

(2) 調査・事例

- 1) 福祉施設における腸管出血性大腸菌O121による集団感染事例 37

福祉施設における腸管出血性大腸菌O121集団感染事例

佐々木 麻里、神田 由子、後藤 高志*、成松 浩志

An outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O121 infection at a welfare facility in Oita

Mari Sasaki, Yoshiko Kanda, Takashi Goto, Hiroshi Narimatsu

Key Words：腸管出血性大腸菌O121 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O121、
反復配列多型解析法multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)、
集団感染事例 outbreak

要 旨

2018年9月に大分県内の1福祉施設において、腸管出血性大腸菌（EHEC）O121（VT2）を原因とする集団感染事例が発生した。接触者検便において計20名からEHEC O121（VT2）が検出され、調査の結果、主に入浴で感染が広がったと考えられた。本事例で検出された計21株および県内他事例から検出されたEHEC O121株について、国立感染症研究所（感染研）に送付して反復配列多型解析（MLVA）法による解析を依頼した。本事例の21株は互いに類縁株と推察されたが、同時期に発生していた他県の事例、県内他事例株との関連性は見いだせなかった。

はじめに

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、ベロ毒素（VT）を産生、またはVT遺伝子を保有するEHECの感染によって起こり、主な症状は腹痛、水様性下痢および血便である。国内において検出されるEHECのO抗原による血清型は、O157が最も多く、次いでO26、他にはO103、O111、O121、O145、O91が多い¹⁻⁴⁾。本感染症は、感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）に基づく感染症発生動向調査において医師に全数届出が義務づけられている三類感染症で⁵⁾、国内では年間4,000件前後、大分県では年間20~50件程度の届出がある。

2018年9月に、大分県内の1福祉施設においてEHEC O121:H19（VT2）を原因とする集団感染が発生し、疫学調査や患者接触者等への検便、拭き取り検査や分離株菌の分子疫学解析を実施し、感染源の検討を行ったので報告する。

対象および方法

1. 事例の探知

2018年9月4日に、県内医療機関から管轄保健所にEHEC O121の患者発生届があった。患者は70代女性（以下、初発患者）で、入所する福祉施設で8月31日に血便が確認されたため医療機関を受診し、O121（VT陽性、この時点ではVT型不明）が検出された。管轄保健所は直ちに患者が入所する施設等に立入り、聞き取り調査や初発患者接触者等に対する検便、施設の拭き取り検査を開始した。

2. 検査方法

検便は、採取した便を滅菌PBS(-)に約10%W/Vに混和懸濁して便乳剤とし、これをパスツールピペットで1滴ずつ各分離平板培地に取り、画線塗抹した後に36°Cで24時間培養した。培養後、分離平板培地上に発育したO121を疑うコロニーを釣菌し、普通寒天培地に接種して純培養後に各種の生化学的性状やO血清型、そしてVT遺伝子の検査に供した。

分離平板培地には、クロモアガーSTEC培地（関東化学）、DHL寒天培地（栄研化学）、XM-G寒天

* 大分県東部保健所

培地（日水製薬）を用いた。

生化学的性状検査には、TSI培地（栄研化学）、LIM培地（栄研化学）、シモンズクエン酸塩培地（栄研化学）、XMプロス（エルメックス）、チトクローム・オキシダーゼろ紙（日水製薬）そして簡易同定キットとしてIDテストEB-20（日水製薬）を用いた。

O血清型別には病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ生研）を用い、セット添付の取扱説明書に従って凝集反応で型別した。

VT遺伝子のPCR法：VT遺伝子検索用のプライマーには、mMK1_1,2およびmMK2_1,2⁶⁾を使用し、VT1とVT2の型別にはPollardらのプライマー⁷⁾を用いた。PCR用酵素・バッファー・基質は、TaKaRa Ex-Taq Hot Start Version (TaKaRa BIO)を用いた。

テンプレートDNAは、キレックス抽出法を用いて得た。すなわち、培養液については、その1mlを12000rpmで5分間遠心後、上清を捨て、沈渣にキレックス液（5%W/Vの割合にChelex 100 Resin 200-400Mesh Sodium Form (Bio-Rad)を含むTE緩衝液（pH8.0）(和光純薬)）を200μl加え、よく攪拌して再懸濁し、次いで沸騰水浴中で10分間加熱後、12000rpmで5分間遠心して得られた上清をテンプレートDNAとした。菌株については、普通寒天培地で純培養した菌を少量キレックス液に懸濁して煮沸し、上記と同じようにしてテンプレートDNAを得た。

