

3 調査研究

3・1 報 文

1) *Escherichia albertii* 及び腸管出血性大腸菌 (O183 : H18) が検出された食中毒事例について

古川真斗 徳岡英亮*¹ 浴永圭吾*² 徳永晴樹*³
東 竜生*² 大岡唯祐*⁴ 林 哲也*⁴ 原田誠也

要旨

平成 23 年 5 月に天草市内で発生した下痢、腹痛を主症状とする食中毒事例では、摂食者便の 65.9%から *eae* 遺伝子陽性の非典型的大腸菌が、22.7%から VT2/*astA* 遺伝子陽性的大腸菌が検出された。このため、前者の大腸菌を腸管病原性大腸菌と判定し、本食中毒事例の主因とした。しかしその後、この菌を詳細に検討したところ、*Escherichia* 属の新菌種 *Escherichia albertii* であることが判明した。本菌種による散発性下痢症の報告はあるものの、集団食中毒事例の報告は非常に少なく、本事例は世界でも珍しい集団食中毒事例である。さらに、後者の大腸菌は、*Shigella boydii* type10 と同一の O 抗原もつ腸管出血性大腸菌 (EHEC O183 : H18) であることが確認された。

キーワード：食中毒, *eae* 遺伝子, *Escherichia albertii*, EHEC O183 : H18

はじめに

2011 年 5 月に天草市内の飲食店で発生した食中毒事例では、有症者便等から高率に *eae* 遺伝子陽性の非典型的な性状を示す大腸菌様細菌と低率ながら VT2/*astA* 遺伝子陽性の腸管出血性大腸菌 (以下「EHEC」という。) が分離された。前者の大腸菌様細菌は生化学的反応性に乏しかったものの、簡易同定キットで大腸菌と同定されたことから、この菌を非典型的な腸管病原性大腸菌 (以下「EPEC」という。) と判断し、臨床症状や疫学調査の結果を踏まえ、本事例は非典型的 EPEC を主因とした食中毒事例であると判断した。しかしその後、本菌の遺伝学的性状を詳細に研究したところ、*Escherichia albertii* (以下「*E.albertii*」

という。) であることが判明した。

E.albertii は下痢症状を呈するバングラディッシュの小児から分離され、Albert ら¹⁾によって 1991 年に初めて報告された細菌で、当初は *Hafia alveit* とされていた。しかしその後、遺伝学的な解析で *Escherichia* 属の新菌種であることが明らかとなり、2003 年に Huys ら²⁾によって正式に発表された。本菌は非運動性で、生化学的反応性に乏しく、病原因子の 1 つである *eae* 遺伝子保有などの特徴を有している。本菌種による散発下痢症事例の報告はあるものの、集団事例の報告は非常に少ない。

さらに、後者の EHEC は、*Shigella boydii* type10 と同一の O 抗原を持ち、最近、わが国でも検出数が増加し、

*1 現熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課

*2 天草広域本部天草地域振興局保健福祉環境部

*3 熊本県環境生活部環境局廃棄物対策課

*4 宮崎大学

注目されている EHEC (O183 : H18)³⁾ であることが確認された。

材料と方法

(1) 事例の概要

2011 年 5 月 31 日に、A 高校運動部の保護者から管轄保健所へ、運動部の生徒、保護者及び高校の職員数人が、5 月 30 日から下痢・腹痛等の体調不良を訴えている旨の連絡があった。保健所による調査の結果、5 月 29 日に天草市内の飲食店で A 高校運動部の歓迎会が開催され、出席者の半数が同様の症状を呈していること、及び当日法事で同施設を利用したもう一つのグループにも有症者がいることが判明した。摂食者は高校運動部の歓迎会のグループ (以下「G1」) 86 名と法事グループ (以下「G2」) 8 名の 94 名で、このうち有症者は 48 名 (51%, G1 : 43 名, G2 : 5 名) であった。主要症状は水溶性下痢 (83%), 腹痛 (69%), 発熱 (44%, 平均 37.2°C) 及び嘔気 (29%) であった。平均潜伏時間は 19 時間で、16~18 時間をピークとする一峰性の発症曲線を示したことから、単一曝露による食中毒と推定された。

