

山梨県においてヒトおよびウシから分離された 大腸菌 O157 の細菌学的検討

野田裕之 大沼正行*¹ 長田美母衣 浅川洋美*² 金子通治

Bacteriological Studies on *Escherichia coli* O157 Isolated
from Human and Bovine in Yamanashi Prefecture

Hiroyuki NODA, Masayuki OHNUMA, Mihoro OSADA,
Hiroyoshi ASAKAWA and Michiharu KANEKO

キーワード：EHEC O157, *eaeA*, 薬剤耐性, プラスミドプロファイル, PFGE

1996年に腸管出血性大腸菌(EHEC) O157:H7による集団食中毒、散発下痢症が全国的に多発し¹⁾、以後毎年多くの患者が発生している。特にEHEC感染症が3類感染症となった1999年4月以降2005年まで、年間2,999～4,336例の報告がされているが²⁾、このうちの主要な血清型はO157である。

EHEC O157:H7による最初の事例報告³⁾は、1982年に米国で発生したハンバーガーを原因食品とした食中毒事例であった。その後も牛挽肉が原材料となった事例が多く発生した⁴⁾ことにより、欧米ではO157の感染源として牛肉や牛挽肉が注目され、ウシの保菌調査も数多く行われ、0.2～8.2%の保菌率であることが報告されている⁴⁾。我が国でも、1996年にと畜場に搬入されたウシについて実施した全国調査で糞便からO157が1.4%検出⁵⁾されており、全国的にウシでO157が保菌されていることが明らかとなった。ウシでO157の保菌率が高いことから牛肉を原材料とした「ひとくちステーキ」⁶⁾、「ビーフ角切りステーキ」⁷⁾、「牛たたき」⁸⁾および「ローストビーフ」⁹⁾などの食品や生レバー⁹⁾を原因食品とした事例の報告もされている。

そこで、今回、ヒト由来株とウシ由来株についてO157株間の関連性をみるため、山梨県で分離されたヒト由来株およびウシ由来株について血清型、毒素型、細胞付着性因子(*eaeA*)、薬剤感受性、プラスミドプロファイルの疫学マーカーを比較し、さらにPFGEによるDNA切断パターンの解析を行ったので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

ヒト由来株は、1990年から2005年までに分離された105株、ウシ由来株は1996年から2005年までに分離された77株(ウシ腸内容物由来51株、と畜場施設環境由来22株、ウシ枝肉ふきとり由来4株)の計182株を使用した。

2. 志賀毒素産生性試験

志賀毒素(以下Stxと略す)産生性と毒素型別は、常法によりRPLA法によるStxの検出と型別、さらにPCR法による*stx1*および*stx2*の遺伝子検出を行った。

3. 細胞付着性因子(*eaeA*)の検出

近年下痢原性大腸菌の病原性に関与することが疑われている細胞付着性因子のうち、O157が保有することの多い*eaeA*の検出を既報¹⁰⁾と同様にPCR法を用いて行った。

4. 薬剤感受性試験

NCCLS法の規格に準拠し、一濃度ディスク法(BBLセンシディスク)によって測定した。使用薬剤はサルファ剤がスルフィソキサゾール(SA)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、カナマイシン(KM)、アミノベンジルペニシリン(ABPC)、セファロチン(CET)、セフォキシチン(CFX)、ラタモキシセフ(LMOX)、ノルフロキサシン(NFLX)、ナリジクス酸(NA)の11薬剤である。

*1: 現 中北保健所

*2: 食肉衛生検査所

5. プラスミドプロファイル

Kado と Liu の方法¹¹⁾ に準拠し、実施した。プラスミド DNA を抽出後、0.65% のアガロースを使用し、約 2 時間 30 分電気泳動してエチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で撮影し、プラスミドを観察した。

6. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による DNA 切断パターンの解析

国立感染症研究所の New Protocol に準拠して行った。すなわち、PFGE 用 DNA ブロックは、0.7mm プラグキャスターを使用し、SeaKem Gold Agarose (最終濃度 0.5%) で作製した。DNA 抽出時に Lysozyme 処理は行わず、溶菌は 1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0) で、50°C, 18~20 時間行った。制限酵素 *Xba* I で 37°C, 4 時間処理し、1% SeaKem Gold Agarose で作製した電気泳動用 agarose を使用して、6V/cm, 2.2~54.2sec, 20 時間、12°C の条件で電気泳動を行った。また、DNA サイズマーカーとして、*Salmonella* Braenderup H9812 株を使用した。

得られた DNA 切断パターンの解析は、Finger Printing II を使用し、UPGMA 法で行った。

結 果

1. 分離株の血清型と毒素型

表 1 に分離株 182 株の血清型と毒素型の組合せを示した。Stx 産生性は、ヒト由来株ではすべての株が産生したが、ウシ由来株では 12 株 (O157:H7 が 11 株、O157:HNM が 1 株) が非産生であった。血清型と毒素型の組合せでは、ヒト由来株は O157:H7 Stx1, 2 が 69 株 (65.7%) と最も多く、次いで O157:H7 Stx2 が 21 株で、以下 O157:HNM の Stx1, 2 が 7 株、Stx2 が 5 株、Stx1 が 3 株あった。これに対し、ウシ由来株では、

表 1 分離株の血清型と毒素型

血清型	毒素型	ヒト		ウシ	
		株数	%	株数	%
O157:H7	Stx1, 2	69	65.7	25	32.5
	Stx2	21	20	28	36.4
	Stx1	—	—	6	7.8
	非産生	—	—	11	14.3
O157:HNM	Stx1, 2	7	6.7	1	1.3
	Stx2	5	4.8	5	6.5
	Stx1	3	2.9	—	—
	非産生	—	—	1	1.3
計		105	100	77	100

O157:H7 Stx2 が 28 株 (36.4%) と最多で、次いで O157:H7 Stx1, 2 が 25 株 (32.5%) で、以下 O157:H7 Stx1 が 6 株、O157:HNM の Stx2 が 5 株、Stx1, 2 が 1 株であった。ヒト由来株のみにみられた組合せは O157:HNM Stx1 が、またウシ由来株のみに O157:H7 Stx1 があった。以上のように由来によって血清型と毒素型に違いがみられた。

2. 年次別分離状況

大腸菌 O157 の年次別分離状況を表 2 に示した。ヒト由来株は、1990 年から分離され始め、1996 年からは毎年分離されるようになり、年間 2~17 株が分離された。なお、1990 年~1992 年の 3 株は 1996 年にさかのぼり調査で判明した株である。ウシ由来株の分離状況は、調査を開始した 1996 年から分離されたが、年によりばらつきがみられ、全く分離されない年から 26 株分離される年までさまざまであった。

3. 細胞付着性因子 (*eaeA*) の保有状況

毒素産生の有無にかかわらず、供試した 182 菌株のすべてに *eaeA* の保有がみられた。

4. 分離株の薬剤感受性

表 3 に示したように、ヒト由来株で耐性を示したのは 20 株 (19.0%) であったが、ウシ由来株のそれは 20 株 (26.0%) と耐性率はウシ由来株がやや高かった。

薬剤別の耐性率を表 4 に示したが、ヒト由来株では SM 耐性が 16.2%、TC 耐性が 12.4%、SA 耐性が 11.4% 等であったが、ウシ由来株では SA 耐性が 24.7% と高く、次いで、SM 耐性と TC 耐性が 20.8% で、ウシ由来株の方が薬剤別の耐性率も高い傾向にあった。

薬剤耐性型は、表 5 に示したように 15 の型がみられ、ヒト由来株とウシ由来株で共通の耐性型として、SA・SM・TC、SA・SM・TC・ABPC、SA・SM、SA・SM・ABPC の 4 つの型がみられた。

5. 分離菌のプラスミドプロファイル

表 6 に分離菌のプラスミドプロファイルを示した。由来にかかわらず、92.4kb のプラスミドを保有する株が多く、ヒト由来株で 104 株 (99.0%)、ウシ由来株で 73 株 (94.8%) で、このうち 92.4kb 単独保有株が、ヒト由来株で 79 株 (75.2%)、ウシ由来株で 62 株 (80.5%) であった。