サーマルサイクラーは、DNA Engine Tetrad2 PTC-240 (Bio-Rad)を使用し、PCR産物は電気泳動で確認した。

PCRスクリーニング：便乳剤を数滴TSB培地 (Becton Dickinson) 5 mlに接種して36°Cで一晩培養し、TSB培養液からDNAをキレックス抽出してPCR法によりVT遺伝子を検索、VT遺伝子陽性となった検体に対応する分離平板培地から疑わしいコロニーを釣菌した。

免疫磁気ビーズ法：TSB培養液についてO121免疫ビーズ（デンカ生研）を用いて集菌し、分離平板培地に画線塗抹した。一度で分離できない場合に備え、ビーズ集菌液の一部をBHI（栄研化学）に接種し、37°C 4時間の振盪培養培養後に再度ビーズ集菌を行った。

拭き取り検査：保健所の監視員が拭き取りキットST-25（エルメックス）を用いて施設の拭き取りを行い、その拭き取り液5 mLを2倍濃厚のmEC培地

（栄研化学）5 mLに加えて混和し、42°Cで一晩培養後、培養液からDNAをキレックス抽出してPCR法によりVT遺伝子を検索し、併せてクロモアガーSTEC培地とDHL寒天培地にもmEC培養液を画線塗抹して培養した。

分子疫学解析については、国立感染症研究所（感染研）に分離菌株を送付して反復配列多型解析（MLVA）法^{8,9)}による解析を依頼した。同時にH血清型も調べていただいた。

結 果

1. 患者分離菌株の性状と接触者検便

医療検査機関で初発患者から分離された菌株について、当センターで検査の結果、LIM培地でリジン（-）・インドール（+）・運動性（+）、XMプロスでX-GAL（-）（48時間後の判定では（+））・MUG（+）・インドール（+）の生化学的性状を示し、O121免疫血清に凝集を認め、PCR法でVT2遺伝子を確認し、EHEC O121（VT2）と同定された。後日、感染研からの情報によってH血清型は、H19と判明した。

当該菌株はクロモアガーSTEC培地で藤色コロニーを形成したが、24時間培養後の時点では発育が抑制されており、通常の大きさにコロニーが発育するのに48時間を要した。そこで、DHL寒天培地、XM-G寒天培地の使用を検討したところ、本O121株はDHL寒天培地上で24時間培養後の時点では糖非分解コロニーを形成し、その後徐々に赤色化することがわかった。また、TSI寒天の斜面も培養1日目は赤色であったが、2日目以降に黄色の粒がいくつも現れて次第に大きく成長した（乳糖分解株の解離）。

以上の性状を参考に、接触者検便の効率化を図るため、便乳剤をクロモアガーSTEC培地とDHL寒天培地に画線塗抹すると同時にTSB培地に接種して一晩培養後PCRスクリーニングを行い、VT遺伝子陽性となった検体に対応するDHL寒天培地から非分解コロニーを目印に釣菌するという方法をとった（図1）。TSBでVT遺伝子陽性であった検体の中にはこの方法で菌分離ができないものもあり、その際には48時間培養後のクロモアガーSTEC培地から釣菌したり、O121免疫磁気ビーズ法を繰り返したりして分離した。分離された菌株は患者分離株と同様に同定検査を行った。