(2) 検査材料

保健所から搬入された摂食者便 44 検体 (G1 : 37 検体, G2 : 7 検体), 従業員便 10 検体, 拭き取り 5 検体, 及び井戸水 1 検体の合計 60 検体を検査材料とした。

(3) 検査方法

検査は以下の 3 項目について実施した。

1) 下痢症ウイルス検査

摂食者便 44 検体のうち、最初に搬入された有症者便 5 検体及び拭き取り 5 検体について、既報⁴⁾に従い、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、アデノウイルス、A 群及び C 群ロタウイルスを対象とした PCR 検査を実施した。

拭き取り 5 検体については、PBS (-) 10ml 中に振り出したものを 10,000rpm, 20 分間冷却遠心後、上清を 30% ショ糖溶液 1ml を入れた超遠心用遠心管に重層し、40,000rpm, 120 分間遠心した。沈渣を 200 μ l の蒸留水に再浮遊し、厚生労働省通知⁵⁾ に準じて cDNA を作製した。

2) 細菌検査

① Multiplex-realtime PCR 法によるサルモネラ、腸炎ビブリオ及びカンピロバクターのスクリーニング

ウイルス検査同様、最初に搬入された有症者便 5 検体について、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて便から直接 DNA を抽出後、既報⁶⁾ に従いサ

ルモネラ、腸炎ビブリオ及びカンピロバクターのスクリーニングを実施した。

② 培養法による食中毒菌の検索

常法により食中毒菌の検索を行った。すなわち、摂食者便 44 検体及び従業員便 10 検体を、DHL 寒天培地、マッコンキー寒天培地、クロモアガービブリオ、mCCDA 培地、卵黄加 CW 寒天培地、卵黄加マンニト食塩培地、及び卵黄加 NGKG 培地に画線塗抹し、mCCDA 培地は 2 日間微好気培養、卵黄加 CW 寒天培地は一夜嫌気培養、及びその他の培地については一夜好気培養を実施した。

拭き取り 5 検体は、緩衝ペプトン水 (BPW)、アルカリペプトン水 (APW)、プレストン培地、及びチオグリコレート培地 (TGC) で 24 時間増菌培養後、BPW から DHL 寒天培地、マッコンキー寒天培地、卵黄加マンニト食塩培地、卵黄加 NGKG 培地へ、APW からクロモアガービブリオへ、プレストン培地から mCCDA 培地へ、TGC から卵黄加 CW 寒天培地へ画線塗抹し、便の直接培養と同一の条件で培養した。

井戸水 1 検体も拭き取り検体と同様に培養した。

下痢原性大腸菌の有無は、伊藤の方法など⁷⁾ に準じ、下痢原性大腸菌の各種病原遺伝子 (VT1/2, LT, ST, *invE*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, 及び *astA*) をターゲットとした分離培地のスィープ PCR 法⁸⁾ で判定した。その後、スィープ PCR 法で何らかの病原遺伝子が検出された分離培地から個々の大腸菌様コロニーを釣菌し再度 PCR を行い、病原遺伝子保有株を分離した。

③ 生化学的性状及びベロ毒素 (VT) 確認検査

API20E (日本ビオメリュー) 及び自家製培地により生化学的性状検査を実施した。また、ベロ毒素の確認には、デュオパス・ベロトキシン (極東製薬工業株式会社) を使用した。

④ 血清型別

病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用い、添付文書に従い O 群抗原及び H 抗原の血清型別を行った。

