

資料

保育施設で発生したEHEC O111集団感染事例の分子疫学解析報告

Molecular Epidemiological Analysis of EHEC O111 Outbreak
in Childcare Facility

穂積 和佳 園田 大敬 佛淵 悠大
山口 奈央¹ 石谷 完二² 新川 奈緒美³

1 はじめに

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）は、ベロ毒素を産生もしくは同遺伝子を保有する大腸菌として感染症法において四種病原体に含まれ、EHEC感染症は三類感染症に位置づけられている。また、EHECは食品衛生法上の病原因物質でもあり、多くの食中毒事例が報告されている。

分離菌株の遺伝子型を調べる分子疫学解析は、広域に流行する株の探知に有効であり、EHECの病原体サーベイランスでは散発・集発を問わず事例間の関連性を知るうえで欠かせないものである¹⁾。分子疫学解析の一つであるMLVA（multilocus variable-number tandem-repeat analysis）は、「反復配列多型解析」とも呼ばれ、細菌のゲノムにある遺伝子配列のリピート数を調べ、その組み合わせによって遺伝子型を決定する手法である。MLVA法は従来のPFGE（パルスフィールドゲル電気泳動）法に比べ、迅速・簡便に菌の遺伝子型決定を行うことができる。

今回、県内保育施設においてEHEC O111の集団発生があり、分離された菌株について当所でMLVA法による疫学解析を実施したので報告する。

2 試料及び方法

2.1 試料

2023年10月から11月にかけて発生したEHEC O111感染症の集団感染事例に伴い提出された患者検体を対象とした。

2.2 方法

2.2.1 分離・生化学性状試験

便で搬入された検体については、クロモアガーSTEC培地で37°C、24時間培養し、発育した藤色コロニーを確認培地（TSI・LIM・SC・CLIG）に接種し、生化学性状を確認した。大腸菌の性状を示した菌株について、毒素試験と血清型試験を行った。医療機関関連検査センターより搬入された同定済みの菌株についても同様に生化学性状および毒素、血清型を確認した。

2.2.2 MLVA法

「腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック²⁾」に基づき行った。ブレインハートインヒュージョン培地で純培養した菌株を熱抽出法によりDNA調製し、対象となる17か所のローカスに対し、2種類のマルチプレックスPCRを行った。その後PCR増幅産物をシーケンサー（ABI Genetic analyzer 3500）を使用して、電気泳動（フラグメント解析）を行い、泳動結果を解析ソフトの「Gene Mapper」を用いて解析した。MLVA型については国立感染症研究所において決定した。

3 結果

3.1 分離・生化学性状試験

本事例の発生に伴い、当該保育園へ通う園児、職員及び園児の家族の計257名（257件）の検体が当センターへ搬入された。クロモアガーSTEC培地で37°C、24時間培養し、EHECを疑う藤色のコロニー53検体について確認培地

