

分離培地での発育性が異なる菌株が検出された 腸管出血性大腸菌 (EHEC) O103集団感染事例について

○相原 義之, 山城 彩花¹, 石川 加奈子, 熊本 有美, 小川 郁夫, 深谷 節子

¹現:日立保健所

要旨

令和元年度、茨城県内の高校において EHEC O103 (VT1 陽性) による集団感染事例が発生した。当所にて 292 名の接触者検査を実施した結果、15 名の学生から EHEC O103 15 株が分離されたが、クロモアガーSTEC 培地における発育性が異なっていた。分子疫学解析の結果、分離菌株 15 株は同一関連株である可能性が示唆されたが、亜テルル酸塩に対する耐性に違いが見られ、分離培地上での発育に影響を与えたと考えられた。

キーワード：EHEC O103, 集団感染事例, 分子疫学解析, 薬剤感受性試験, 亜テルル酸塩耐性

はじめに

茨城県における腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）感染症の届出件数は年間約 50～60 件におよび、その患者の接触者検査は当所で実施する感染症検査において大きなウェイトを占めている。

EHEC 検査においては臨床検体からの菌株分離が重要となり、特にセフィキシム・亜テルル酸カリウム合剤（CT）に低感受性傾向を示す血清群(O157, O26, O111, O103, O121, O145 等)については、分離効率の上昇のため、CT を含有する選択分離培地(クロモアガーSTEC等)が多用されている。また、集団感染事例においては、同様の性状（培地での発育状況、生化学的性状等）を示す株が検出される可能性が極めて高いため、感染者から分離された菌株情報が接触者検査の参考となることが多い。

今般、集団感染を疑う事例であるにもかかわらず、分離培地における発育性の異なる菌株が分離された事例を経験したので、その詳細について報告する。

事例概要

令和元年 8 月 9 日、千葉県から、茨城県内の A 高校に通学する生徒（以下、初発患者）の EHEC 感染症届出（O103 VT1 陽性）があったとの情報提供を受けた。管轄保健所が A 高の調査を行ったところ、初発患者と同学年の生徒は 7 月 28 日から 8 月 2 日まで勉強合宿に参加していること、その合宿参加者 459 名のうち 160 名が水様性下痢等の症状を呈していることが判明した。合宿参加者は複数の自治体に及んでいたため、各自治体において合宿参加者の検査を実施した。

管轄保健所の調査により、本事例における有症者の発症日は 7 月 28 日を初発として 7 月 30～31 日をピークとすることが判明した。他自治体の協力を得ながら食中毒・感染症の両面から調査を実施したが、原因究明には及ばず終息に至った。最終的に、本事例では合宿参加者 459 名の検査（他自治体分も含む）を実施し、56 名の感染者を確認した。

接触者検査概要

当所における接触者便からの EHEC O103 分離培養は DHL 寒天培地とクロモアガー

STEC 培地を併用して実施した。検査初期に搬入された便検体からは DHL/クロモアガー STEC 両方の培地上に発育する EHEC O103 菌株が分離され、本事例ではクロモアガー STEC が利用できると考えられた。しかし、検査が進むにつれて、クロモアガー STEC に発育しない EHEC O103 菌株が分離されるようになり、選択性の低い DHL 培地や CT 不含クロモアガー STEC からの菌株分離を余儀なくされた。

本県では最終的に 292 名の接触者に対して検査を実施し、15 名から EHEC O103 菌株 15 株を分離したが、そのうちクロモアガー STEC 発育株はわずか 5 株に止まり、残りの 10 株はクロモアガー STEC 非発育株であった。

分子疫学解析と菌株解析

本事例では性状の異なる 2 種類の EHEC O103 菌株が分離されたため、分離菌株間の関連性を確認するため、分子疫学解析を行った。また、クロモアガー STEC における発育性の差異の理由についても検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

本事例において、当所にて実施した接触者検査から分離された EHEC O103 菌株 15 株を対象とした。

2. 解析方法

2-1. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

制限酵素は *Xba*I を用い、国立感染症研究所で示されたプロトコルに基づいて実施し、データ解析については BioNumerics (Ver. 6.6, Applied Maths) を利用した。35~550 kb の範囲内にあるバンドを対象とし、解析は Dice 法 (最適化: 0.5%, トレランス: 0.5%), 系統樹作成は平均距離法 (UPGMA) により行い、菌株間の類似性を計算した。

2-2. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)

分離菌株の MLVA については、国立感染症研究所に実施を依頼した。

2-3. 薬剤感受性試験

セフィキシム (CFIX), 亜テルル酸カリウム (K_2TeO_3) の 2 剤に対する感受性を寒天平板希釈法¹⁾により測定した。菌株をミューラーヒントンブイヨン (MHB) で増菌培養 (37°C, 18h) した後、培養液の濃度が McFarland 0.5 になるよう MHB で希釈した。この希釈液を CFIX (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 µg/mL) 含有ミューラーヒントン寒天培地および K_2TeO_3 (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 µg/mL) 含有ミューラーヒントン寒天培地に 10 µL 滴下し、十分吸着させた後に 37°C, 18 時間培養した。培養後、各種培地上での発育コロニーを観測し、各薬剤における最小発育阻止濃度 (MIC) を算出した。

結果

菌株の PFGE 解析結果を図 1 に示す。解析菌株 15 株の類似性は 90% 以上、バンドの差異も概ね 3 バンド以内であった。また、MLVA は 15 株全て同一型となった (16m4011)。

