

保育園での集団発生事例におけるEHEC O157:H7の菌学的特性の検討

Examination of Bacteriological Character of EHEC O157:H7 in a Mass Outbreak Example in Nursery School

多田 千鶴子
Chizuko TADA

砂原 千寿子
Chizuko SUNAHARA

多田 芽生
Megumi TADA

要 旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）による感染症は1999年4月から施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では、3類感染症に位置付けられた。強い感染力と病原性を有し、特に乳幼児では重篤化する傾向が強い。このEHEC O157:H7 VT1, VT2による集団発生が県下のK市A保育園で保育園児17名、接触者4家族5名の感染者が確認された。本事例は、2004年7月16日に0歳女児からEHEC O157:H7 VT1, VT2の届け出があった。感染経路の究明のため、接触者検便（T保健所）保存食、施設の拭き取り等の検査を実施した。しかし、感染経路は特定できず8月16日の最終分離までの感染者数は22名に達し終息した。分離株の関連性を調査するため、H抗原、薬剤感受性試験、PCR、PFGE法を実施した。分離された22株は、H7抗原を持ち、PFGEパターンは同じパターン（ND II a 1）を示し関連株であることが考えられた。本事例の分離株は、2004年5月から7月下旬にかけて奈良県、京都市の散发事例から分離された菌株とPFGEパターンが同じことから、関連性が示唆された。

キーワード：腸管出血性大腸菌（EHEC）・PFGE・VT1・VT2

I はじめに

2004年は全国的に腸管出血性大腸菌が例年より感染者が多い傾向にあった。¹⁾香川県における、腸管出血性大腸菌の感染者は1996年の感染者51名であったが、2004年は65名（腸管出血性大腸菌O157感染者60名、その他の腸管出血性大腸菌感染者5名）で1966年より14名多く過去最多の感染者であった。

本事例は7月中旬に香川県西讃のA保育園の0歳児から2歳児にEHEC O157:H7 VT1, VT2が集団発生した。今回この集団発生において糞便より分離された菌株EHEC O157:H7 VT1, VT2の菌学的特性を検討するためにH抗原、PCR、DNA解析、薬剤感受性について検査した。また、集団発生経路及び原因究明のために保存食と拭き取り検査等を実施したので報告する。

II 材料及び方法

A保育園より採取した保存食41検体、拭き取り検査27検体、プール水等3検体の計71検体を常法にしたがって菌検索をおこなった。

また、保育園児と接触者の検便216検体はT保健所と当センターとの両施設で腸管出血性大腸菌の検索をおこなった。常法にしたがって分離培地はCTSM培地、BTB培地、増菌培地はmEC培地を使用した。分離後疑わしいコロニーは生化学的性状検査、血清型別を行い同定した。PCR法で病原因子の確認をおこなった。見逃しをなくすためにすべての検体においてVeroto毒素遺伝子(VT1)(VT2)検査をPCR法でおこなった。

分離株22株について確認試験としてH抗原抗血清をもちいてH抗原、PCR(polymerase chain reaction)、を実施し、PFGE法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis)で遺伝子パターンの比較をおこなった。また、薬剤感受性試験も実施した。^{2) 4)}

1 PFGEによる分離株のDNA解析

分離株を制限酵素XbaIでDNAを切断後、*Salmonella* Braenderup H 9 8 1 2 PulseNet Standard Strainを用いてPFGE法によりDNAの泳動パターンを比較した。PFGE試験法は国立感染症研究所（以下感染研と略す。）によって示された方法に準拠した。²⁾

2 菌株の薬剤感受性試験

薬剤感受性試験はNCCLS法(National Committee For Clinical Laboratory Standards)の規格に準拠した。Sensi-Disc (BBL) 一濃度ディスク法で菌液マクファーランド0.5濃度にてミューラーヒントンII培地(150×15mm)を用いて実施した。³⁾ 使用した薬剤ではペニシリン系はABPC(アンピシリン10)・ABPC/CVA(オークメンチン30)・アミノグリコシド系SM(ストレプトマイシン10)・KM(カナマイシン30)・GM(ゲンタマイシン10)・テトラサイクリン系TC(テトラサイクリン30)・セフェム系CTX(セフォタキシム30)・その他の抗菌剤CFX(シプロフロキサシン5)・CP(クロラムフェニコール30)・ST(ST合剤)・NA(ナリジクス酸30)・FOM(ホスホマイシン50)の12薬剤を使用した。