6. 共通する疫学マーカーの組合せ

血清型、毒素型、薬剤耐性型、プラスミドプロファイルの 4 疫学マーカーの組合せで、ヒト由来株とウシ由来株が共通であった株数をそれぞれ表 7 に示した。共通し

表2 大腸菌 O157 の年次別分離状況

由来	血清型	毒素型	年													株数 (%)
			'90	'91	'92	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	
ヒト	O157:H7	Stx1, 2	1	-	-	2	14	5	8	9	7	2	7	3	11	69(65.7)
		Stx2	-	1	1	-	1	-	5	3	5	2	2	1	-	21(20)
		Stx1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ヒト	O157:HNM	Stx1, 2	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	1	1	-	7(6.7)
		Stx2	-	-	-	-	-	-	1	3	-	1	-	-	-	5(4.8)
		Stx1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	3(2.9)
計			1	1	1	2	15	5	14	15	17	5	11	7	11	105(100)
ウシ	O157:H7	Stx1, 2	-	-	-	2	-	7	4	-	1	-	3	2	6	25(32.5)
		Stx2	-	-	-	2	-	4	15	3	1	-	1	1	1	28(36.4)
		Stx1	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	2	-	-	6(7.8)
		非産生	-	-	-	-	-	5	5	1	-	-	-	-	-	11(14.3)
	O157:HNM	Stx1, 2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1(1.3)
計			-	-	-	7	-	19	26	4	5	-	6	3	7	77(100)

表3 大腸菌 O157 の由来別薬剤耐性率

由来	分離株数	耐性株数	耐性率 (%)
ヒト	105	20	19.0
ウシ	77	20	26.0
計	182	40	22.0

表4 大腸菌 O157 の薬剤別耐性率

薬剤	ヒト (n=105)		ウシ (n=77)	
	株数	%	株数	%
SM	17	16.2	16	20.8
TC	13	12.4	16	20.8
SA	12	11.4	19	24.7
ABPC	9	8.6	7	9.1
KM	2	1.9	-	-
CP	1	1.0	-	-

表5 大腸菌 O157 の薬剤耐性型

薬剤耐性型	ヒト株数	ウシ株数	計
SA・SM・TC	5	9	14
SA・SM・TC・ABPC	2	4	6
SA・SM	2	2	4
SA・SM・ABPC	2	1	3
ABPC	2	-	2
SM・TC	2	-	2
SM・ABPC	1	-	1
TC・KM	1	-	1
SM・TC・ABPC	1	-	1
SM・TC・KM・ABPC	1	-	1
SA・SM・TC・CP	1	-	1
SA	-	1	1
SA・TC	-	1	1
TC・ABPC	-	1	1
SA・TC・ABPC	-	1	1
計	20	20	40

表6 大腸菌 O157 のプラスミドプロファイル

プラスミドプロファイル (kb)	ヒト (n=105)		ウシ (n=77)		計 (n=182)	
	株数	%	株数	%	株数	%
92.4	79	75.2	62	80.5	141	77.5
92.4, 50	5	4.8	3	3.9	8	4.4
92.4, 48	2	1.9	5	6.5	7	3.8
92.4, 85	6	5.7	-	-	6	3.3
92.4, 80	2	1.9	1	1.3	3	1.6
92.4, 63	2	1.9	1	1.3	3	1.6
92.4, 60	3	2.9	-	-	3	1.6
92.4, 55	2	1.9	-	-	2	1.1
130, 92.4	1	1.0	-	-	1	0.5
200, 92.4	1	1.0	-	-	1	0.5
92.4, 80, 48	1	1.0	-	-	1	0.5
70, 50, 48	1	1.0	-	-	1	0.5
92.4, 52, 50	-	-	1	1.3	1	0.5
70, 60,	-	-	1	1.3	1	0.5
63, 48	-	-	1	1.3	1	0.5
60	-	-	1	1.3	1	0.5
63	-	-	1	1.3	1	0.5