⑤ 薬剤感受性試験

シプロフロキサシン (CIP), セフトキシム (CTX), クロラムフェニコール (CP), ナリジクス酸 (NA), テトラサイクリン (TC), カナマイシン (KM), ストレプトマイシン (SM), アンピシリン (ABPC) の 8 剤を使用し、KB ディスク法により実施した。

⑥ パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 分析

常法により調製した染色体 DNA を制限酵素 *Xba*I で切断後、CEHF DRIII (Bio-Rad 社) で 12.0°C, 6.0V/cm, 2.2~54.2 秒, 18 時間の条件で電気泳動を行った。

3) *E. albertii* 同定のための追加試験

宮崎大学医学部感染症学講座に依頼し, Ooka らの方法⁹⁾で, 以下の4項目について追加試験を実施した。

① Multi-locus sequence analysis (MLSA)

ハウスキーピング遺伝子 *adk*, *gyrB*, *mdh*, *fumC*, *recA*, *purA*, *icd* の7種をPCR増幅し, ダイレクトシークエンスで塩基配列を決定した。その後, その内部配列を連結(計3423bp)し, 大腸菌及び近縁菌の同部

表1 細菌検査結果(分離株数)

| | G1(37検体) | G2(7検体) | 従業員(10検体) |
|-------------------------------------|----------|---------|-----------|
| <i>E. albertii</i> | 19 | 3 | 2 |
| <i>E. albertii</i> + EHEC(O183:H18) | 6 | 1 | 0 |
| EHEC(O183:H18) | 3 | 0 | 0 |
| 不検出 | 9 | 3 | 8 |

表2 摂食者及び従業員の臨床症状(人数)

| | <i>E. albertii</i> (24名) | <i>E. albertii</i> + EHEC(O183:H18) (7名) | EHEC(O183:H18) (3名) |
|-------|-----------------------------|---|------------------------|
| 水溶性下痢 | 17 | 1 | 7 |
| 腹痛 | 16 | 2 | 6 |
| 嘔吐 | 0 | 0 | 0 |
| 嘔気 | 5 | 0 | 5 |
| 発熱 | 8 | 2 | 4 |
| 症状不明 | 2 | 0 | 0 |
| 無症状 | 3 | 0 | 0 |

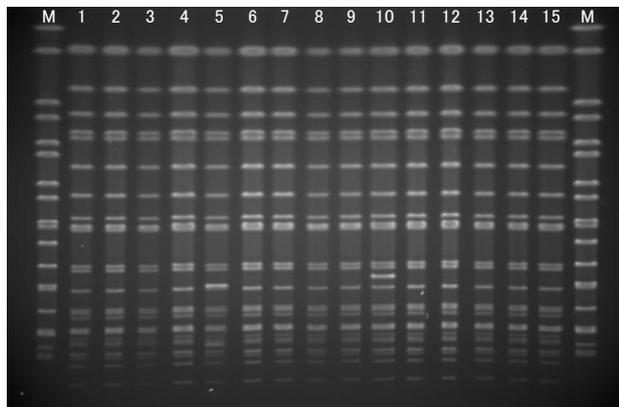


図1 *eae* 陽性菌株の PFGE 解析結果

レーン 1~9: G1 摂食者株, レーン 10~13: G2 摂食者株, レーン 14~15: 従業員株, M: マーカー

位の配列を含め, Neighbor-Joining (N-J) 法により解析した。

② *eae* 遺伝子サブタイピング

2組の primer pair (*cesT-F9/eae-R3* 及び *eae-F1/escD-R1*) で *eae* 遺伝子前後を増幅後, ダイレクトシークエンスで得られた塩基配列により判定した。

③ *cdtB* 遺伝子サブタイピング

2組の primer pair (CDT-s1/CDT-as1 及び CDT-s2/CDT-as2) で *cdtB* 遺伝子内部を増幅後, ダイレクトシークエンスによる塩基配列解析で, II, III, V型, 又は I, IV型のいずれであるか判定した。

