

# 2014 年に沖縄県で発生した非典型的な生化学的性状を示す腸管出血性大腸菌 O111 の集団感染事例

高良武俊・岡野祥・新垣絵理・久高潤・  
池田勉\*・伊本剛\*・大屋記子\*

## The outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 with atypical biochemical characteristics in Okinawa prefecture (2014)

Taketoshi TAKARA, Sho OKANO, Eri ARAKAKI, Jun KUDAKA,  
Tsutomu IKEDA, Tsuyoshi IMOTO, Fumiko OOYA

**要旨：** 2014 年 8 月，八重山保健所管内 A 保育園において 1 名の腸管出血性大腸菌（EHEC）O111（VT1）患者が発生した。管轄保健所による保育園の園児，職員及び陽性者の家族を対象とした接触者調査の結果，31 名中 4 名から O111 が分離された。本事例において分離された 5 株についてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による分子疫学解析を行ったところ，同一のバンドパターンであった。また，生化学的性状試験を行ったところ CLIG において MUG 陰性，LIM においてリジンデカルボキシラーゼ陰性，インドール陰性，運動性陰性という非典型的な生化学的性状を示した。病原因子遺伝子検査を行ったところ VT1 及び *eae* 陽性であった。以上の結果から，本事例は同一保育園における非典型的な生化学的性状を示す O111 集団感染事例と明らかとなった。

**Key words:** 腸管出血性大腸菌，O111，非典型的な生化学的性状，インドール陰性，集団感染事例

## I はじめに

大腸菌は，ヒトや動物の腸管内常在菌の一つである。病原因子の獲得によりヒトに対して病原性を獲得したものは下痢原性大腸菌 diarrheagenic *E. coli* と総称される。下痢原性大腸菌の中でベロ毒素（VT）を産生するものは腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *E. coli*（EHEC）と呼ばれ，軽傷の下痢から多量の血液が混じった出血性下痢や重症化して生命を脅かす溶血性尿毒症症候群（HUS）や急性脳症を引き起こす<sup>1)</sup>。感染症法において 3 類感染症に分類される。

2014 年 8 月に八重山保健所管内 A 保育園において非典型的な生化学的性状を示す腸管出血性大腸菌 O111 による集団感染が発生した。事例の概要と分離された O111 の性状について報告する。

## II 方法

### 1. 生化学的性状試験

分離株を DHL（栄研化学株式会社），マッコンキーマ天培地（栄研化学株式会社），CT-SMAC（栄研化学株式会社），CT-RMAC（栄研化学株式会社），CT-SBMAC（栄研化学株式会社）及びクロモアガー-STEC（関東化学株式会社）に塗抹し，37°C で 18 時間培養し，コロニー性状

を確認した。CLIG（極東製薬工業株式会社），TSI（日水製薬株式会社），LIM（日水製薬株式会社），シモンズクエン酸塩寒天培地（栄研化学株式会社）に塗抹し，37°C で 18 時間培養し鑑別性状試験を行った。また，API20E，API50CH を用いて同定結果の確認を行った。

### 2. 血清型別試験

O 群別試験，H 型別試験は病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ生研株式会社）を用いて行った。同様に赤痢菌免疫血清「生研」（デンカ生研株式会社）を用いて血清型別試験を行った。また，病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル」<sup>2)</sup>及び Iguchi らの報告<sup>3)</sup>に示された O111 の O 抗原合成遺伝子のプライマー配列に従って検出を行った。

### 3. 病原因子遺伝子検査

下痢原性大腸菌の病原因子である VT1, VT2, LT, ST, *ipaH*, *eae*, *aggR*, *astA* 及び *afaD* について PCR 法を行った。

### 4. *Escherichia albertii* (*E. albertii*) 鑑別検査

*E. albertii* の暫定的な検出法として示されている 3 種遺伝子 (*lysP*, *mdh*, *clpX*) のマルチプレックス PCR を行った<sup>4,5,6)</sup>。

\* 沖縄県八重山保健所

### 6. 16S rRNA 遺伝子解析

16S rRNA 遺伝子を F プライマー-27F (AGAGTTTGTAT-CMTGGCTCAG) 及び R プライマー (CGGTTACCTT-GTTACGACTT) を用いて増幅し<sup>7)</sup>, 遺伝子解析装置 Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて DNA の塩基配列を決定した. 得られた塩基配列を用いて DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) の Blast 検索を行った.