表7 共通する血清型・毒素型・薬剤耐性型・プラスミドプロファイル

No.	血清型	毒素型	薬剤耐性型	プラスミドプロファイル (kb)	ヒト株数	ウシ株数
1	O157:H7	Stx1, 2	感受性	92.4	54	8
2	O157:H7	Stx2	感受性	92.4	11	19
3	O157:HNM	Stx1, 2	感受性	92.4	5	1
4	O157:HNM	Stx2	感受性	92.4	1	2
5	O157:H7	Stx2	感受性	92.4, 50	3	2
6	O157:H7	Stx2	感受性	92.4, 48	2	2
7	O157:HNM	Stx2	感受性	92.4, 63	1	1
8	O157:H7	Stx1, 2	SA・SM・TC	92.4	1	6
9	O157:H7	Stx1, 2	SA・SM・ABPC	92.4, 80	2	1
計					80	42

た組合せに No.1~No.9 の 9 つのタイプがみられたが、最も多くみられたのは O157:H7, Stx1, 2, 薬剤感受性, 92.4kb プラスミド保有のタイプで、ヒト由来株 54 株, ウシ由来株 8 株であった。次いで、O157:H7, Stx2, 薬剤感受性, 92.4kb プラスミド保有のタイプが、ヒト由来株 11 株, ウシ由来株 19 株であった。

7. PFGE による DNA 切断パターンの系統樹解析

表 7 で示したヒト由来株とウシ由来株間で 4 つの疫学マーカーが共通であった No.1~No.9 の 9 つのタイプについて、各タイプの菌株の PFGE を実施した。

DNA 切断パターンを UPGMA 法により系統樹解析した結果を、図 1~図 9 に示した。図 1, 図 2 は、組合せの株数が多かったため、最初にヒト由来株のみ、あるいはウシ由来株のみの PFGE を行い、その結果同一の切断パターンを示したものについては 1 株に絞って解析を行った。図 1 には、最も多かった組合せ (表 7 の No.1 のタイプ) である O157:H7, Stx1, 2, 薬剤感受性, 92.4kb プラスミド保有を示した。※印のヒト由来株 (99-156, 99-197) とウシ由来株 (EC61) および *印のヒト由来株 (05-148, 05-151) とウシ由来株 (EC108) で類似値が 90% 以上であったが、ヒト由来株とウシ由来株の株間では同一のパターンはみられなかった。他のタイプ (表 7 の No.2~No.9) の株間の切断パターンは、図 2~図 9 に示したように類似値は低く、ヒト由来株とウシ由来株の株間で同一の切断パターンもみられなかった。

