

中学校で発生した腸管凝集性大腸菌 O44:H18 を 原因とする食中毒事例

野田裕之 千須和美母衣

An Outbreak of Food Poisoning Caused by Enteroaggregative *Escherichia coli* O44:H18
in a Lower Secondary School

Hiroyuki NODA, Mihoro CHISUWA

キーワード : EAggEC, O44:H18, *aggR*, *astA*

腸管凝集性大腸菌 Enteroaggregative *Escherichia coli* (以下 EAggEC と略す) は、1987 年に発見報告¹⁾された比較的新しい細菌で、南米や東南アジアの小児や乳幼児の下痢症からよく検出報告^{2)~4)}され、わが国でも散発下痢症から検出^{4)~7)}されているが、食中毒事例の報告^{7)~9)}はまだ少数しかされていない。

EAggEC は、組織培養細胞に凝集性付着をすることで確認されるが、簡便な方法として PCR 法で付着に関与する *aggR* 遺伝子の保有をみることも行われている。

今回、わが国ではまだ発生の少ない EAggEC による食中毒が中学校で学校給食を原因として発生したので、その事例について報告する。

事例の概要

平成 19 年 9 月 19 日、A 中学校の養護教諭から生徒及び職員に下痢、腹痛などの症状を呈するものが多数いる旨の連絡が峡東保健所にあった。

保健所で調査したところ、患者は 9 月 14 日から発生し、9 月 15 日から 16 日に患者発生のピークがみられ、患者の共通食は学校給食のみであることが判明した。食中毒

検査を当所で実施し、患者等 13 名の糞便から *aggR* と *astA* 遺伝子を保有する大腸菌 O44:H18 が分離されたことから、学校給食を原因とする食中毒と断定された。表 1 に概要を示した。

表 1 A 中学校食中毒の概要

発生年月日	平成 19 年 9 月 14 日 (金)
摂食者数	288 名
患者数	29 名
原因食品	9 月 14 日の学校給食 (推定)
病因物質	EAggEC O44:H18
原因施設	A 中学校給食施設

材料及び方法

1. 検査材料

施設ふきとり 10 検体、食品 35 検体 (9 月 11 日～14 日の検食 18 検体及び原材料 17 検体)、患者 (生徒、教員) 糞便 24 検体、調理従事者糞便 4 検体 (うち 3 名発症) の合計 73 検体を検査材料とした。

2. 疫学調査

患者の発生状況、症状、喫食状況などは、峡東保健所職員による聞き取り調査により行われた。

3. 食中毒原因菌の検査方法

常法に従い原因菌の検索を実施した¹⁰⁾。

糞便の病原性大腸菌検査は、分離培地にマッコンキー寒天培地 (MAC) を使用し、TSI、LIM に釣菌後、生化学的性状、血清型別試験を行い、大腸菌を同定した。施設ふきとり及び食品は、Tryptic Soy Broth (TSB) で前培養後、EC 培地で増菌培養し、MAC に塗抹した。O44:H18 が *aggR* と *astA* 遺伝子を保有することが判明してからは増菌培養にノボビオン加 mEC 培地も加え、増菌培地からの PCR 法による *aggR* と *astA* 遺伝子の検索も行った。図 1 に今回実施した病原性大腸菌検査を示した。

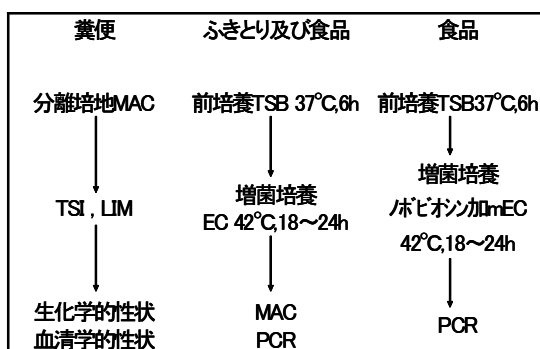


図 1 病原性大腸菌検査

4. 病原性大腸菌病原因子の検出

腸管出血性大腸菌の VT1、VT2 遺伝子、毒素原性大腸菌の LT、STh、STp 遺伝子、腸管侵入性大腸菌の *invE*、*ipaH* 遺伝子の検出は TaKaRa の Primer Set を使用し、使用書に記載されている条件で PCR 法により行った。