### 7. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

被検菌及び *Salmonella* Braenderup H9812 を血液寒天培地に塗抹し, 37°C で 17 時間培養したものを供試菌株とした. 九州ブロックマニュアル<sup>8)</sup> を参照して検体の調整を行い, CHEF DR-III を用いて電圧 6 V/cm, Initial Switch time 6.8 s, Final Switch time 35.4 s, Included Angle 120°, 18.1 時間の条件で泳動した.

## III 結果

### 1. 事例の概要

2014 年 8 月 11 日, 八重山保健所管内の B 医療機関より O111 (VT1) 患者 (1 歳女児) の感染症発生届出が保健所にあった. 同保健所により接触者調査として届出患者の家族 3 名, 同患者が通園する A 保育園 1 歳児クラスの園児 17 名及び職員 4 名の計 24 名の検便検査を実施した結果, 園児 4 名から O111 が分離された. なお, 新たな陽性者 4 名の家族 7 名の検便検査も実施されたが全員陰性であった (表 1). 当所では初発患者株及び接触者調査で分離された 5 株について生化学的性状試験, ペロ毒素を含む各種病原因子遺伝子検査, PFGE による分子疫学解析を実施した. 同年 9 月 2 日, 便検査において O111 感染者全員の連続 2 回の陰性が確認され, 本事例は終息した.

### 2. 生化学的性状検査

分離株 5 株すべて DHL, マッコンキー寒天培地, CT-SMAC, CT-RMAC, CT-SBMAC, クロモアガー STEC 平板培地上で典型的な O111 のコロニー性状を示した. TSI, シモンズクエン酸寒天培地においても同一の生化学的性状を示したが, 一般的な大腸菌と異なり CLIG において MUG 陰性, LIM においてリジנדカルボキシラーゼ陰性, インドール陰性, 運動性陰性という非典型的な生化学的性状を示した.

API20E では *Citrobacter freundii* (%ID 82.7, T 0.84, 非典型反応 CIT 75%, H2S 75%), API50CH では *Escherichia coli* 1 (%ID 99.6, T 0.78, 非典型反応 IND 93%) と判定された.

表 1. 接触者の便検査結果

	検査対象者 (届出患者を除く)	陽性数
園児	17	4
職員	4	0
陽性者の家族	10	0

### 3. 血清型別試験

O 群別試験では分離株 5 株とも O111 と確認された. 赤痢菌の多価血清に凝集は見られなかった. 病原体検出マニュアル<sup>2)</sup> 及び Iguchi らの報告<sup>3)</sup> それぞれで示されたプライマーを用いたところ, 両プライマーによって O111 の O 抗原合成遺伝子が検出された. また, H 型別試験は運動性陰性のため型別不能であった.

### 4. 病原因子遺伝子検査

病原因子遺伝子検査では, 分離株 5 株とも VT1 及び *eae* が検出され, 他病原因子は検出されなかった.

### 5. *Escherichia albertii* 鑑別検査

大腸菌, 赤痢菌, *E. albertii* が増幅する PCR ポジティブコントロール *clpX* だけが増幅し, *E. albertii* 特異的である *lysP* 遺伝子及び *mdh* 遺伝子は検出されなかった.

### 6. 16S rRNA 遺伝子解析

16S rRNA 遺伝子解析を行い, 得られた塩基配列を用いて Blast 検索を行ったところ, *Escherichia coli* O111:H- str. 11128 と 99.8% 以上の最も高い相同性を示した (E value = 0.0, 1504 塩基中 1502 塩基一致). また, O157 や O103 等の *E. coli* と同程度の相同性を示し, *Citrobacter freundii* とは相同性を示さなかった.

### 7. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

PFGE による分子疫学解析の結果, 分離株 5 株とも同一パターンを示した (図 1). Tenover らの判断基準<sup>9)</sup> から本事例は, 症例間に疫学的な関連があり, かつ PFGE 型が同一であるため, 同一の集団感染事例と判断された.