④ locus of enterocyte effacement (LEE) 挿入部位スクリーニング

PCR法を用い, LEEがゲノム上の tRNA 遺伝子(*pheV*, *selC*, *pheU*) のいずれの位置に挿入されているか判定した。

結果

1) 下痢症ウイルス検査

ウイルス検査では, いずれの下痢症ウイルスも不検出であった。

2) 細菌検査

① Multiplex-realtime PCR 法によるサルモネラ, 腸炎ビブリオ及びカンピロバクターのスクリーニング

Multiplex-realtime PCR 法にて迅速スクリーニングを行ったが, 3菌種ともに不検出であった。

② 培養法による食中毒菌の検索

培養法による細菌検査の結果を表1に示した。菌が分離された摂食者及び従業員の臨床症状を表2に示した。摂食者便及び従業員便の検査では, DHL寒天培地及びマッコンキー寒天培地以外に, 食中毒菌様細菌の発育はみられなかった。そこで, ターゲットを下痢原性大腸菌に絞り, DHL寒天培地のコロニー密集部からスweep PCRを実施したところ, *eae*, *astA* 及び VT2 遺伝子がそれぞれ複数の培地から検出された。次に, これらの病原遺伝子が検出された DHL寒天培地から病原遺伝子保有菌の分離を試みたところ, 摂食者便44検体中29検体(65.9%, G1:25検体, G2:4検体), 及び従業員便10検体中2検体(20.0%)から *eae* 遺伝子を保有する乳糖・白糖非発酵性の大腸菌様細菌(*eae* 遺伝子陽性菌)が分離された。

さらに, VT2/*astA* 遺伝子陽性菌も摂食者便44検体中10検体(22.7%)から分離され, このうちの7検体からは両方の菌が分離された。

なお, 拭き取りは食中毒菌様の発育がみられず, スweep PCR法も陰性であった。井戸水は DHL寒天のスweep PCR法で *eae* 遺伝子が陽性となったため, *eae* 遺伝子陽性菌の分離を試みたが, 分離することはできなかった。

③ 生化学的性状及び VT 確認検査

分離された *eae* 遺伝子陽性菌, VT2/*astA* 遺伝子陽性

菌及び *E.albertii* の生化学的性状を表 3 に示した。*eae* 遺伝子陽性菌は API20E では大腸菌と同定されたものの、非運動性、乳糖、白糖、キシロース非発酵性、及び β -Glucuronidase 陰性など、大腸菌にしては非典型的な生化学的性状を示した。一方、VT2/*astA* 遺伝子陽性菌は典型的な大腸菌の生化学的性状であり、デュオパス・ベロトキシンで VT2 陽性となったことから、EHEC であることが確定した。

表 3 分離株の生化学性状

| | <i>eae</i> 陽性株 | EHEC(O183:H18) | <i>E.albertii</i> ⁹⁾ |
|-------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|
| Indole | + | + | - |
| H ₂ S | - | - | - |
| Voges-Proskauer | - | - | - |
| Methyl red | + | + | NT |
| Citrate, Simmons | - | - | - |
| MUG | - | + | - |
| Motility | - | + | - |
| Glucose | + | + | + |
| Lactose | - | + | - |
| Sucrose | - | ± | - |
| Mannitol | + | + | + |
| Dulcitol | - | + | - |
| Salicin | - | - | - |
| Adnitol | - | - | - |
| Inositol | - | - | - |
| Sorbitol | - | + | - |
| Arabinose | + | + | NT |
| Raffinose | - | + | NT |
| Rhamnose | - | + | - |
| Maltose | + | + | + |
| Xylose | - | + | - |
| Trehalose | + | + | + |
| Cellobiose | - | - | - |
| Melibiose | - | + | NT |
| Sorbose | + | + | NT |
| Gelatin | - | - | NT |
| ONPG test | + | + | + |
| Urea | - | - | - |
| Lysine decarboxylase | + | + | + |
| Ornithine decarboxylase | + | - | + |
| Arginine dihydrolase | - | - | - |
| Phenylalanine deaminase | - | - | NT |
| Utilization of acetate | + | + | + |

