり母親(20051105)との類似度は95%であった。(図-3)

O157 etc PFGE 家庭内感染事例

No	菌株番号
25	20051103
26	20051106
27	20051105

図 3

調理員の定期検便により検出された事例。接触者検便として、同居の家族3名を実施。次男(16歳)より同じ菌型と毒素型であるO157,VT2が検出された。2つの菌の類似度は96%であった。特筆すべきは、菌の保有者は両名とも健康保菌者であること。(図-4)

O157 etc PFGE 家庭内感染事例

No	菌株番号
35	20050904
36	20050905

図 4

初発患者は8歳女児。接触者検便としては母親のみであったが、母親から同じ菌型と毒素型であるO157,VT2が検出された。喫食調査では原因食となる食物は見られなかった。2名の菌の類似度は97%であった。(図-5)

O157 etc PFGE 家庭内感染事例

No	菌株番号
16	20050403
17	20050404

図 5

初発患者は20歳女性。接触者検便で家族2名を実施したところ25歳の兄より同型及び毒素を持つ菌が検出された。2つの菌の類似度は90%である。なお、この症例は後述のデンドログラムでは示されていない。(図-6)

O157 etc PFGE 家庭内感染事例

No	菌株番号
1	20050708
33	20050801

図 6

(3)家庭内感染事例：O157以外の型による

(後述のデンドログラムには掲載無し)

初発患者は3歳男児。接触者検便として患児の血縁関係者6名を実施した。その結果祖父母から同型の菌と毒素が検出された。菌型はO26,毒素はVT1,2であった。

祖父母、及び患児とのPFGEによる類似度は、祖父(20050506)と患児(20050505)で100%であり、患児と祖母(20050507)では95%であった。(図-7)

O157 etc PFGE O157以外の家庭内感染事例

菌株番号
20050505
20050506
20050507

図 7

初発患者は6歳男児。接触者検便として患児の家族等を実施。その結果母親及び3歳の弟から同型の菌、毒素が検出された。菌型はO26,毒素はVT1,2であった。又、患児(20050510)と弟(20050512)の類似度は92%,母親(20050511)とは91%であった。(図-8)

O157 etc PFGE O157以外の家庭内感染事例

菌株番号
20050510
20050512
20050511

図 8

ま と め

平成17年度に福岡市内で発生したO157によるEHEC感染症のデンドログラムを図-9に掲示している。昨年度と比較すると事例数、検出された菌株数共に減少しているが、今年度は健康保菌者(carrier)が原因ではないかと考えられる症例が増加している。平成17年度における家庭内感染事例をみると、以外の事例については全ての事例において同居の家族又は同居していない近親者等にcarrierが存在している。勿論食物からの感染を完全に否定することは出来ないが、初発患者の喫食調査等をもみても、感染が疑われる食品を摂取している事実はなく、何よりもPFGEによる解析で、検出された菌の類似度が90%以上を示すことよりcarrierからの感染を疑うことが出来る¹⁾。carrierからの感染予防としては基本である手洗いの励行等を今一度徹底する必要があると考える²⁾。

文 献

- 1)牛由来大腸菌O157:H7に関する分子疫学的研究
(秋庭正人：畜産の研究，54，1065-1072，2000)
- 2)厚生労働省ホームページ：O-157 Q & A
(<http://www.mhlw.go.jp/qa/index.html>)

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 9 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	20050708	2005.7	+	+	家庭内
2	20050709	2005.7	-	+	散発
3	20050702	2005.7	+	+	散発
4	20050301	2005.3	+	+	散発
5	20050707	2005.7	+	+	散発
6	20050606	2005.6	+	+	家庭内
7	20050706	2005.7	-	+	散発
8	20050508	2005.8	+	+	散発
9	20051003	2005.10	+	+	散発
10	20050601	2005.6	+	+	散発

11	20050501	2005.5	+	+	散発
12	20050602	2005.6	+	+	散発
13	20050704	2005.7	+	+	散発
14	20050605	2005.6	+	+	集団
15	20050608	2005.6	+	+	集団
16	20050403	2005.4	-	+	家庭内
17	20050404	2005.4	-	+	家庭内
18	20050607	2005.6	+	+	家庭内
19	20050502	2005.5	-	+	散発
20	20050705	2005.7	-	+	散発

21	20051201	2005.12	+	+	家庭内
22	20051203	2005.12	+	+	家族内
23	20050803	2005.8	+	+	散発
24	20051107	2005.11	+	+	散発
25	20051103	2005.11	-	+	家庭内
26	20051106	2005.11	-	+	家庭内
27	20051105	2005.11	-	+	家庭内
28	20050802	2005.8	+	+	散発
29	20051102	2005.11	+	+	散発
30	20051101	2005.11	+	+	散発

31	20050901	2005.9	+	+	散発
32	20051108	2005.11	+	+	散発
33	20050801	2005.8	+	+	家庭内
34	20050902	2005.9	+	+	散発
35	20050904	2005.9	-	+	家庭内
36	20050905	2005.9	-	+	家庭内
37	20051202	2005.12	-	+	散発
38	20050806	2005.8	-	+	散発

図 9：平成 17 年度に発生した O157 事例 31 件中 38 株についてのデンドログラム