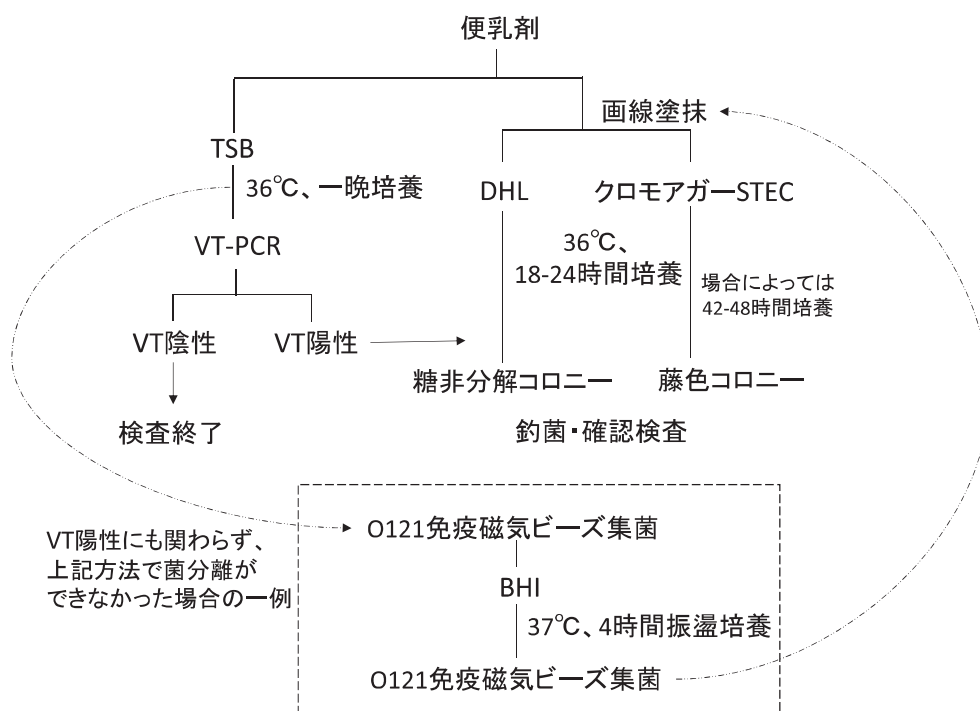


図1 本事例におけるEHEC O121検査フロー

接触者検便対象者として、施設入所者64名（男性35名、女性29名）、職員40名、別棟への通所者9名、施設外の接触者（家族等）7名、計120名の検査を9月5日から9月14日にかけて実施したところ、入所者18名（うち女性13名）、職員1名、通所者1名の計20名からEHEC O121（VT2）が検出された。職員1名（下痢あり）を除き、他の保菌者には明確な症状が認められなかったことが特徴であった。

2. 聞き取り調査

保健所による聞き取り調査から、当該施設では入所者は3食、通所者は昼食のみ同じ食事を喫食していた。施設の浴室は男女別室で、入浴日に男性、女性全員がそれぞれの大浴槽で入浴し、お湯は午前と午後で入れ替えを行っていた。患者の血便を発見したのは患者が入浴した後のことだった。男性の保菌者について、入所者は初発患者と同じホールを使用しており、通所者の男性は、初発患者が使用した食堂のテーブルで食事をしており、保菌者の女性と同一のイスを使用することもあった。保菌していた1名の職員は初発患者の排便介助をしていた。初発患者は、発症前に一時帰省していたが、帰省先の家族には特に異常は無く、原因となるような食事も見当たらなかった。

3. 施設の拭き取り検査

施設の風呂場、厨房、食堂、トイレを拭き取った

計12検体について検査した。mEC培養液からPCR法によりVT遺伝子を検索したが、全検体不検出であり、クロモアガー-STEC培地およびDHL寒天培地にも疑わしいコロニーの発育は認められず、EHECは検出されなかった。

4. MLVA法による解析

本事例で検出された計21株のEHEC O121株について、4種類のMLVA型が認められた。初発患者を含め大多数が17m5027、他に18m5034、18m5033、18m5035であった（表1）。17m5027に対して、18m5034は1座違い（SLV）、18m5033、5035は2座違い（DLV）で類似していた。17m5027と18m5033や18m5035との間のDLVはプラスミドの脱落が原因とみられる変化であったので互いに類縁株と考えられた。

なお、同時期に県外でハンバーガー店を原因施設とするEHEC O121（VT2）集団発生¹⁰が起きていたが、MLVA型は異なり、関連性は見当たらなかった。また、県内で同年に検出されたO121（18m5007、18m5008）ともMLVA型は異なっていた。

過去にも県内でO121による集団事例¹¹が2009年に1件起きており、本事例（2018年事例）初発患者の帰省先に隣接する市町村の保育施設で発生していたので、関連性の有無を調べるため、2009年事例株についても感染研にMLVA解析を依頼した。

