

〔資料〕

2007～2015年に石川県で分離された腸管出血性大腸菌について — O26, O111の発生状況及び細菌学的性状 —

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 北川 恵美子・小坂 恵・加藤 真美
木村 恵梨子・崎田 敏晴

〔和文要旨〕

2007～2015年に石川県で分離された腸管出血性大腸菌O26, O111の発生状況及び細菌学的性状を調べた。その結果、O26については、2012年以降はそれ以前に比べて報告数が半分程度に減少していた。O111については、2009年及び2011年に集団発生等による一時的な増加がみられたが、その他の年では発生数が少ないために傾向をみることはできなかった。年齢階級別では、10歳未満の報告数が一番多く、保育園等での集団発生が大きな要因であった。*stx*サブタイプ型別では、*stx1*のサブタイプは全て*stx1a*で、*stx2*のサブタイプは全て*stx2a*であった。薬剤耐性については、治療に用いられることの多いホスホマイシンに対する耐性株がO26で1株検出された。またO111において、プラスミド性の可能性のあるAmpC β-ラクタマーゼ産生菌が検出された。EHECにおいても臨床問題となる薬剤耐性遺伝子が伝播している可能性が示唆されたことから、今後も薬剤耐性の動向に注視する必要があると考えられた。

キーワード：腸管出血性大腸菌, O26, O111, 薬剤感受性

1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: 以下, EHEC) 感染症は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (以下, 感染症法) において三類感染症であり、診断した医師は全数届出する義務がある。本感染症は無症状から腹痛, 下痢, 出血性大腸炎 (血便) さらには溶血性尿毒症候群 (Hemolytic Uremic Syndrome: 以下HUS) などの合併症によって死に至るものまで様々な臨床症状を呈する¹⁾。

石川県 (以下, 当県) においては、毎年、本菌による感染者が報告されており、我々は、前報において、EHEC感染症の中で分離頻度が高いEHEC O157 (以下, O157) の発生状況及び細菌学的性状について報告した²⁾。

今回、O157に次いで分離頻度の高いEHEC O26 (以下, O26), EHEC O111 (以下, O111) について、2007～2015年までの発生状況及び細菌学的性状の動向を調べたので報告する。

2 材料と方法

2・1 EHEC感染症の発生状況

2007年1月～2015年12月までの9年間に感染症法に基づき当県に届出されたEHEC感染者の関連情報等について集計を行った。感染者の報告数, O血清群, 年齢等の属性は、感染症発生動向調査システムに報告された情報により把握した。

(1) 集団発生事例

感染症発生動向調査システムに報告された情報及び県薬事衛生課より提供された情報により把握した。

(2) O血清群別EHEC感染者報告数

発生年毎にO血清群に分けて集計を行った。

(3) 年齢階級別O26, O111感染者報告数

O26及びO111発生例について年齢階級別 (0～9歳から80歳以上まで10歳刻み) に分けて集計を行った。

2・2 EHEC O26, O111の細菌学的性状

O26, O111感染者のうち、1事例1人 (初発者) から

Recent Situation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 Detected in Ishikawa Prefecture.
by KITAGAWA Emiko, KOSAKA Megumi, KATOH Mami, KIMURA Eriko and SAKIDA Toshiharu
(Health and Food Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, O26, O111, Antimicrobial Susceptibility

分離されたEHEC O26の41株, O111の8株を使用し, 以下の細菌学的性状を調べた。

(1) *stx* サブタイプ

デンマーク国立血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) の方法³⁾に従い実施した。

(2) 病原遺伝子

対象とした病原遺伝子は, 腸管付着因子 (*eae*, *aggR*) 凝集付着性大腸菌耐熱性毒素 (*astA*) の3種類である。国立感染症研究所感染症情報センター第5室の検査方法⁴⁾に従いマルチプレックスPCRで検出した。

(3) 薬剤耐性関連検査

ア 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準化協会 (Clinical and Laboratory Standard Institute) 第24版の実施基準⁵⁾に従い, 12薬剤についてKirby-Bauer法で試験し判定した。供試薬剤は, アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), セフトジジム (CAZ), カナマイシン (KM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), ホスホマイシン (FOM), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), スルフィソキサゾル・トリメトプリム合剤 (ST), ストレプトマイシン (SM), メロペネム (MEPM) である。FOM以外の11薬剤については, センシディスク (バクtonデッキンソン: BD) を用いた⁶⁾。FOMについては, CLSIの実施基準にあるFOM200 μ gにグルコース-6-リン酸 (G6P) 50 μ gを含有するディスクの市販品がなかったため, 滅菌蒸留水で溶解した20mg/mLのFOM (和光純薬) と5mg/mLのG6P溶液 (Sigma) を直径6mmの抗生物質検定用ディスク (アドバンテック) に各々10 μ L滴下し, 自家調製した。