また、細胞付着性因子のうち、3 種類の遺伝子 (*eeA*, *aggR*, *bfpA*) と耐熱性毒素様毒素 (EAST1) の遺伝子 (*astA*) の検出は既報¹¹⁾と同様に PCR 法により行った。

5. 薬剤感受性試験

NCCLS 法の規格に準拠し、一濃度ディスク法 (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 (ST)、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)、セフォタキシム (CTX)、ラタモキシセフ (LMOX)、ノルフロキサシン (NFLX)、シプロフロキサシン (CPFX)、ホスホマイシン (FOM)、ゲンタマイシン (GM)、ナリジクス酸 (NA)、スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合剤 (ST) の 16 薬剤である。

6. HEp-2細胞への付着性試験

河野らの方法⁵⁾に準拠して行った。すなわち、HEp-2 細胞をカバーグラスを入れた 6 ウェルプレート (ヌンク) で 37°C、48 時間、5% CO₂ 下で培養し、0.01M リン酸緩衝液 (PBS) で 3 回洗浄後、抗生物質を含まない Eagle MEM 培地 (2% fetal calf serum, 1% D-mannose 加) を加えた。被検菌は TSB で 37°C 一夜培養し、その菌液を培地の 1/20 量、細胞に接種し、37°C 30 分、5% CO₂ 下で培養した。PBS で 5 回洗浄後、再び上記培地を加え、37°C 3 時間、CO₂ 下で培養した。細胞を PBS で 3 回洗浄し、乾燥後ギムザ染色を行い、細胞が付着したカバーグラスをスライドグラスに封入し、菌の細胞への付着状況を顕微鏡により観察した。付着の観察では細胞及びその周囲のガラスの両方に菌がレンガを積んだようなあるいは蜂の巣状など連鎖状配列しているものを凝集性付着として観察した。

7. プラスミドの検出

プラスミドの検出は Kado と Liu の方法¹²⁾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。

8. パルスフィールド電気泳動法 (PFGE)

国立感染症研究所の New Protocol に準拠して、制限酵素に Xba I を使用し、既報^{1,3)}と同様に行った。

結 果

1. 患者の発生状況及び症状

学校給食を喫食した 288 名のうち、229 名が発症し、発症率は 79.5 % と高かった。図 2 に日別発生状況を示したが、9 月 15 日 87 名、16 日 63 名と 2 日間で患者の 65.5 % が発生し、一峰性のピークがみられたが、17 日以降 21 日まで患者が発生していた。

症状別発現状況を表 2 に示したが、腹痛 79.9 %、下痢 76.4 % が発現率が高く、主要症状であった。

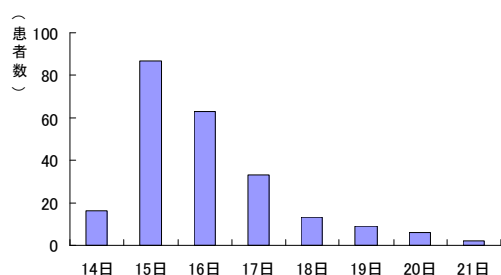


図 2 日別患者発生状況

表 2 症状別発生状況

症状	患者数	発現率 (%)
腹痛	183	79.9
下痢	175	76.4
吐き気	26	11.4
嘔吐	24	10.5
発熱	25	10.9
倦怠感	47	20.5