## IV 考察

本事例は, 保健所での検便検査において, O 群別試験では O111 と判定されたものの, LIM においてリジנדカルボキシラーゼ陰性, インドール陰性, 運動性陰性を示し, 典型的な性状に合致しないという報告を受けた分離株が搬入された. 当所では, LIM においてリジנדカルボキシラーゼ陰性, 運動性陰性の大腸菌株の分離事例はあるが, インドール陰性は初めてであったため各種追加試験を行い, 確認を行った. その結果, 非典型的な生化学的性状を示す *E. coli* O111 と判断した.

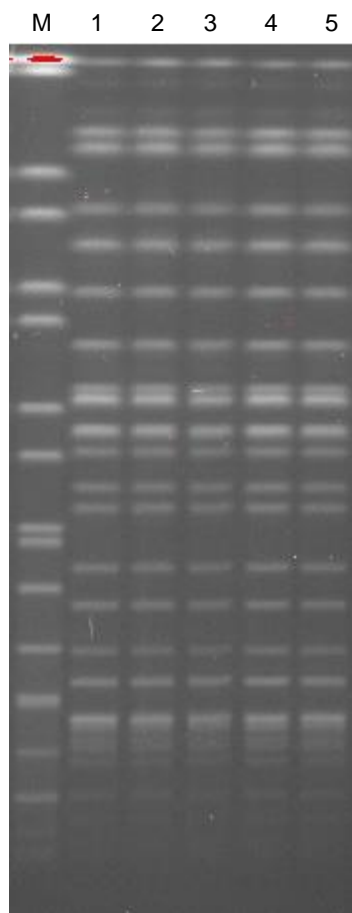


図 1 分離株 O111 の PFGE 泳動像 (XbaI 消化)  
 レーン 1: マーカー (*Salmonella* Braenderup H9812)  
 レーン 2: 園児 A (初発患者)      レーン 3: 園児 B  
 レーン 4: 園児 C                      レーン 5: 園児 D  
 レーン 6: 園児 E

16S rRNA 遺伝子解析を行ったところ、O111 等の *E. coli* と最も高い相同性を示し、*Citrobacter freundii* とは相同性を示さなかったことから *E. coli* と同定した。本事例は、感染源は不明であるが、PFGE による分子疫学解析の結果も含めて非典型的な生化学的性状を示す O111 による集団感染事例であることが明らかとなった。

LIM で行う生化学的性状試験は、大腸菌のみならず腸内細菌科やビブリオ科の一次鑑別試験として重要である。大腸菌のインドール産生能は *E. coli* は 98%陽性で、*E. coli* inactive でも 80%陽性であり<sup>10)</sup>、通常インドール陰性株は一次鑑別試験の段階で除外される。インドール陰性の腸管出血性大腸菌 O111 の報告はこれまでなく、今回の事例は極めて珍しい事例と考えられた。API20E の結果では *Citrobacter freundii* と判定されることからインドール陰性株は誤判定される恐れがあり、今後

LIM において、リジンデカルボキシラーゼ陰性、インドール陰性、運動性陰性の大腸菌も視野に入れて分離を進める必要があると考えられる。

## V 参考文献

- 1) 藤井潤 (2013) B. 大腸菌. 戸田新細菌学, 317-327.
- 2) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル」
- 3) Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, and Thomson NR (2015) A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.*, 22: 101-107.
- 4) 村上光一・江藤良樹・小迫芳正・川村好章・伊藤健一郎 (2012) *Escherichia* の新種 *E. albertii* について. 病原微生物検出情報 IASR, 33: 134-136.
- 5) Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, Young VB and Whittam TS (2005) Evolutionary Genetics of a New Pathogenic *Escherichia* Species: *Escherichia albertii* and Related *Shigella boydii* Strains. *J Bacteriol.*, 187:619-628.
- 6) Oaks JL, Besser TE, Walk ST, Gordon DM, Beckmen KB, Burek KA, Haldorson GJ, Bradway DS, Ouellette L, Rurangirwa FR, Davis MA, Dobbin G and Whittam TS (2010) *Escherichia albertii* in Wild and Domestic Birds., 16:638-646.
- 7) Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR and Fields MW (2006) Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athallassohaline lake in northwestern China., 6:3832-3845.
- 8) 堀川和美他 (2003) 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 平成 15 年度総括・分担研究報告書, 154-163.
- 9) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing., 33:2233-22339.
- 10) Patrick R Murray, Ellen Jo Baron, James H Jorgensen, Marie Louise Landry and Michael A Pfaller (2007) *Manual of Clinical Microbiology* 9th Edition.