1 大隅地域振興局保健福祉環境部

2 退職（2024年3月）

3 始良・伊佐地域振興局保健福祉環境部

〒893-0011 鹿屋市打馬二丁目16-6

〒899-5112 霧島市隼人町松永3320-16

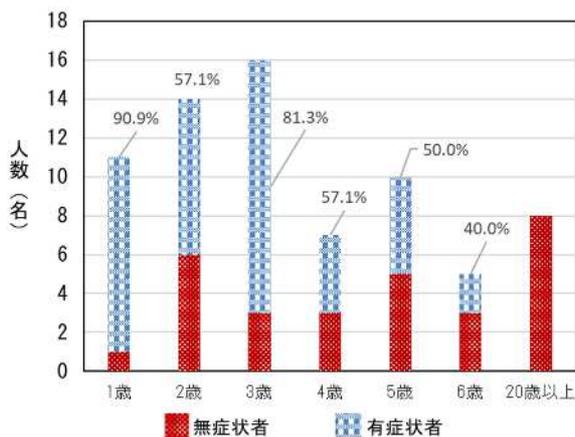


図1 年齢別患者数と有症状者割合

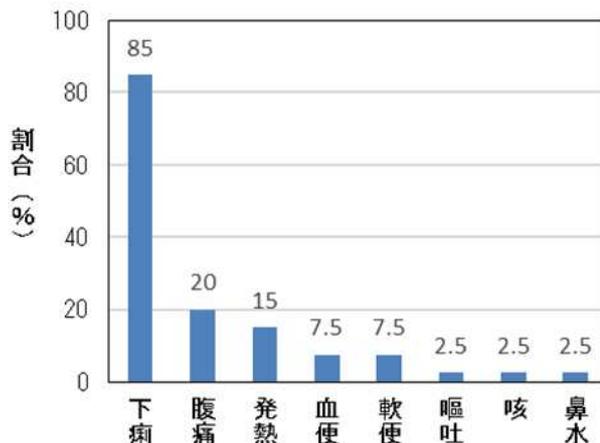
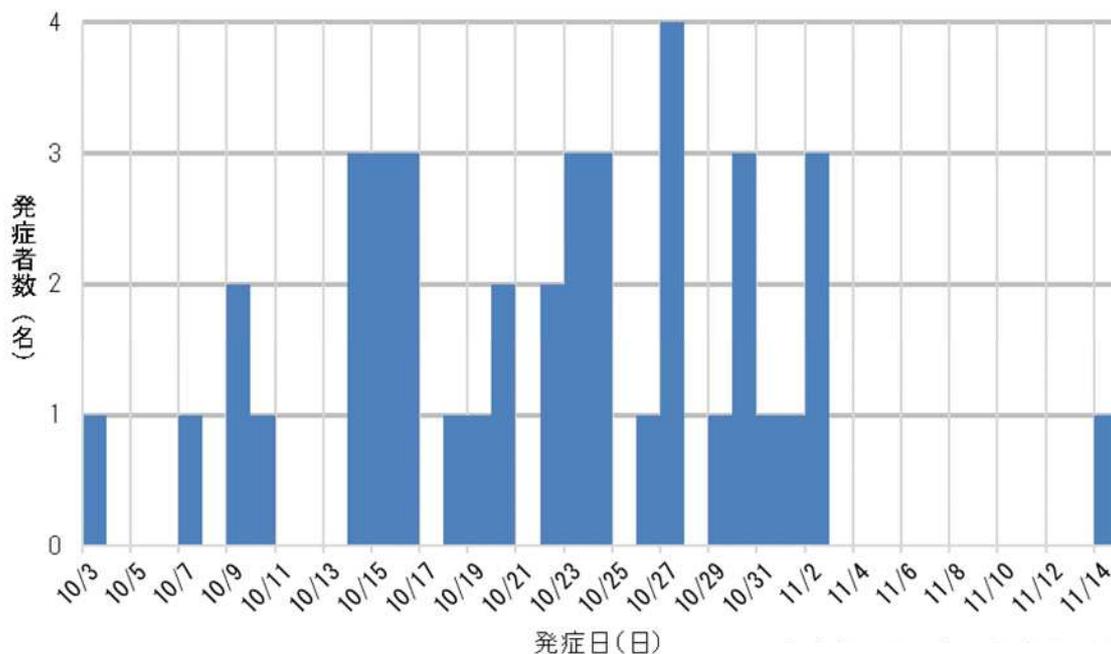


図2 有症者の症状別割合

表1 検出されたMLVAタイプと各ローカスにおけるレポート数

MLVA type	件数	MLVA comp	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	0157-3	0157-34	0157-9	0157-25	0157-17	0157-19	0157-36	0157-37
23m3055	52	23c304	4	1	5	2	-2	10	11	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	11
23m3057	12	23c304	4	1	5	2	-2	10	11	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	12
23m3058	3	23c304	4	1	5	2	-2	10	11	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	10
23m3056	1	23c304	4	1	5	2	-2	10	12	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	12
23m3059	1	23c304	4	1	5	2	-2	10	11	-2	3	-2	3	-2	2	-2	1	-2	12
23m3060	1	23c304	4	1	5	2	-2	10	12	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	11
21m3040	1	23c304	4	1	5	2	-2	10	11	-2	-2	-2	3	11	2	-2	1	-2	-2