III 調査結果

1 接触者検便および調査

2004年7月16日M総合病院よりA保育園児0歳女児からEHEC O157の発生届けがあった。保健所で、その家族と接触者の検便3名を実施した結果、その母親からEHEC O157が検出された。その後A保育園児の1歳男児からEHEC O157が検出されたとの届けがあった。2名の園児とも同じA保育園児に通っていることから集団発生の可能性が強いと考えられ、7月26日から7月28日にかけて園児27名と職員15名の検便をT保健所と当環境研究センターの両検査施設で実施した。その結果、新たに保育園児10名(0歳男児2名・1歳男児5名・1歳女児3名)にEHEC O157が検出された。その後、未検査者や、有症者などが現れたので拡大防止と感染者を増やさないために、残りの園児、家族、接触者等の検便をさらに実施した。

表1・2に示すように集団発生による総検便検体数216検体(保育園児109名・職員22名・患者家族等の接触者85名)を実施した。感染者は増加し、8月1

6日に最終感染者は22名となった。とくに1歳児10/21名(47.6%)に多く感染がみられ、つぎに0歳児4/10名(40.0%)、2歳児3/20名(15.0%)の感染率であった。3歳児から5歳児の感染者は見られず0歳児から2歳児に偏っていた。また、職員の感染者は見られなかった。園児以外では4家族の5名がEHEC O157に感染していた。母親2名、祖母1名、他の保育園児2名(兄姉が他の保育園に通っている)であった。接触の機会が多い母親と祖母への感染がみられたが、父親への感染はなかった。

表1 保育園児の検便実施状況及び結果

区分	対象数	検便実施数		対象人員内訳	
		医療	行政	陽性者	陰性者
0歳児	10	2	8	4	6
1歳児	21	3	18	10	11
2歳児	20	0	20	3	17
3歳児	17	0	17	0	17
4歳児	21	0	21	0	21
5歳児	20	0	20	0	20
園児計	109	5	104	17	92

表2 接触者等の検便実施状況及び結果

区分	対象数	検便実施数		対象人員内訳	
		医療	行政	陽性者	陰性者
職員	22	7	15	0	22
家族等	85	0	85	5	80
計	107	7	100	5	102

表3, 4, 5に示すように患者の症状は、下痢13名(59.0%)無症状8名(36.3%)発熱5名(22.7%)腹痛2名(9.0%)嘔吐2名(9.0%)であった。

便の状態は、固形便9名(40.9%)軟便5名(22.7%)水様便7名(31.8%)血便と水様便1名(4.5%)であった。無症状で固形便の者が特に大人3/4名(75%)と多く、有症者は1名のみだった。

また、発症時期の特別なピークは認められなかった。家族内での発症時期から、患者あるいは感染者によりEHEC O157の二次感染がA保育園に集団発生したものである。

表3 EHEC O157 陽性者(有症者)の下痢症状等の出現期間

月日	7月																
No	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	血便・水様便 下痢						0歳児, 11日受診, 16日検出										
2							水様便 下痢		45歳, 16日受診, 19日検出								
3	1歳, 20日受診, 23日検出						水様便 下痢										
4	1歳, 23日受診, 28日検出											軟便下痢					
5	2歳, 20日受診, 29日検出											軟便下痢→28日					
9	1歳, 20日受診, 29日検出						水様便 下痢										
10	3歳(家族), 8/1受診, 31日検出											軟便, 下痢 → 31日					
15	0歳, 受診不明1歳, 29日検出											水様便下痢					
16							水様便下痢		2歳, 15日受診, 1日検出								
18	1歳, 20日受診, 28日検出						水様便 下痢 → 28日										
19	1歳, 29日受診, 2日検出											軟便下痢8/1					
21	0歳, 15日受診, 29日検出						軟便, 下痢										
22	2歳, 21日受診, 3日検出											水様便 下痢					

表4 EHEC O157感染者の症状

症状	患者数 (%)
下痢	13 (59.0%)
無症状	8 (36.3%)
発熱	5 (22.7%)
腹痛	2 (9.0%)
嘔吐	2 (9.0%)

表5 EHEC O157感染者の便の状態

便の状態	患者数 (%)
固形便	9 (40.9%)
水様便	7 (31.8%)
軟便	5 (22.7%)
血便と水様便	1 (4.5%)