イ FOM不活化酵素 (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ, 以下GST) 産生菌の検出

上記2・2(3)アの結果, FOMに耐性であった株について, Nakamuraら⁷⁾の方法に従い, ホスホノギ酸 (GST

阻害剤) (Sigma) 含有ディスクによるGST産生試験を実施した。

ウ β -ラクタマーゼ産生菌関連試験

上記2・2(3)アの結果, CTX及びCAZに耐性であった株については, 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 及びAmpC β -ラクタマーゼ産生菌を疑い, 以下の試験を追加した。

(ア) ディスク拡散法による β -ラクタマーゼ産生試験

クラブラン酸, スルバクタム含有ディスク (BD) によるESBL産生試験及びボロン酸 (東京化成) 含有ディスクによるAmpC β -ラクタマーゼ産生試験を実施した。実施方法は国立感染症研究所細菌第二部の方法⁸⁾に従った。

(イ) PCR法による β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

上記(ア)の結果, ボロン酸含有ディスクによるAmpC β -ラクタマーゼ産生試験が陽性であった株について, Pérez-Pérezら⁹⁾の報告したPCR法により, AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子 (MOX型, CIT型, DHA型, ACC型, EBC型, FOX型) の検出を行った。

(ウ) *bla*_{CMY-2}遺伝子の塩基配列の決定

上記(イ)の結果, β -ラクタマーゼ遺伝子のCIT型が陽性となった株について, 檜尾ら¹⁰⁾の*bla*_{CMY-2}遺伝子のORF全長を増幅するプライマーを用いてPCRにより増幅されたDNA断片を精製した後, ダイレクトシーケンスにより増幅断片のDNAシーケンスを決定し, BLAST検索を行い, *bla*_{CMY-2}遺伝子と一致するかを確認した。

3 結果および考察

3・1 EHEC感染症の発生状況

(1) 集団発生事例

2007~2015年に県内で発生した集団発生事例を表1に示す。この間の集団発生事例は13件で, そのうち7件はO157, 5件はO26, 1件はO111によるものであった。

表1 EHECによる食中毒及び感染症集団発生事例

発生年*1	O血清群	感染者数*2	原因食品	原因施設	分類
2007年	O157	2	牛レバー刺し (推定)	飲食店 (焼肉屋)	食中毒
	O157	1	牛レバー刺し (推定)	飲食店 (焼肉屋)	食中毒
	O157	10	不明	飲食店 (焼肉屋)	食中毒
	O26	9	-	幼稚園	感染症
2008年	O157	9	不明	飲食店 (焼肉屋)	食中毒
	O26	11	-	保育園	感染症
2009年	O26	11	-	保育園	感染症
	O26	5	-	保育園	感染症
2011年	O26	1	千切りキャベツ	野菜加工施設	食中毒
	O157	18	大根おろし大葉	老健施設 (給食)	食中毒
	O26	3	不明	飲食店 (給食)	食中毒
	O111	11	-	保育園	感染症
2013年	O157	2	不明	飲食店 (焼肉屋)	食中毒
	O157	2	不明	飲食店 (焼肉屋)	食中毒

*1: 2010年, 2012年, 2014年, 2015年の発生はなし

*2: 患者及び無症状病原体保有者の人数 (石川県在住者)

そのうちO26の3件とO111の1件は乳幼児施設内の感染症事例（ヒト→ヒト感染）であった。EHECは微量の菌でも感染が成立するため、ヒトからヒトの経路で感染が拡大しやすい。全国においても毎年保育園での集団感染症が多く発生している^{11)~13)}。石川県においては、2012年以降発生していないが、今後も予防のための手洗いの励行、施設内の衛生管理の指導教育¹⁴⁾が重要と考える。

(2) O血清群別EHEC感染者報告数

2007~2015年に感染症発生動向調査により報告されたEHEC感染者の報告数をO血清群に分けて集計した結果を図1に示す。前報のとおり、O157の報告数はEHEC報告数の減少とともに減少していた²⁾。O26については、2012年以降は2011年以前に比べて報告数が半分程度に減少していた。O111については、2009年に7人、2011年に集団発生による11人の報告がみられたが、その他の年

