

## ベロ毒素産生性腸管凝集性大腸菌086:HNM感染による死亡例

上野伸広 吉國謙一郎 新川奈緒美  
有馬忠行 榎元磨加\* 永田告治

## 要 旨

1999年10月2日ベロ毒素産生性大腸菌感染が原因と思われる県内で初めての死亡例が報告された。患者から分離されたベロ毒素産生性大腸菌(Verotoxin-producing *E. coli*, VTEC)は血清型086:HNMでVT2を産生した。当菌は代表的なベロ毒素産生性大腸菌が持つ細胞付着因子(*eae*)を保有せず、腸管凝集性大腸菌(Enterocaggregative *E. coli*, EAggEC)特有のpCVD432及び*aggR*を保有しHEp-2細胞に凝集性付着することで、VTECとEAggEC両方の性格を兼ね備えた<sup>1)</sup>、これまで前例のない新しいタイプの大腸菌であった。一方、濃厚接触者3名から同一の生化学性状を示す086:HNMを分離したが、いずれもVT陰性であった。これらの患者株と濃厚接触者株は、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)により近縁種であることが判明したが、食品や環境から当菌を分離できなかったため、感染源の特定には至らなかった。

キーワード：086, ベロ毒素産生性大腸菌, 腸管凝集性大腸菌, 死亡例

## 1 はじめに

ベロ毒素産生性大腸菌(以下VTEC)086の国内でのヒトからの分離例は、96年に山形県の小児血便患者より分離されたVTEC086:HNM(VT2産生, *aggR*陰性)の報告<sup>2)</sup>があるのみである。更に死亡例は、イタリアでVTEC 086:H40(VT2産生)による報告<sup>3)</sup>がなされているだけである。

今回の事例の発生に伴い同菌の分離方法を検討し、濃厚接触者検便, 拭き取り, 食品等を調査した。その結果, 拭き取り, 食品等から同菌の分離はできなかったが、濃厚接触者3名より同様の性状を示す086:HNMを分離した。

これらの菌株について、The International *Escherichia* and *Klebsiella* Centreでの分析結果と当所で得た若干の知見をまとめたので報告する。

## 2 経緯

99年9月26日 3歳男児, 軟便で発症

9月27日 下痢, 血便, 腹痛のため近医受診, 入院

9月28日 痙攣, HUS発症, HUS治療機関病院へ転院

9月30日 依頼を受けた鹿児島大学医学部小児科にて27日の便培養からVT2遺伝子を検出

10月1日 同科より当該菌のVT再確認依頼を県衛生研究所(現環境保健センター)で受諾

10月2日 VT2遺伝子, 血清型, 生化学性状を確認  
患者はHUS及び脳症のため死亡

10月3日 RPLAでVT2毒素産生を確認

10月4日 濃厚接触者の検便搬入

10月5日 濃厚接触者2名より086様集落を純培養状に分離

10月6日 濃厚接触者2名から086:HNM VT陰性菌を確認

10月8日 患者血清中の抗086抗体価1:80を確認  
濃厚接触者1名よりIMS法で086:HNM VT陰性菌を分離

10月20日 濃厚接触者計3名と患者の086:HNMはPFGEの結果, 近縁種であることが判明

患者と同じ086:HNMを分離した濃厚接触者3名について、それぞれ平板の塗抹開始部分と086集落30株をPCRを用いてVT遺伝子を検索したが、すべて陰性であった。

一方、9月27日の患者便培養のBTB平板より30集落についてPCRを行ったが、086:HNM VT2陽性は1集落のみで、他にVT陽性のはなかった。

### 3 086:HNMの分離方法

感染経路の調査に先立って、患者から分離された086:HNMの性状を既存の培地で調べた。

増菌培地 mec-NB:発育せず TSB,GNBROTH:発育良好

分離培地 CT-SMAC,CT-RMAC,CT-SorboseMAC:発育せず

SS,MAC:発育良好(白色集落)

DHL:発育良好(ピンク集落)