その結果、2009年の事例株のメジャータイプは16m5009で、2018年事例のメジャータイプ17m5027とは2座違い(DLV)であった。しかし、このDLVは

プラスミド以外の変化に起因していたため類縁ではないと判定された。

表1 分離されたEHEC O121株のMLVA型

No	由来	検体採取日	菌分離日	性別	年齢	MLVA型
1	初発患者	8月31日	9月4日	女	70代	17m5027
2	入所者	9月5日	9月7日	女	50代	17m5027
3	入所者	9月5日	9月7日	女	70代	17m5027
4	入所者	9月5日	9月7日	女	70代	18m5033
5	入所者	9月5日	9月7日	女	70代	17m5027
6	入所者	9月5日	9月7日	女	40代	17m5027
7	入所者	9月5日	9月7日	女	50代	17m5027
8	入所者	9月5日	9月7日	女	60代	17m5027
9	入所者	9月5日	9月7日	女	50代	17m5027
10	入所者	9月5日	9月8日	女	80代	17m5027
11	入所者	9月5日	9月8日	女	80代	17m5027
12	入所者	9月5日	9月8日	女	50代	17m5027
13	職員	9月5日	9月9日	女	40代	17m5027
14	入所者	9月5日	9月9日	女	40代	17m5027
15	入所者	9月9日	9月12日	女	60代	17m5027
16	通所者	9月10日	9月13日	男	60代	17m5027
17	入所者	9月12日	9月14日	男	50代	18m5034
18	入所者	9月12日	9月14日	男	40代	17m5027
19	入所者	9月12日	9月15日	男	50代	17m5027
20	入所者	9月12日	9月17日	男	50代	17m5027
21	入所者	9月11日	9月21日	男	60代	18m5035

考 察

MLVA解析の結果、福祉施設関連の20名の保菌者は初発患者由来のO121に感染したと推定された。保菌者が女性に多かったこと、初発患者を入れた浴槽を他の女性も使用したことなどから、施設の食事が原因ではなく、入浴で感染が広がったと推察される。男性の保菌者については、入所者は初発患者と同じホールを使用しており、ソファや窓の棧など患者が触った場所に付着した菌から感染が広がったと考えられる。通所者の男性は、初発患者が使用した食堂のテーブルやイスを介して感染した可能性が高いと考えられる。また、職員は、患者の排便介助をしており、その際に感染した可能性が高い。

菌の伝搬経路を調べるため施設のふき取り検査を実施したが、検査した箇所からはEHECは検出されなかった。保健所による後の調査によると、施設ではふき取り前にほとんどの箇所の消毒を実施していた。そのためにEHECが検出されなかったと考えられ、自主的な感染拡大防止対策がとれていたと言える。

初発患者については、発症前に一時帰省してお

り、その間に感染した可能性も考えられるが、帰省先家族には特に異常は無く、原因となるような食事も見当たらず、初発患者の感染源ははっきりしなかった。また、MLVA法を用いて他のEHEC O121検出事例との比較を実施したが、同時期に発生していた他県の事例、同年の県内事例、関連地域で発生した過去の事例のいずれも関連性は見いだせず、本事例の初発患者の感染源を推測することはできなかった。

おわりに

9月22日に最後の保菌者の陰性化を確認した。その後、健康調査を実施し、新たな患者の発生がないことを確認して9月25日に本事例は終息した。

謝 辞

本調査にあたり多大なるご協力を頂きました管轄保健所の関係職員の皆様、健康づくり支援課の関係職員の皆様、MLVA解析を実施していただきました国立感染症研究所細菌第一部の皆様に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 国立感染症研究所、厚生労働省健康局結核感染症課：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 2019年3月現在，病原微生物検出情報40(5),71-74 (2019)
- 2) 国立感染症研究所、厚生労働省健康局結核感染症課：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 2018年3月現在，病原微生物検出情報39(5),71-74 (2018)
- 3) 国立感染症研究所、厚生労働省健康局結核感染症課：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 2017年4月現在，病原微生物検出情報38(5),87-90 (2017)
- 4) 国立感染症研究所、厚生労働省健康局結核感染症課：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 2016年4月現在，病原微生物検出情報37(5),85-88 (2016)
- 5) 厚生労働省：感染症法に基づく医師の届出のお願い，https://www.mhlw.go.jp/stf/seisa/kunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekkaku-kansenshou/kekkaku-kansenshou11/01.html
- 6) 伊藤健一郎：遺伝子検査法，平成23年度短期研修 細菌研修テキスト，国立保健医療科学院，和光市（2011）
- 7) Pollard D R et al：Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 28,540-545 (1990)
- 8) 泉谷秀昌：広域散発事例探知に向けた取り組み，日本食品微生物学会誌，36(1)，10-12 (2019)
- 9) 泉谷秀昌ら：EHEC MLVAについて，衛生微生物技術協議会第39回研究会－大腸菌リファレンス会議資料，大津市（2018）
- 10) 柳澤宏太ら：ハンバーガーチェーンで発生した腸管出血性大腸菌O121の広域散発食中毒事例について，病原微生物検出情報，40(5)，78-80 (2019)
- 11) 緒方喜久代ら：保育園で発生した腸管出血性大腸菌O121による集団感染例－大分県，病原微生物検出情報，31(6)，161-162 (2010)