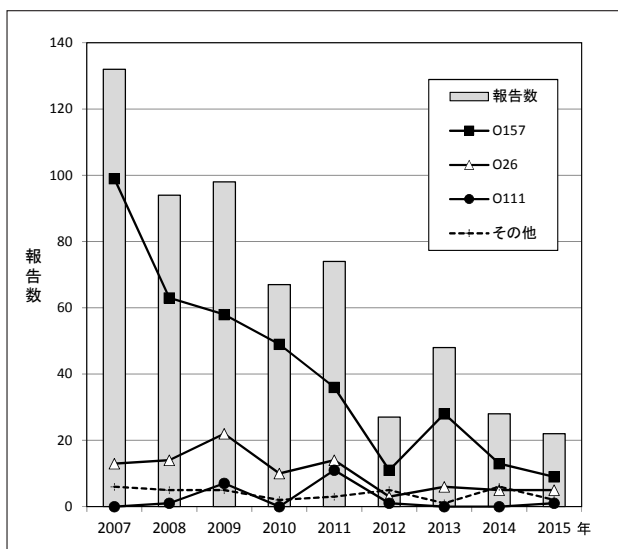


図1 O血清群別EHEC感染者報告数

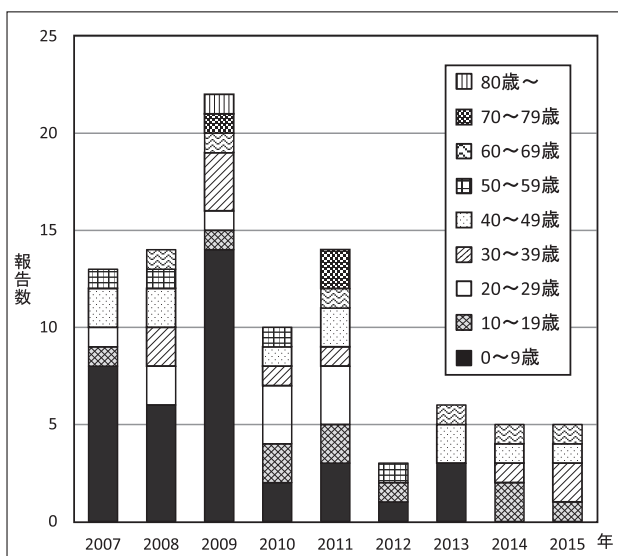


図2 年齢階級別EHEC O26感染者報告数

では発生数が少ない（0~1人）ために傾向をみることはできなかった。

(3) 年齢階級別O26, O111感染者報告数

O26, O111の感染者の報告数を年齢階級別に集計した結果を図2, 3に示す。O26, O111ともに、10歳未満の報告数が一番多く、幼稚園、保育園での集団発生が大きな要因であった。

3・2 EHEC O26, O111の細菌学的性状

(1) stxサブタイプ

O26の41株についてstxサブタイプ型別を実施した結果、stx1aが40株、stx1a+stx2aが1株であった。O111の8株についてはstx1aが6株、stx1a+stx2aが2株であった。stx1のサブタイプは全てstx1aで、stx2のサブタイプは全てstx2aであった。前報のとおりO157のstx1サブタイプは、O26, O111同様に全てstx1aであった。一方、O157のstx2サブタイプはstx2a, stx2a+stx2c, stx2cの3パターンに型別された²⁾のに対して、O26, O111はstx2aの1パターンであった。

(2) 病原遺伝子

O26の41株、O111の8株について、3種類の腸管附着等に関与する遺伝子 (eae, aggR, astA) の保有について調べた結果、eaeは全ての菌株が、astAはO26の8株(2011~2015年分離株)が保有していた。そのうち3株は集団発生事例の株であった。aggRは全ての菌株が保有していなかった。

(3) 薬剤耐性関連試験

O26の41株について、12剤の薬剤感受性試験を実施した結果を表2に示す。31株が全ての薬剤に感受性を示し、10株がいずれかの薬剤に耐性または中間(低感受性)を示した(耐性率:24%)。耐性株は2008年から2011年にかけて複数みられたが、2012年以降はみられなかった。