2 感染経路の究明

(1) 保存食等のEHEC検査

EHEC O157の感染源を究明するために保育園児が接している楽器, おもちゃ, 施設, 調理器具等のふき取り検査や保存食の細菌検査71検体のEHEC O157を主とする菌検索を実施した。

7月24日に便器, おもちゃ等のふき取り8件, 井戸水1件を検査, 7月27日に調理場や調理器具に関したふき取りとおしめ洗い場19検体, ベビーバス水1検体, 水道水1検体を検査した。7月2日から7月27日の保存食41検体は7月29日に実施した。(表6)

保存食, ふき取り検査等は腸管出血性大腸菌は検出されなかった。

食品記録簿によると肉, 魚, 牛乳などの保存温度は2~5℃であった。加工食品は8℃で保存されていた。水道水の残留塩素は0.4mg/Lであった。

表6 保存食・施設・玩具等のEHECの検査

種別	保存食	おもちゃ等	調理施設	井戸水	ベビーバス水	水道水	検体数計
検査日							
7月24日	0	8	0	1	0	0	9
7月27日	0	7	12	0	1	1	21
7月29日	41	0	0	0	0	0	41
成績	腸管出血性大腸菌(EHEC) 検出せず						

(2) 保育園の施設状況について

0歳児クラスと1歳児クラスは図1のように部屋の中にトイレを共有しており, トイレがある部屋を通して別のクラスへの行き来が自由にできるようになっていた。また, トイレの入り口にはドアがなく区切られていなかった。部屋の一部には汚染源となる汚物入れ, オムツ交換台などが設置されていた。

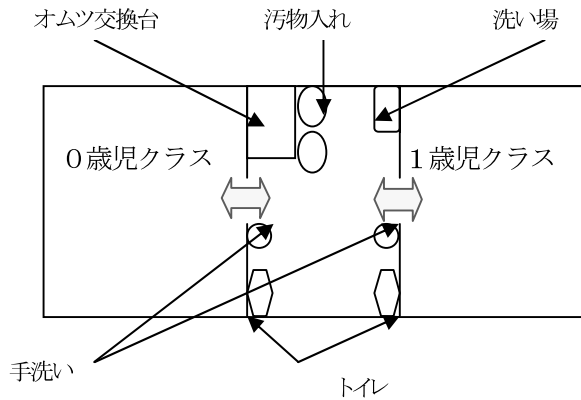


図1 0歳児・1歳児クラスの見取り図

3 菌学的検討

(1) PFGEによる分離株のDNA解析

制限酵素 *Xba*I を用いたPFGEパターンの解析結果は分離菌22株とも同じパターン (ND II a I) を示した。²⁾ 図2は感染者No13からNo22のPFGE解析です。分離した菌株のNo15、17は1本相違のバンドがみられた。また、No11、19、21は2本相違のバンドがみられた。すべての菌株は最初に届けられた患者由来株とPFGE法による同一な泳動パターンであった。(図2)(表8)

この泳動パターンは2004年5月下旬から7月下旬にかけて奈良県と京都市の散発事例から分離された株と同一パターンを示しており(感染研のコメント)関連性が示唆された。

PFGEパターン (ND II a I)

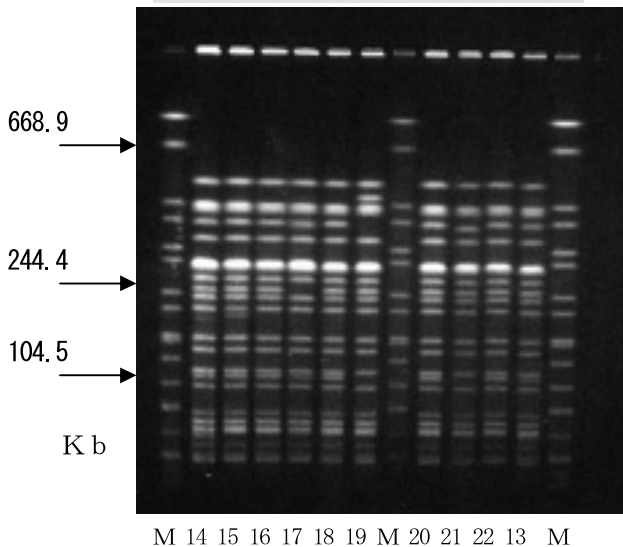


図2 感染者No13からNo22のPFGE

(EHEC O157の*Xba*I PFGEパターンのタイピング, サブタイピングは制限酵素*Xba*Iにて消化後, PFGE法により比較したDNAの泳動パターンのうち