確認培地 TSI:斜面半端な黄色,他は大腸菌様

LIM:L中間色,I陽性,M非運動性 VP:陰性

SC:陰性 CLIG:赤/橙色,蛍光陽性

Beutin培地:非溶血

これらのことから感染経路調査では、増菌:GNBROTH,集菌:Dynabeads M-280,分離培地:SS,DHLを使用した。

### 4 086の血清抗体価検査

患者が086による感染症に罹患していたのかを知るため、患者の抗体価検査を感染研の方法に準じて行った。

- ① 患者より分離された086:HNMを生理食塩水に懸濁し、オートクレーブ 20分
- ② ①を生理食塩水で2回遠心,洗浄,MCF6~7に調整
- ③ 患者血清を×10,×20,×40...×320と希釈し,試験管に0.5mlずつ,2系列準備
- ④ ②の菌液を③に等量加え(終濃度×20,×40,×80...×640),50℃一晚
- ⑤ 判定(終濃度1:40以上を陽性)

この試験管を使用した方法では、凝集像の判定が困難であったため、⑤の後、混和してマイクロプレート(V型)に50μlずつ移し、37℃数時間後に判定した。

その結果、9月28日及び10月1日採血の血清とも1:80を示し、086の感染による抗体価の上昇を認めた。

なお、感染研で実施した結果も同様であった。

## 5 分析結果と考察

### 5.1 病原因子

表1にThe International *Escherichia* and *Klebsiella* CentreでのVero Cell Assay, DNA probe法による分析結果と公衆衛生院微生物学部及び当所で実施したPCR

表1 086:HNMの病原因子保有状況

病原因子	患者株	A*	B*	C*	実施機関
VT1	-	-	-	-	C,鹿
VT2	+	-	-	-	C,鹿
<i>eae</i>	-	-	-	-	C,鹿
<i>bfpA</i>	-	-	-	-	C
<i>aggR</i>	+	+	+	+	C,鹿
EAST1	+	+	+	+	C,衛,鹿
EAF	-	-	-	-	C
DA	-	-	-	-	C
<i>ehxA</i>	-	-	-	-	C
STh	-	-	-	-	C,鹿
STp	-	-	-	-	C,鹿
LT	-	-	-	-	C,鹿
<i>inv</i>	-	-	-	-	C,鹿
<i>pet</i>	-	-	-	-	鹿

※ABC:濃厚接触者3名の分離株, +:PCR法と不一致  
C:The International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre  
衛:公衆衛生院微生物学部, 鹿:鹿児島県環境保健センター

等の結果を示した。

表1のとおり、患者株はVT2を産生し、EAggECが持つ*aggR*とEAST1を保有していた。このことから、患者株の086:HNMは、VTECとEAggEC両方の性質を兼ね備えたベロ毒素産生性腸管凝集性大腸菌であった。

一方、濃厚接触者3名より分離された同一の生化学性状を示す086:HNMは*aggR*とEAST1を保有しVT陰性であったことから、EAggECのカテゴリーに該当した。

なお、公衆衛生院微生物学部及び当所で実施したPCRによる*astA*遺伝子(EAST1)検査はすべての株で陰性であった。これはDNA probe法とPCR法の感度もしくは特異性の違いと思われた。

### 5.2 薬剤感受性試験

表2にセンシディスク(BBL)を使用し、Kirby-Bauer法で行った薬剤感受性試験の結果を示した。

阻止円の直径は、すべての薬剤において濃厚接触者3名の086:HNMは差を認めず、患者株との比較では若干の差はあるものの同様の結果であった。

また、今回分離された086:HNMすべての株でペニシリン系のABPC(アンピシリン)に耐性を示し、アミノグリコシド系のSM(ストレプトマイシン)は耐性から中間型であった。

これらの感受性パターンは、代表的なVTEC 0157等と比べ、特に変わった傾向ではなかった。

表2 086:HNMの薬剤感受性試験

薬剤略号	患者株	A*	B*	C*
ABPC	R(6)	R(6)	R(6)	R(6)
CTX	S(25)	S(25)	S(24)	S(24)
KM	S(24)	S(23)	S(23)	S(22)
GM	S(23)	S(22)	S(23)	S(23)
SM	I(12)	R(11)	I(12)	I(12)
TC	S(22)	S(20)	S(21)	S(21)
CP	S(24)	S(23)	S(22)	S(24)
CPFX	S(38)	S(35)	S(36)	S(35)
TMP	S(29)	S(27)	S(27)	S(27)
NA	S(24)	S(22)	S(20)	S(22)
FF	S(21)	S(22)	S(23)	S(21)
ST	S(28)	S(26)	S(26)	S(25)