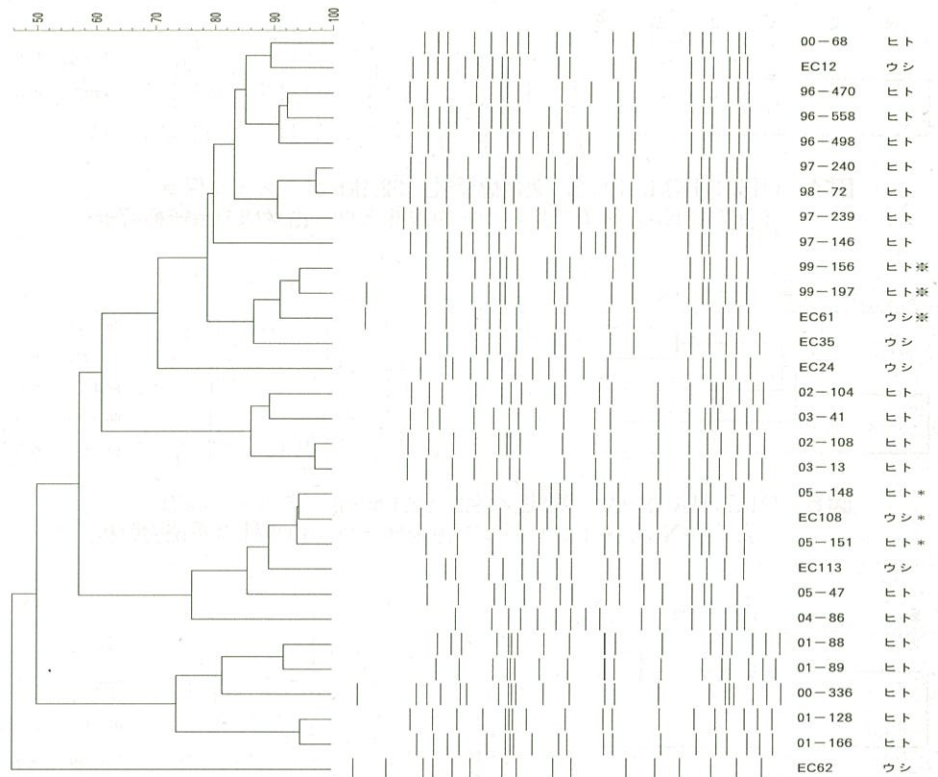


図 1 O157:H7, Stx1, 2, 薬剤感受性, 92.4kb プラスミド保有 (表 7 の No.1 タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析

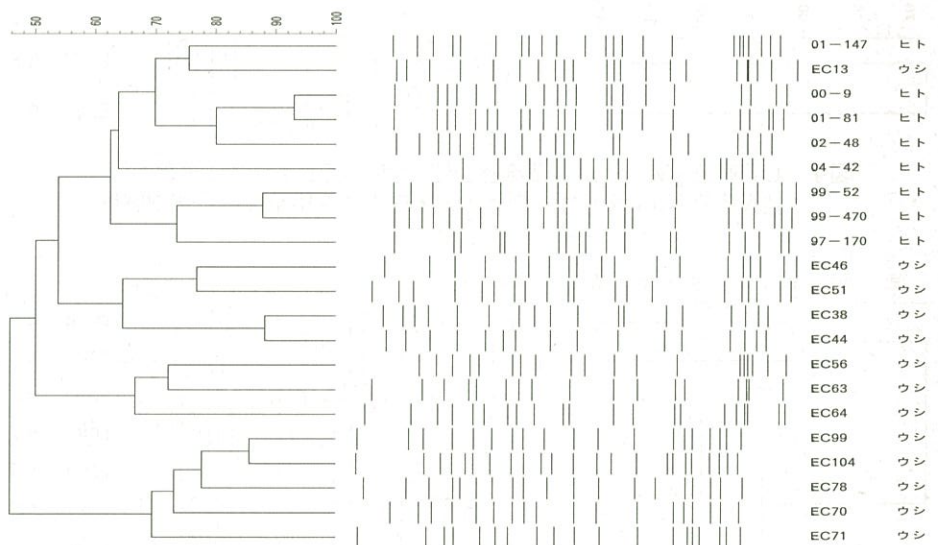


図 2 O157:H7, Stx2, 薬剤感受性, 92.4kb プラスミド保有 (表 7 の No.2 タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析



図 3 O157:HNM, Stx1, 2, 薬剤感受性, 92.4kb プラスミド保有 (表 7 の No.3 タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析

考 察



図4 O157:HNM, Stx2, 薬剤感受性, 92.4kb プラスミド保有 (表7のNo.4タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析



図5 O157:H7, Stx2, 薬剤感受性, 92.450kb プラスミド保有 (表7のNo.5タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析



図6 O157:H7, Stx2, 薬剤感受性, 92.448kb プラスミド保有 (表7のNo.6タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析



図7 O157:HNM, Stx2, 薬剤感受性, 92.463kb プラスミド保有 (表7のNo.7タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析