100kb以下, 100-200kb, 350kbと, それぞれの3ヶ所の部分で比較して分類する。)

(2) 菌株の薬剤感受性試験

NCCLS法の規格に準拠し Sensi-Disc (BBL) を用いて一濃度ディスク法により12薬剤を使用した。

表7はNo1からNo22の菌株の薬剤感受性試験である。S (Susceptible) 感受性あり, I (Intermediate) は中間, R (Resistant) は耐性を表したものである。

表7 薬剤感受性検査

薬剤	AMP/C	S	T	CPFX	KM	CTX	CP	ST	AMP/CVA	GM	NA	FOM
1	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
2	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
3	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
4	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
5	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	I
6	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
7	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
8	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
9	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
10	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
11	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	I	S
12	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	I
13	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
14	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
15	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	I
16	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
17	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
18	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	I
19	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
20	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
21	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
22	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S

EHEC O157:H7VT1, VT2の感染者薬剤感受性検査は分離した22菌株すべてABPC・S M・TCは耐性(R)を示し, CPFX・KM・CTX・

CP・ST・GMは感受性(S)を示した。また、22菌株の薬剤感受性検査は4分類された。

①ABPC・SM・TC・AMPC/CVAの4薬剤耐性(R)が5株(22.7%) ②ABPC・SM・TC・AMPC/CVAの4薬剤耐性(R)がNA中間(I)

が1株(4.5%) ③ABPC・SM・TCの3薬剤耐性(R)AMPC/CVA・FOMの中間(I)が4株(18.2%) ④ABPC・SM・TCの3薬剤耐性(R)AMPC/CVA・の中間(I)が12株(54.5%)と分類された。

表8 EHEC O157:H7VT1, VT2感染者

No	園児及び家族		性別	年齢	便の状態	症状	毒素型	Xba I P F G E			
								<100kb	100~200kb	>200kb	
1	A	園児	女	0	血便・水様便	発熱・下痢	VT1 VT2	ND	II a	I	
2	A	母親	女	45	水様便	下痢	VT1 VT2	ND	II a	I	
3		園児	男	1	水様便	発熱・下痢	VT1 VT2	ND	II a	I	
4		園児	男	1	軟便	発熱・下痢	VT1 VT2	ND	II a	I	
5	B	園児	男	2	軟便	下痢	VT1 VT2	①	ND	II a	I
6		園児	男	1	固形便	無	VT1 VT2	ND	II a	I	
7		園児	女	1	固形便	発熱	VT1 VT2	ND	II a	I	
8	C	園児	女	1	固形便	無	VT1 VT2	ND	II a	I	
9		園児	男	1	水様便	発熱・下痢・嘔吐	VT1 VT2	ND	II a	I	
10	C	兄	男	3	軟便	下痢	VT1 VT2	ND	II a	I	
11	B	祖母	女	54	固形便	無	VT1 VT2	②	ND	II a	I
12		園児	女	0	固形便	無	VT1 VT2	ND	II a	I	
13	C	姉	女	5	固形便	無	VT1 VT2	ND	II a	I	
14		園児	女	1	固形便	無	VT1 VT2	ND	II a	I	
15		園児	女	0	水様便	下痢	VT1 VT2	①	ND	II a	I
16		園児	男	2	水様便	下痢	VT1 VT2	ND	II a	I	
17		園児	男	1	固形便	無	VT1 VT2	①	ND	II a	I
18	D	園児	女	1	水様便	腹痛・下痢	VT1 VT2	ND	II a	I	
19		園児	男	1	軟便	下痢	VT1 VT2	②	ND	II a	I
20	E	母親	女	30	固形便	無	VT1 VT2	ND	II a	I	
21	E	園児	女	0	軟便	嘔吐・下痢	VT1 VT2	②	ND	II a	I
22	D	園児	女	2	水様便	下痢・腹痛	VT1 VT2	ND	II a	I	

*A~D(5家族)

*①は1本相違のバンド・②は2本相違のバンドがある

IV 考察

2004年7月に発生したEHEC O157:H7 VT1, VT2の感染者は保育園児17名(0歳児4名, 1歳児10名, 2歳児3名) 4家族の5名で陽性者は22名に達した。