※ABC: 濃厚接触者3名の分離株 S: 感受性, I: 中間型,  
R: 耐性, ( )中は阻止円の直径(mm)を示した

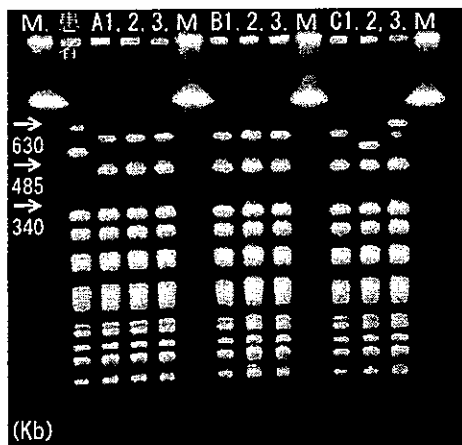


図1 PFGE (制限酵素: Xba I)

泳動条件: 電圧 6 V/cm, 泳動角度 120°  
泳動時間 5~50秒 22時間

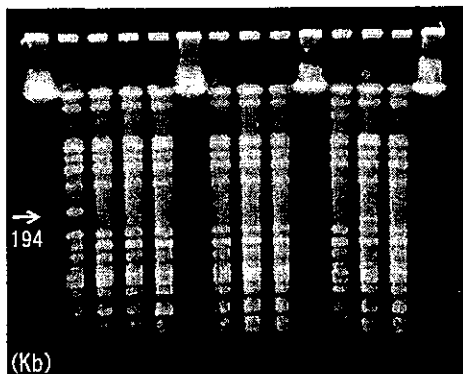


図2 PFGE (制限酵素: Not I)

泳動条件: 電圧 6 V/cm, 泳動角度 120°  
泳動時間 0.5~35.4秒 20時間

## 5. 3 PFGEによる遺伝子解析

PFGEに供した菌株は、患者分離株1株と濃厚接触者分離株から無作為に選んだ各3株ずつの計10株で行った。

図1に制限酵素 Xba I による切断パターンを示した。340Kb以下のパターンは、すべての菌株で同一と思われた。一方、340Kbを越えるパターンでは①患者、②A、B 1~3、③C 1、④C 2、⑤C 3の5つのパターンに分類された。患者由来株は、C 3を除くすべての株より遺伝子断片が多く、500Kb付近の特徴的な濃いバンドが観察された。更に、4バンド程度の違いから患者由来株とC 3株は、他に比べ最も近縁と思われた。

図2の Not I による切断パターンでは、①患者、②A、B 1~3、C 3、③C 1、④C 2の4つのパターンに分類された。また、患者株には194Kb付近の特徴的なバンドを認めた。更に、患者株は2バンドの違いにより、A、B 1~3、C 3株と近縁種であると思われた。

これらのことから、患者と濃厚接触者3名は同一汚染源から派生した086に感染したと推測するが、なぜ死亡した患者のみVT産生菌が感染したのか、食品や環境中から086が分離できなかったため、詳細は不明である。

今後は、PFGE解析ソフトを使用し詳細な分析を行うとともに、患者株が持つ特徴的なバンドにどのような遺伝子が含まれているのか、サザンハイブリダイゼーション等を用いて更に検討を加えたい。

## 謝 辞

本事例に関しまして、ご指導ご協力くださいました福岡県保健環境研究所 堀川和美博士、国立公衆衛生院微生物学部 伊藤健一郎博士に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Iyoda S, Tamura K, Itoh K, Izumiya H, Ueno N, Nagata K, Togo M, Terajima J, Watanabe H: Inducible *stx2* phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* 086:HNM isolated from patients. FEMS Microbiology Letters 2000;191:7-10
- 2) 大谷勝美, 高橋智子, 他: 下痢症患者から分離された病原大腸菌の病原因子保有状況. 山形県衛生研究所報 1997;30:38-42
- 3) Tozzi AE, Niccolini A *et al*: A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of Northern Italy over a period of several months. Epidemiol. Infect. 1994; 113:209-219