NT: Not test (参考文献に記載なし)

④血清型別

eae 遺伝子陽性菌は使用した市販の血清に凝集せず、かつ非運動性であったため、OUT: HNM とした。一方、VT2/*astA* 遺伝子陽性菌は OUT: H18 と判定された。また、EHEC が確定したため国立感染症研究所に送付したところ、O183: H18 であることが判明した。

⑤薬剤感受性試験

eae 遺伝子陽性菌は TC にのみ耐性を示した。一方、VT2/*astA* 遺伝子陽性菌は使用したすべての薬剤に感受性であった。

⑥PFGE 分析

eae 遺伝子陽性菌の PFGE による泳動像の一部を図 1 に示した。ほぼ全株が同一の泳動パターンであった。EHEC の PFGE を実施したところ、ほぼ全株が同一の泳動パターンであった。これらの結果より、感染源が同一である可能性が示唆された。

3) *E.albertii* 同定のための追加試験

eae 遺伝子陽性菌の追加試験の結果を以下に示す。

①MLSA

MLSA による N-J 系統樹解析では、*E.albertii* のクラスターに分類された。

②*eae* 遺伝子サブタイピング

eae 遺伝子陽性菌のインチミンのサブタイプは、大腸菌では稀な σ (シグマ) 型と同定された。

③*cdtB* 遺伝子サブタイピング

cdtB 遺伝子のタイプは、ほぼすべての *E.albertii* が示す II, III, V 型であった。

④LEE の挿入部位スクリーニング

LEE の挿入部位は、ほぼすべての *E.albertii* が示す tRNA-*pheU* の位置であった。

これらの追加試験の結果から、今回の食中毒事例の主因と推定された *eae* 遺伝子陽性菌は、*E.albertii* と同定された。

考察

本食中毒事例では、有症者及び従業員の便 31 検体から *E.albertii* が、有症者便 10 検体から EHEC(O183:H18) が分離され、このうち 7 検体は両菌とも分離された。このため、*E.albertii* と EHEC(O183:H18) による混合感染による事例ではあるが、主因は高率に検出された *E.albertii* と推定された。残念ながら検食が保存されていなかったため、原因食品を特定することはできなかった。しかし、井戸水については、*E.albertii* は分離できなかったものの、*eae* 遺伝子が検出されたことから、井戸水中の *E.albertii* が食品を汚染し、増殖して引き起こした事例であろうと推定された。事実、保健所の調査によると、厨房内には市の上水道と井戸水が引かれており、半分以上で井戸水が使用されていたが、井戸水への塩素剤等の注入や受水槽の掃除は数年間行われておらず、壁面に藻類が発生した状態であった。通常、食中毒菌は、腸管出血性大腸菌やカンピロバクターなど、一部の細菌を除き、ヒトに感染し、発症する菌数

は 100 万個程度が必要とされている。しかし、緒方ら¹⁰⁾は、2005 年に大分県のキャンプ場で発生した有症者数 176 名に及ぶ、湧き水を感染源とした水系感染による *E.albertii* の集団食中毒事例を報告しており、これより少ない菌数で発症したと考えられる。今回の事例でも食品中で増殖したとは限らないことから、*E.albertii* は少ない菌数で感染が成立する可能性も考えられた。