15 株のクロモアガー STEC (CT 不含, CT 含有) における発育性および薬剤感受性試験 (CFIX, K_2TeO_3) の結果を表 1 に示した。CT 不含クロモアガー STEC では全ての菌株が発育した一方、CT 含有クロモアガー STEC では 5 株 (IB19061, 19062, 19068, 19070, 19077) のみ発育が認められた。薬剤感受性試験では CFIX に対する MIC が全菌株において $\geq 0.2\mu\text{g/mL}$ となったのに対し、 K_2TeO_3 では前述した 5 株が MIC $\geq 10\mu\text{g/mL}$ を示す一方、残りの 10 株では $< 0.625\mu\text{g/mL}$ となり、感受性に大きな差がみられた。

考察

PFGE および MLVA の結果、本事例が同一由来株による集団感染事例である可能性が強く示唆された。

一方で、分離菌株の選択培地での発育性の差異については K_2TeO_3 の影響が考えられた。すなわち、CT 含有クロモアガー-STECC には CFIX が $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、 K_2TeO_3 が $2.5 \mu\text{g/mL}$ の濃度で含有されていることから、 K_2TeO_3 の MIC が $<0.625 \mu\text{g/mL}$ であった 10 菌株は発育が阻止されたものと考えられた。

EHEC の K_2TeO_3 耐性は外来性領域 (SpLE1) やプラスミド上などに存在する *ter* オペロンに依存していることが報告されており、この *ter* オペロンを含む DNA 領域の挿入や挿入後欠落により、 K_2TeO_3 耐性にばらつきが生じると考えられている²⁾。本事例においても、時期は不明であるものの、*ter* オペロンを含む DNA 領域に同様の変異が生じたことで K_2TeO_3 に対する感受性が変化したものと推測された。

結論

本事例は、疫学調査や分子疫学解析により同一由来株による集団感染事例である可能性が示唆されたにもかかわらず、薬剤感受性の異なる菌株が検出される珍しい事例であった。 K_2TeO_3 耐性は現行の EHEC 分離培養において重要な指標であり、CT 合剤をはじめ、検査において幅広く使用されている。しかし、本事例で検出された菌株のように、 K_2TeO_3 感受性が変化するようなケースもあることを考慮し、慎重に利用する必要があると考えられる。

謝辞

分離菌株の MLVA 解析を実施してくださいました国立感染症研究所 細菌第 1 部の先生方に深謝いたします。

文献

1. CLSI, Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. M7-A9, 2012.
2. 秋吉充子他, 日本食品微生物学会雑誌, 32(4).192-198, 2015.

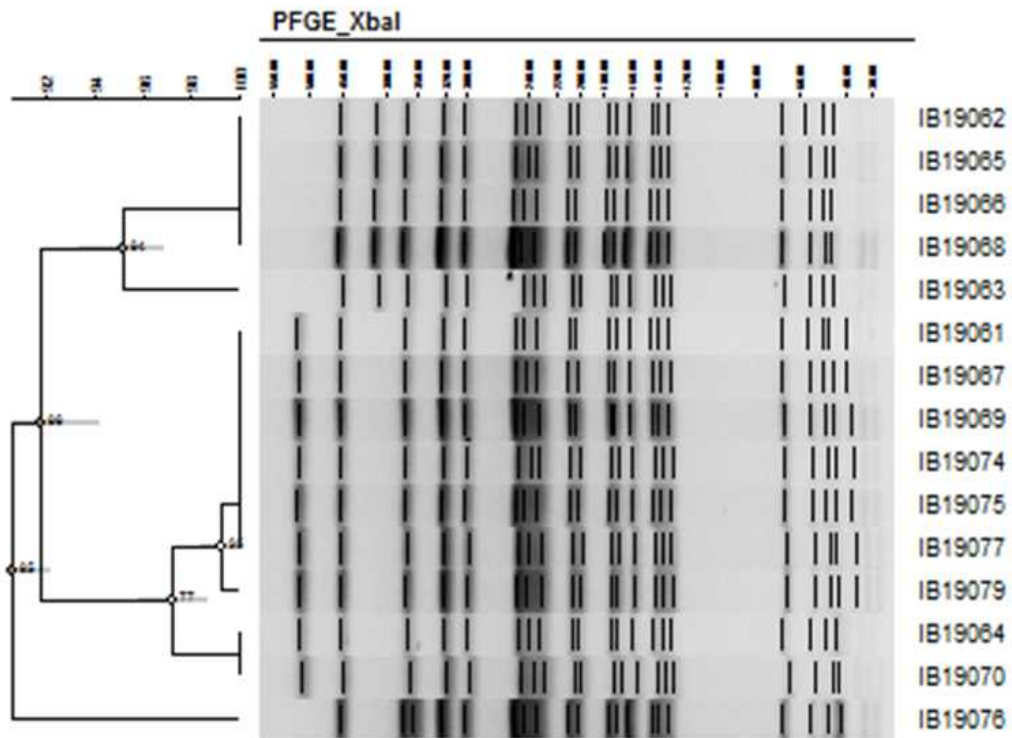


図 1. 分離菌株の PFGE 画像

	クロモアガー STEC発育性 (CT不含)	クロモアガー STEC発育性 (CT含有)	MIC (CFIX)	MIC (K ₂ TeO ₃)
IB19061	発育	発育	≥0.2	≥10
IB19062	発育	発育	≥0.2	≥10
IB19063	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19064	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19065	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19066	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19067	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19068	発育	発育	≥0.2	≥10
IB19069	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19070	発育	発育	≥0.2	≥10
IB19074	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19075	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19076	発育	非発育	≥0.2	< 0.625
IB19077	発育	発育	≥0.2	≥10
IB19079	発育	非発育	≥0.2	< 0.625

表 1. 分離菌株の性状（分離培地での発育性，薬剤感受性試験）