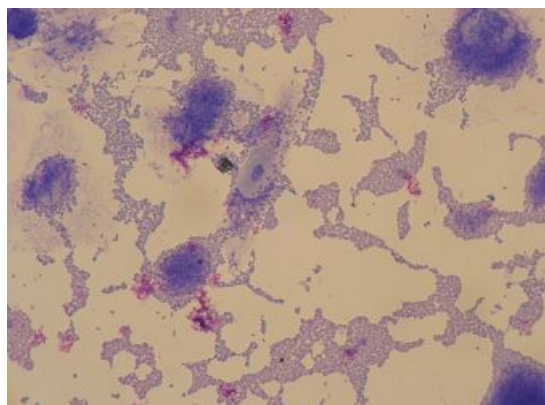
2. 疫学調査

患者から大腸菌 O44:H18 分離されたことから使用水の調査が行われたが、給食施設は水道水を使用し、毎日残留塩素が確認されていた。また、別システムの貯水槽を持つ学校の水道も検討されたが、給食施設の水道水しか使用しない調理従事者も同様に発症していることから、否定された。喫食調査から 11 日から 13 日の給食を食べていない発症者はいるが、14 日の給食を食べていない者に発症者はいないことが判明した。また、保健所で 13 日及び 14 日の給食について、食品別マスターテーブルを作成し、カイ 2 乗検定を行ったところ、14 日の提供 3 品（カレーそば丼、高野豆腐のバンバンジー、ワンタンスープ）すべてにおいて 1 % の危険率で原因食品と判定されたことから、14 日の給食が原因食品と推定された。

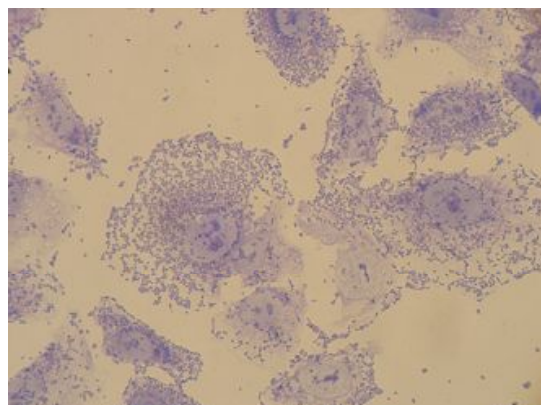
3. 細菌検査

施設ふきとり及び食品からは食中毒菌は分離されなかった。また、増菌培地から *aggR*、*astA* 遺伝子は検出されなかった。

患者糞便 24 検体中 10 検体、調理従事者糞便 4 検体中 3 検体（うち 2 名発症）から O44:H18 が分離された。分離された 13 株の O44:H18 はすべて *aggR* 及び *astA* 遺伝子を保有していたが、他の病原因子である VT1、VT2、LT、STh、STp、*invE*、*ipaH*、*eaeA*、*bfpA* 遺伝子は保有していなかった。また、性状検査により、運動性の弱い 12 株と運動性の強い 1 株に分かれた。



分類①株 (凝集性付着)



分類③株 (細胞周囲への付着)

図 3 HEp-2 細胞への付着性試験

4. 薬剤感受性試験

分離された O44:H18 の薬剤感受性試験結果を前述の運動性の違いを含めて表 3 に示した。10 株はすべての薬剤に感受性であったが、FOM 耐性が 2 株、SM、TC の 2 剤耐性が 1 株みられた。運動性との組合せで、①運動性弱い・感受性 10 株、②運動性弱い・FOM 耐性 2 株、③運動性強い・SM、TC 耐性 1 株に分類された。

表 3 分離された O44:H18 の運動性と薬剤耐性

型	運動性	薬剤耐性型	株数
①	弱い	感受性	10
②	弱い	FOX	2
③	強い	SM,TC	1

5. HEp-2細胞への付着性試験

前述の分類①、②の株では凝集性付着が、分類③の株では細胞周囲のみの付着がみられ、付着性が異なっていた。図 3 に分類①及び分類③の付着性の写真を示した。再度試験に使用した増菌培地 TSB の PCR を行ったところ、①、②の株では *aggR* 遺伝子が検出されたが、③の株では検出されなかった。