感染経路の究明のため、実施した保存食及び拭き取り

検査からの感染経路と感染源は特定できなかった。

また、保育園内では0歳児クラスと1歳児クラスの園児のみだったことから、簡易プールをクラスごとに利用していたことから簡易プールも感染源の一つと推察されるが原因究明につながる明確なデータは得られなかった。

今回の事例では、3歳児, 4歳児, 5歳児クラスへの

感染拡大はなく、職員にも感染者はいなかった。感染者が0歳児、1歳児、2歳児のみに偏っていること、保存食よりEHECが検出されなかったことなどから食品からの感染より、糞便を介して園児から園児へまたは、園児から家族への感染により集団発生した可能性が大きいと思われる。また、兄、姉が通っている他の保育園への感染を危惧したが他への感染拡大はなかった。

感染者の発症時期に特異的なピークは認められなかった。また、家族内での発症時期から患者あるいは感染者により保育園に広まり、更に二次感染、三次感染を起こしたものと推察される。

園児の排便後、食前の手洗いに加えて、トイレに出入りした後の園児の手洗いに充分配慮することが重要と思われる。今後の二次予防として、手洗いの励行、簡易プールの衛生管理の重要性が示唆された。

分離株の関連を調査するために実施したH抗原検査、VT遺伝子、PFGE法などの分子疫学検査をおこなった。糞便より分離された菌株22株は、すべてEHEC O157:H7VT1, VT2に分類された。

また、薬剤感受性検査は分離菌22株すべてABPC・SM・TCは耐性(R)を示し、CPFX・KM・CTX・CP・ST・GMは感受性(S)を示した。本事例での22株の薬剤感受性検査は4分類された。家族間、または、PFGE法のDNAバンドが1~2本相違がある菌株のグループ間での薬剤感受性の特徴は示さなかった。

PFGE法によるDNAの泳動パターンは分離菌22株とも同じパターンを示しており(3本以下の相違がみられる泳動パターンは流行株の可能性のあるとしている)関連株であることが示唆された。

本事例は2004年4月初旬から中旬にかけて香川県、(石川県、富山県、岡山県で散発したのと同じ)に散発したEHECとは異なった菌株だった。

1996年以来、県下で分離されたEHECからは本事例のPFGE法の同じ泳動パターンを示す分離株は確認されてなく、この泳動パターンは県下では初めての事例であった。

本事例の集団発生は2004年5月下旬から7月下旬にかけて奈良県と京都市での散発事例から分離された菌株と同じPFGEパターンを示しており(感染研コメント)感染時期と遺伝子解析などから関連性があるものと思われた。

V まとめ

- 1 2004年7月に発生したEHEC O157:H7VT1, VT2の感染者は0歳児から2歳児の17名と4家族の5名で陽性者は22名であった。
- 2 保存食、ふき取り検査等からEHECは検出されなかった。このことから感染経路は特定できないが糞便を介してヒトからヒトへの感染が推察された。
- 3 薬剤感受性検査は分離菌22株すべてABPC・SM・TCは耐性(R)を示し、CPFX・KM・CTX・CP・ST・GMは感受性(S)であった。また、薬剤感受性は4グループに分類された。
- 4 分離菌22株はPFGE法による同じ泳動パターン(ND II a I)を示しており、感染源は同じであると示唆された。
- 5 本事例は1996年以来、香川県ではPFGE法による初めての泳動パターンであった。この事例は5月下旬から7月下旬にかけて奈良県と京都市の散発事例から分離された菌株と同じND II a I型であることから関連性があると考えられる。

謝辞

国立感染症研究所細菌部、香川県薬務感染症対課・香川県中讃保健福祉事務所等のご協力と、資料提供に感謝します。

本稿の一部は、第50回四国公衆衛生学会(平成17年2月10日、於愛媛県松山市)で発表したものである。

文献

- 1) 国立感染症研究所, 厚生労働者健康局結核感染症課, 病原微生物検出情報 VOL25No6 (No292) (2004)
- 2) 国立感染症研究所 PFGE New Protocol (STEC, *Shigella*) (2003・9)
- 3) 抗菌薬ディスク感受性検査の性能標準—第5版: 承認標準 p14-34
- 4) 臨床と微生物, 病原性大腸菌 O157, VOL2, 3, 臨時増刊号 近代出版 (1996・12)