(注) 有症のうち1名は発症日不明

図3 有症者の発症日別流行曲線

(TSI・LIM・SC・CLIG) に接種し、生化学性状を確認したところ、すべての検体で、大腸菌の性状を示した。次いで、毒素試験と血清型試験を行ったところ、全ての検体で EHEC O111 (VT1VT2) が検出された。後日検査センターより搬入された18検体についても同様の結果となり、本事例におけるEHEC O111 (VT1VT2) 陽性となったのは71検体となった。71検体の患者について、年齢および症状は図1、2のとおりである。

3. 2 MLVA法

MLVA解析により検出されたMLVA型のパターンを表1に示す。MLVA型は23m3055, 23m3056, 23m3057, 23m3058, 23m3059, 23m3060, 21m3040の7パターンが検出された。23m3055が52株と最も多く、他のパターンについてはこの株と比較し1~2箇所ローカスでリピート数が異なっていた。Complexタイプは全て23c304で共通しており、同一由来株であると考えられた。

また、21m3040は他のパターンと異なりEHC-6, O157-37のローカスでピークが認められず、-2となった。

4 考察とまとめ

4. 1 患者疫学

有症者は42名 (59.2%) であり、最も多い症状は下痢、次いで腹痛、発熱であった。とくに、下痢症状のある者が85%と突出して多かった。一方、溶血性尿毒症症候群 (HUS) 等の重症者はみられなかった。平均年齢は6.7歳 (1歳~62歳) で、1歳と3歳では有症者の割合が高く、それ以外の年齢層では有症者と無症状者の割合に差は見られなかった。また、20歳以上の成人は全員無症状であった。

次に、有症者の発症日別流行曲線を図3に示す。有症者のうち最も早い発症日は2023年10月3日 (1名) であった。その後、10月7日 (1名)、10月9日 (2名) と発症が続き、最後の発症日が11月14日 (1名) であった。日毎の発症者は1~4名程度であり、また、流行曲線は多峰性 (2~3峰) であった。これにより、今回の集団感染事例では給食等による食中毒ではなく、園児間及び家庭内等での2~3次感染によるものであると考えられた。

4. 2 MLVA法

今回、集団感染事例でのMLVA解析において最も多かった23m3055に対し、1~2箇所ローカスでリピート数が異なるパターンが検出された。MLVAにおいて、遺伝子座のコピー数は複製エラーによって変化するとされており、本事例においても、複製の際に生じるエラーによりリピート数が増減したことが考えられた。

MLVAにおいて、EHC-6, O157-36, O157-37の3領域はプラスミドに由来し、プラスミドの脱落に伴い、ローカスのリピート数が変化し、ピークが欠損する場合があるとされている²⁾。本事例でもMLVAタイプ21m3040において、EHC-6, O157-37のローカスでピークが認められず、-2となっておりプラスミドが脱落し、2つの遺伝子座が変化したdouble-locus variant (DLV) であったと考えられる。

MLVAにおいては、様々な要因によりリピート数の増減が起こり、同じ由来の株であってもMLVA型が異なる場合がある。そのためMLVAのデータ解釈は疫学情報と照らし合わせて行うことが重要である。今後も発生した菌株についてMLVA解析を実施し、県内のEHEC感染症の発生状況を把握すると共に、保健所等へ解析情報を還元し、感染拡大防止に努めていきたい。

参考文献

- 1) 泉谷秀昌; 腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について、獣医公衆衛生研究, 20-2, 6~11, 全国公衆衛生獣医師協議会 (2018)
- 2) 地方衛生研究所全国協議会; 腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック (O157, O26, O111編) 第一版 (Ver1.2), 2018年11月