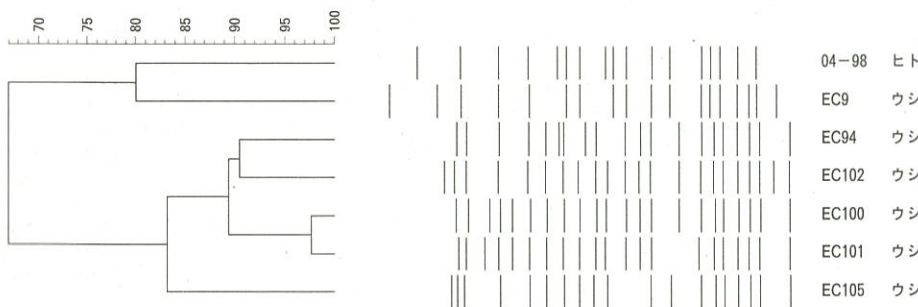


図8 O157:H7, Stx1, 2, SA・SM・TC, 92.4kb プラスミド保有 (表7のNo.8タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析



図9 O157:H7, Stx1, 2, SA・SM・ABPC, 92.480kb プラスミド保有 (表7のNo.9タイプ) のヒト由来株とウシ由来株の系統樹解析

山梨県で分離された大腸菌 O157:H7 および O157:HNM について、ヒト由来株とウシ由来株に分けて比較検討を行った。

Stx 産生性は、ウシ由来株中 12 株 (O157:H7 が 11 株, O157:HNM が 1 株) が非産生株であった。ヒト由来株は O157:H7, O157:HNM ともにすべて産生株であり、ウシ由来株とは異なっていた。ウシ由来株には、O157:H7, O157:HNM にも非産生株が存在することが確認でき、今後の検査の参考になると考えられた。

血清型と毒素型の組合せタイプではヒト由来株は O157:H7 Stx1, 2 が 65.7% と最多であったが、ウシ由来株の O157:H7 Stx1, 2 の組合せタイプは 32.5% と低く、由来により異なっていた。ウシ由来株での最多の組合せタイプは O157:H7 Stx2 で 36.4% であった。ヒト由来株のみに O157:HNM Stx1 タイプが、ウシ由来のみに O157:H7 Stx1 タイプがみられ、ヒト由来株とウシ由来株で明確な違いがみられる株もあった。

薬剤耐性率は、ヒト由来株が 19%、ウシ由来株が 26.0% とウシ由来株がやや高かった。薬剤別の耐性率もウシ由来株が SA 耐性 24.7%、SM 耐性、TC 耐性それぞれ 20.8% とヒト由来株より高く、農場などでの動物用抗菌剤の使用の影響も推測された。また、ヒト由来株とウシ由来株で共通の耐性型として、SA・SM・TC, SA・SM・TC・ABPC, SA・SM, SA・SM・ABPC の 4 つの型があり、両由来株間の関連性も考えられた。

eaeA 遺伝子は由来に関係なく、すべての菌株が保有してい

た。*eaeA* 遺伝子は、菌の定着に重要な役割を持つ intimin タンパクの生成を規制する¹²⁾働きがあり、病原因子の一つとされている。小林らの報告¹³⁾によると、EHECの主要な血清型である O157, O26, O111 では、*eaeA* をヒト由来、ヒト以外の由来にかかわらず、すべての菌株が保有しているとされ、今回の結果はそれと同様であった。しかし、上記の3血清型以外の血清型では *eaeA* の保有率が、とくにヒト以外の由来株で低く¹³⁾、また、倉本ら¹⁴⁾は、健常者由来の EHEC でも O26, O157 を除いた血清型では *eaeA* の保有率が低いことを報告しており、*eaeA* の保有がヒトへの病原性の面で重要な役割を果たしていると考えられた。

プラスミドプロファイルも由来に関係なく、92.4kb のプラスミドを多数の株が保有していた。92.4kb プラスミドは病原性の発現に関与している¹⁵⁾とされ、今回の結果からもそれが裏付けられた。また、プラスミドプロファイルには、92.4kb 以外にも少数ではあるが、いろいろな大きさのプラスミドが存在しており、疫学マーカーとして有効であると考えられた。