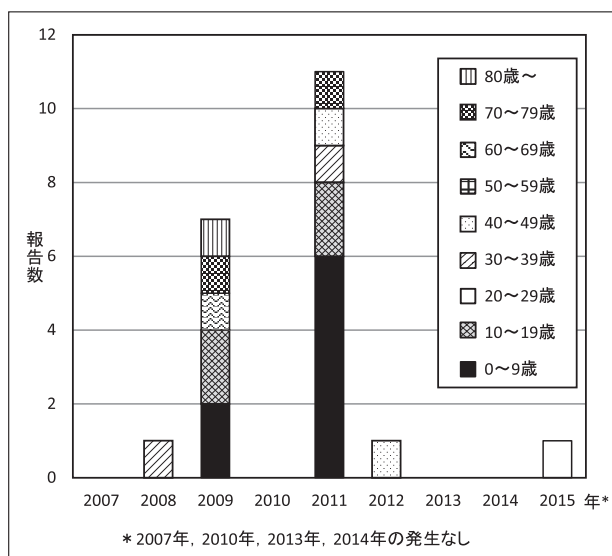


図3 年齢階級別EHEC O111感染者報告数

表2 EHEC O26 年別薬剤耐性株数

耐性薬剤名	年										計
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015		
6剤 ABPC, KM, TC, CP, ST, SM		1									1
4剤 ABPC, KM, TC, SM			1								1
4剤 ABPC, CP, ST, SM					1						1
3剤 ABPC, ST, SM			1*								1*
2剤 ABPC, SM					1						1
1剤 ABPC				2							2
1剤 FOM					1						1
1剤 NA					1						1
1剤 SM		1									1
なし	3	2	4	4	2	3	4	4	5		31

* SMが中間（低感受性）と判定された株

FOM耐性の1株については、FOM不活化酵素（GST）産生を疑い、さらにホスホノギ酸（GST阻害剤）含有ディスクによるGST産生試験を実施した。その結果、ホスホノギ酸による阻害が認められなかったことから、GST産生による耐性ではなく、それ以外の機序¹⁵⁾によるものと思われた。一方、薬剤感受性試験の実施時にFOM耐性変異株が出現しやすいという報告¹⁵⁾もあり、今回の株は耐性変異株である可能性も考えられた。FOMはEHEC感染症の治療に用いられることが多く、なかでも感染者の菌陰性化が難しい事例では特にFOM耐性の有無が議論になることから、引き続きFOMに対する耐性機構及び解析方法の新しい知見に留意していきたい。

O111の8株について、12剤の薬剤感受性試験を実施した結果を表3に示す。6株が全ての薬剤に感受性を示し、2株がいずれかの薬剤に耐性を示した（耐性率：25%）。このうち8剤に耐性を示した1株については、CTX及びCAZに耐性であったことから、β-ラクタマーゼ産生菌を疑い、ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生試験を行った。その結果、クラブラン酸、スルバクタム含有ディスクによる阻害は認められなかったが、ボロン酸含有ディスクによる阻害が認められたため、AmpC β-ラクタマーゼ産生菌と判定した。次に、PCR法でAmpC β-ラクタマーゼ遺伝子の検出を行った結果、CIT型が陽性となった。さらに、*bla*_{CMY-2}遺伝子のORF部分について、塩基配列を決定したところ、*bla*_{CMY-2}の塩基配列と100%一致した。

AmpC β-ラクタマーゼは、ペニシリン系薬とセファロスポリン系薬を加水分解する酵素であり、コードする遺伝子の所在から染色体性とプラスミド性のものがある¹⁶⁾。プラスミド性AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子は染色体上に存在する遺伝子がプラスミドに転移したと考えられており、*C. freundii*由来のCIT型、*M. morgani*由来のDHA型、*H. alvei*由来のACC型、*Enterobacter*属由来のEBC型及び*Aeromonas*属由来のMOX型とFOX型の6種類が報告されている^{9) 17)}。今回検出されたAmpC β-ラクタマーゼ遺伝子はCIT型の*bla*_{CMY-2}であったことから、プラスミド性の遺伝子である可能性が考えられる。プラスミド性のAmpC β-ラクタマーゼ遺伝子は染色体性のものに比べ、菌株、菌種間を超えて伝播しやすく、今回検出された菌株も他の*E. coli*菌株または他の菌種から*bla*_{CMY-2}遺伝子を獲得したと考えられる。AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子のうち*bla*_{CMY-2}については、臨床における分離頻度が高いとされる^{10) 18)}ことから、今後もEHECにおける薬剤耐性の動向に注視する必要があると考えられた。

4 ま と め

(1) 2007～2015年に石川県で分離された腸管出血性大腸菌O26、O111の発生状況及び細菌学的性状を調べた結果、O26については、2012年以降はそれ以前に比べて報告数が半分程度に減少していた。O111については、2009年及び2011年に集団発生等による一時的な増加が

表3 EHEC O111 年別薬剤耐性株数

耐性薬剤名	年*					計
	2008	2009	2011	2012	2015	
8剤 ABPC, CTX, CAZ, KM, TC, CP, ST, SM					1	1
4剤 ABPC, KM, TC, SM				1		1
なし	1	4	1			6