本食中毒事例において、我々は当初、*E.albertii* を非典型的な性状の EPEC と同定し、報告¹¹⁾した。また、このことは前述のキャンプ場での事例でも同様¹²⁾であった。*E.albertii* は生化学性状も乏しいものの、*Escherichia* 属の菌種であることから大腸菌と類似したところがあり、本事例でも API20E を用いた簡易検査で大腸菌と同定された。また、*eae* 遺伝子陽性であることから、EPEC と誤同定されやすい。*E.albertii* の同定法として村上ら¹³⁾は、現在のところキシロース発酵陰性を指標として、Hyma らが確立した *E.albertii* 検出用 PCR で判定する方法¹⁴⁾が最も実用性があると述べている。*E.albertii* は散発性下痢症の報告はあるものの、集団食中毒事例の報告は非常に稀である。しかし、本事例のように非典型的な性状の EPEC 食中毒と判断された事例も少なからず存在する可能性があり、検査法の普及とともに、事件数の増加が予想される。また、*E.albertii* に関して、現在保菌動物や発症菌量などは不明であり、生態学的な研究も少ないことから、今後さらなる研究の進展が望まれる。

一方、本食中毒事例で同時に検出された EHEC (O183:H18) は、*Shigella boydii* type10 と同一の O 抗原を持つことで注目されている血清型で、九州地域をはじめ、国内でも報告数が増加傾向にあり、今後とも注意が必要である。

まとめ

2011 年 5 月に天草市で発生した食中毒事例では、摂食者の 65.9% から *eae* 遺伝子陽性の大腸菌様細菌が検出され、22.7% から VT2/*astA* 遺伝子陽性の EHEC が検出された。前者は大腸菌にしては非典型的な生化学的性状であったが、簡易同定キットで大腸菌と判定されたため、当初、本事例は EPEC を主因とする食中毒と判定した。しかしその後、本菌は *Escherichia* 属の新菌種 *E.albertii* であることが判明した。本菌種は比較的新しい菌種であり、一般に食中毒発生時の検査対象とはなっていない。しかし今後、乳糖・白糖非発酵性、非運動性、 β -Glucuronidase 陰性を示し、*eae* 遺伝子陽性

の非典型的な大腸菌様細菌が検出された場合、本菌種の可能性を検討すべきである。また、同時に検出された EHEC (O183:H18) は、最近わが国での報告数が増加していることから、今後も注意する必要がある。

文献

- 1) Albert, M. J., K. Alam, M. Islam, J. Montanaro, A. S. M. H.Rahman, K. Haider, M. A. Hossain, A.K.M.G. Kibriya, and S.Tzipori. : *Infect. Immun*, **59**, 1507-1513, (1991).
- 2) Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J. : *Int J Syst Evol Microbiol.*, **53**, 807-10, (2003).
- 3) Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., and Ohnishi, M., on behalf of the EHEC Study Group : *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3678-3680, (2011).
- 4) Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, et al. : *J. Med. Virol.*, **81**, 1117-1127, (2009).
- 5) 平成15年11月5付, 食監発第1105001号, 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知
- 6) 古川真斗, 徳岡英亮, 原田誠也 : 熊本県保環研報, **41**, 20-26 (2011).
- 7) 伊藤健一郎 : 国立保健医療科学院, 平成20年度新興再興感染症技術研修「遺伝子検査法」実習テキスト, (2008).
- 8) 緒方喜久代, 成松浩志, 小川正雄 : 感染症誌, **87**, 294 (2013).
- 9) Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TA, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T : *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 488-492 (2012).
- 10) 緒方喜久代, 成松浩志, 小川正雄 : 感染症誌, **87**, 249 (2013).
- 11) 徳岡英亮, 古川真斗, 永村哲也, 原田誠也, 浴永圭吾, 徳永晴樹, 東 竜生 : 病原微生物検出情報, **33**, 8-9 (2011).
- 12) 馬場 愛, 江渕寿美, 瓜生佳世, 樋脇弘, 緒方喜久代, 鷺見悦子, 長谷川昭生, 内山静夫 : 病原微生物検出情報, **26**, 275-276 (2005).
- 13) 村上光一, 江藤良樹, 小迫芳正, 河村好章, 伊藤健一郎 : 病原微生物検出情報, **33**, 134-136 (2012)
- 14) Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, Young VB, Whittam TS : *J. Bacteriol.* **187**, 619-628 (2005).