6. プラスミドの検出

図 4 にプラスミドの保有状況を示したが、分類①、②の株は約 110kb、分類③の株は約 150kb のプラスミドを保有していた。

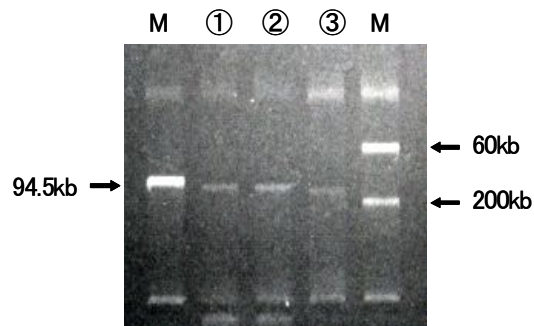
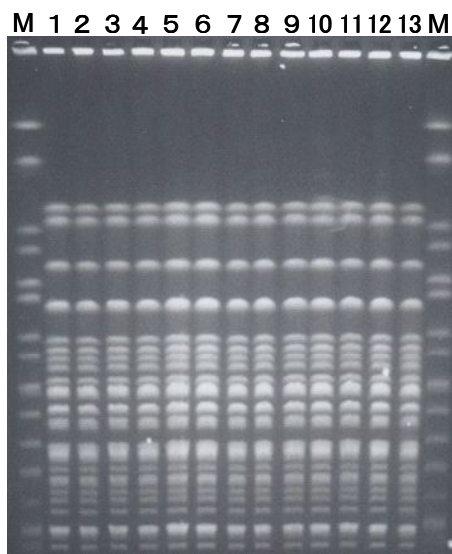


図 4 プラスミドの保有状況

7. PFGEによるDNA切断パターン

当所では今回の事例以外に O44:H18 が分離されたことがないため、13 株のみの比較ではあるが、図 5 に示したようにすべての株が同一のパターンを示した。



M: *Salmonella* Braenderup (サイズマーカー)

1 ~ 7 分類① 患者由来

8 ~ 10 分類① 調理従事者由来

11 ~ 12 分類② 患者由来

13 分類③ 患者由来

図 5 PFGE による DNA 切断パターン (*Xba* I)

考 察

今回の事例は、施設ふきとり及び食品から原因菌は分離されなかったが、発症者の共通食が学校給食に限られていること、発症のピークが一峰性を示していること、細菌検査で複数の患者糞便から *aggR* 及び *astA* 遺伝子を保有する大腸菌 O44:H18 が分離されたこと、発症者の症状が腹痛、下痢と共通することから、O44:H18 を病因物質とした学校給食による食中毒と断定された。発生状況、喫食状況、カイ 2 乗検定から 14 日の給食が原因食品と推定されたが、食品を特定することはできなかった。調理従事者からも O44:H18 が分離されたが、常に同じ給食を喫食し、15 日以降に発症していることから、調理従事者からの汚染も確認できなかった。使用水の汚染も否定されたことから、O44:H18 汚染の原因は確認できなかった。

分離された O44:H18 は 3 つの型に分かれたが、結果で示した分類①、②の 12 株は HEp-2 細胞に凝集性付着がみられ、*aggR* 及び *astA* 遺伝子を保有していたが、他の病原因子は保有していなかった。EAggEC の定義

は「既知の腸管毒素、ST、LT を持たない凝集性付着を示す大腸菌」¹⁴⁾ であることから、①、②の 12 株は EAggEC であると考えられた。特に、今回分離された O44:H18 は重要な病原性血清型で、世界各地でしばしば病例から分離される¹⁵⁾ とのことである。そして、分類③の 1 株は検査、保存の過程で *aggR* 遺伝子が脱落したことが推測された。また、①、②の株は約 110kb (約 70Md) のプラスミドを保有していたが、EAggEC の付着性因子は 48 ~ 82Md のプラスミドにコードされることが報告¹⁶⁾ されており、プラスミドの保有も EAggEC に該当した。③の株は約 150kb (約 100Md) のプラスミドを保有していたが、この株だけ SM、TC の耐性を示したことから、R プラスミドの可能性もあり、今後検討したいと考えている。さらに②の 2 株も FOM 耐性を示し、他の 10 株が感受性であることから、この耐性が患者の体内で獲得されたものか興味深いところである。このように、薬剤感受性、プラスミド、運動性に違いはあるものの、PFGE による DNA 切断パターンはすべて同じパターンを示したことから、同一由来の菌であることが示