* 2007年、2010年、2013年、2014年の発生なし

みられたが、その他の年では発生数が少ないために傾向をみることはできなかった。年齢階級別では、10歳未満の報告数が一番多く、保育園等での集団発生が大きな要因であった。

- (2) *stx*サブタイプ型別では、*stx1*のサブタイプは全て*stx1a*で、*stx2*のサブタイプは全て*stx2a*であった。
- (3) 薬剤耐性については、治療に用いられることの多いFOM耐性株がO26で1株検出された。またO111において、プラスミド性の可能性があるAmpC β -ラクタマーゼ産生菌が検出された。EHECにおいても臨床問題となる薬剤耐性遺伝子が伝播している可能性が示唆されたことから、今後も薬剤耐性の動向に注視する必要があると考えられた。

本研究を実施するにあたり、EHEC菌株の分与に御協力いただきました医療機関、登録衛生検査所、保健所等各位に深謝いたします。また、薬剤耐性菌について御教示いただいた国立感染症研究所細菌第二部の松井先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 中西寿男, 丸山務: 食品由来感染症と食品微生物, 144-146, 中央法規出版 (2009)
- 2) 北川恵美子, 小坂恵, 加藤真美, 川上慶子: 2007~2014年に石川県で分離された腸管出血性大腸菌について—O157の発生状況及び細菌学的性状—, 石川県保健環境センター研究報告書, **52**, 49-53 (2015)
- 3) SCHEUTZ Flemming, Teel Louise D., BEUTIN Lothar, PIÉRDARD Denis, BUVENS Glenn, KARCH Helge, MELLMANN Alexander, Caprioli Alfred, TOZZOLI Rosangela, MORBITO Stefano, STROCKBINE Nancy A., MELTON-CELSA Angela R., SANCHEZ Maria, PERSON Soren and O'BRIEN Alison D.: Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxin and Standardizing Stx Nomenclature, *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 2951-2963 (2012)
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター第5室 (国立保健医療科学院併任 伊藤健一郎): 平成24年度新興・再興感染症技術研修 遺伝子検査法, 8-12 (2012)
- 5) 日本臨床微生物学会国際委員会: 日本語版「抗菌薬感受性検査のための標準法—第24版 (M100-S24), 41-49 (2014)
- 6) バクtonデッキンソン: センシディスク添付文書, 2013年9月 (第4版)
- 7) NAKAMURA Genki, WACHINO Jun-ichi, SATO Natsumi, KIMURA Kouji, YAMADA Keiko, JIN Wanchun, SHIBAYAMA Keigo, YAGI Tetsuya, KAWAMURA Kumiko and ARAKAWA Yoshichika: Practical Agar-Based Disk Potention Test for Detection of Fosfomycin-Nonsusceptible *Escherichia coli* Clinical Isolates Producing Glutathione S-Transferases, *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 3175-3179 (2014)
- 8) 国立感染症研究所細菌第二部第1室: 平成27年度薬剤耐性菌研修会資料, 1-10 (2014)
- 9) PÉREZ-PÉREZ F. Javier and HANSON Nancy D.: Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases genes in clinical isolated by using multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 2153-2162 (2002)
- 10) 樫尾拓子, 熊谷優子, 今野貴之, 高橋志保, 和田恵理子, 八柳潤: 秋田県内の医療機関におけるAmpC型 β ラクタマーゼ産生菌の分離状況と薬剤感受性の解析結果, 秋田県健康環境センター年報, **9**, 21-25 (2013)
- 11) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **35**, 117-118 (2014)
- 12) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **36**, 73-74 (2015)
- 13) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **37**, 85-86 (2016)
- 14) 厚生労働省雇用均等・児童家庭局保育課長: 2012年改訂版保育所における感染症対策ガイドライン, 平成24年11月
- 15) 小原康治, 橋本一: 臨床分離株を中心としたホスホマイシンの耐性機序, *THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, **49**, 533-543 (1996)
- 16) 石井良和: β -ラクタマーゼの起源と分類, *臨床と微生物*, **42**, 291-296 (2015)
- 17) PHILIPPON Alain., ARLET Guillaume, JACOBY George A.: Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 1-11 (2002)
- 18) 山崎勝利, 小松方, 福田砂織, 豊川真弘, 西功, 幸福知己, 中井依砂子, 戸田宏文, 佐藤かおり, 小野保, 西尾久明, 末吉範行, 木田兼似, 折田環, 中村竜也, 直本拓己, 木下承皓, 和田恭直: 2011年に臨床材料から分離したプラスミド性AmpC β -Lactamase産生腸内細菌の調査, *日本臨床微生物学雑誌*, **23**, 20-28 (2013)