ヒト由来株とウシ由来株で共通した疫学マーカーの組合せとして、9つの組合せがみられた。ヒト由来株とウシ由来株は、Stx 非産生株の存在や血清型と毒素型の組合せの分布や薬剤感受性に違いもみられたが、共通の性状を持つ株も多くみられた。それらの株について PFGE による解析を行ったところ、ヒト由来株とウシ由来株で同一の切断パターンを示す株はみられなかった。この結果により、今回実施したヒト由来株とウシ由来株の関連性がすべて否定されるのではなく、O157 の性状の変化によるところもあると考えられる。渡辺ら¹⁶⁾は、O157 はゲノム構成に変化が起りやすく、3,000 種類以上の異なるパターンに分けることができることを明らかにしている。O157 の分裂回数が多くなると切断パターンに変化が起りやすく、異なった切断パターンになることも考えられ、今回のような結果となったひとつの要因と推測された。しかし、八柳ら¹⁷⁾は、ヒトとウシから同一のパターンを示す O157 の分離事例を報告しており、分離時期、感染経路、菌株の状態によっては、同一切断パターンの O157 が分離される可能性もあるので、今後さらに株数を増やして検討していきたいと考えている。

今回の調査では、ヒトとウシの明確な関連性は確認できなかったが、と畜場のウシ関連検体からヒトへの感染が起りうる O157 が分離されており、ヒトの感染源としてウシは注意を要する動物である。解体処理時における食肉への汚染防止やと畜場の衛生対策、ウシの尿尿や有機肥料による農産物の汚染防止などの衛生管理対策の重要性が再認識された。

- 1) 南 俊作：厚生省の対応，公衆衛生研究，46(2)，78～83 (1997)
- 2) 国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌症 2006 年 5 月現在，病原微生物検出情報，27(6)，141～143 (2006)
- 3) Riley.L.W.et al：Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype.N.Engl.J. Med., 308, 681～685 (1983)
- 4) 仁科徳啓，神田 隆：動物および食肉における腸管出血性大腸菌の分布，日食微誌，13(4)，199～204(1997)
- 5) 品川邦汎：腸管出血性大腸菌による食肉汚染とその対策，獣医畜産新報，50(3)，237～242 (1997)
- 6) 神奈川県衛生研究所細菌病理部：レストランチェーン店における腸管出血性大腸菌 O157 感染事例－神奈川県，病原微生物検出情報，22(6)，140～141 (2001)
- 7) 磯部順子ら：ファミリーレストランチェーン店で発生した腸管出血性大腸菌 O157:H7 による感染症－富山県，病原微生物検出情報，22(6)，138～139 (2001)
- 8) 内村眞佐子ら：千葉県における腸管出血性大腸菌検出状況と下痢患者の血清学的診断 (1996～2002 年)，千葉衛研報告，26，29～35 (2002)
- 9) 大中隆史：生レバーが原因食と考えられる腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例－堺市，病原微生物検出情報，22(11)，291～292 (2001)
- 10) 大沼正行ら：山梨県における下痢原性大腸菌の細胞付着因子保有状況，山梨衛公研年報，45，30～33，(2001)
- 11) Kado.C.I.&Liu.S.T.：Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids., J.Bacteriol., 145, 1365～1373 (1981)
- 12) 坂崎利一：志賀毒素産生性 (腸管出血性) 大腸菌－細菌学的性状，病原性および発症機序，日食微誌，13(4)，187～193 (1997)
- 13) 小林一寛ら：下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察，感染症誌，76(11)，911～920 (2002)
- 14) 倉本早苗ら：健常者から分離された腸管出血性大腸菌の菌学的特性，石川保環研報，39，1～7 (2002)
- 15) 金子通治ら：山梨県における 1999 年度の腸管出血性大腸菌 O157 の分離状況と細菌疫学的検討，山梨衛公研年報，43，9～13 (1999)
- 16) 渡辺治雄ら：分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制；パルスネットの構築，感染症誌，76，842～848 (2002)
- 17) 八柳 潤ら：腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染疫学解明に関する調査研究，秋田県衛生科学研究所報，48，45～53 (2005)