唆された。

わが国では EAggEC による散発下痢症の報告はあるが、食中毒、集団下痢症の発生報告は少ない。今回、食品から原因菌が分離されず、疫学調査からも原因は不明であったが、*aggR* 及び *astA* を保有する EAggEC O44:H18 が食中毒の原因菌であることは確認された。このように原因菌を確定し、解析することで、食中毒菌としてはまれにしかみられない EAggEC のデータ蓄積に貢献できたらと考えている。

謝 辞

EAggEC 陽性株の分与並びに EAggEC についてご指導頂いた国立感染症研究所感染症情報センター伊藤健一郎博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Nataro, J.P., et al: Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 6, 829 ~ 831 (1987)
- 2) Bhan, M.K. et al: Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in india, *J. Infect. Dis.*, 159, 1061 ~ 1064 (1989)
- 3) Gomes, T.A., Blake, P.A. and Trabulsi, L.R.: Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and regative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls, *Clin. Microbiol.*, 27, 266 ~ 269 (1989)
- 4) 塚本定三, 竹田美文: ブラジル, ミャンマーおよびわが国の下痢症患者からの腸管集合性大腸菌の検出と分離菌の血清型, *感染症誌*, 67, 289 ~ 293 (1993)
- 5) 河野喜美子ら: 散発下痢症患者からの腸管凝集性大腸菌の検出, *感染症誌*, 72, 1275 ~ 1282 (1998)
- 6) 加藤玲, 尾形和恵, 山田澄夫: 散発下痢症患者由来大腸菌の腸管病原性大腸菌 (EPEC) *eaeA* 遺伝子および腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) *aggR* 遺伝子保有状況とその病原性の評価, *感染症誌*, 76, 721 ~ 729 (2002)
- 7) 山崎貢ら: 散発下痢症における腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) の分布調査— EAggEC の検出率、血清型、年齢分布及び季節変動について—, *愛知衛所報*, 56, 1 ~ 8 (2006)
- 8) Itoh, Y., et al: Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness, *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2546 ~ 2550 (1997)
- 9) 長谷篤ら: 2000 年に大阪市内の食中毒原因調査において検出された下痢原性微生物と主な事件の概要, *大阪市立環科研報告*, 63, 1 ~ 6 (2001)
- 10) 厚生省監修: 微生物検査必携細菌真菌検査, 第 3 版, D43 ~ 54, 日本公衆衛生協会, 東京 (1987)
- 11) 大沼正行, 野田裕之, 金子通治: 山梨県における下痢原性大腸菌の細胞付着性因子保有状況, *山梨県衛公研年報*, 45, 30 ~ 33 (2001)
- 12) Kado, C.I. and Lui, S.T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, 145, 1365 ~ 1373 (1981)
- 13) 野田裕之ら: 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, *山梨県衛公研年報*, 49, 18 ~ 23 (2005)
- 14) Nataro, J.P. and Kaper, J.B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 142 ~ 201 (1998)

- 15) 坂崎利一, 杉山和之: "A 細菌感染症
4*Escherichia coli* d 腸管凝集接着性大腸菌
(EAEC), 254 ~ 265, 食水系感染症と細菌
性食中毒, 坂崎利一編集, 中央法規出版, 東
京 (2000)
- 16) Yamamoto, T., et al: Localized, aggregative, and
diffuse adherence to HeLa cells, Plastic, and
human small intestines by *Escherichia coli*
isolated from patients with diarrhea, *J. Infect.*
Dis. 166, 1295 ~ 1310 (1992)