

氏名(本籍)	磯部 順子(富山県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第27号
学位授与年月日	平成31年4月10日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	稀な腸管病原菌による集団感染事例の病因に関する研究
論文審査委員	(主査) 古畑 勝則 (副査) 小西 良子 栗林 尚志

論文内容の要旨

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) は、1982 年に出血性腸炎の原因菌として最初に報告された比較的新しい病原菌である。本菌に関しては、①出血性腸炎のほか、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic-uremic syndrome: HUS) や脳症等を起こし、死亡する例もある、②牛が本菌のリザーバーである、③血清群としては O157, O26, O111 など多種あるが、重症化するのは O157 による場合が多いこと、などが明らかにされている。

2011 年 4~5 月にかけて富山県をはじめとした北陸 3 県と横浜市で、牛肉ユッケを原因食品とした EHEC による大規模な食中毒が発生した。患者数 181 名、HUS 発症者 34 名(19%)、HUS 34 名中 21 名が急性脳症を発症、5 名が死亡という非常に重症例の多い事件であった。181 名の患者糞便を対象とした細菌学的検査では、55 名から EHEC O111:H8 (*stx*₂) または EHEC O157:H7 (*stx*₁ & *stx*₂ / *stx*₁ / *stx*₂)、あるいはその両方が検出されるという非常に複雑な結果であった。さらに、*stx* を保有しない大腸菌 O111:H8 が 52 名の患者から分離された。この O111 は、Multilocus variable tandem-repeat analysis (MLVA) や pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) により、*stx*₂ 保有 O111:H8 と同様の遺伝的背景を持っていることが確認された。これまで報告された EHEC 感染症の病態では、血便や HUS を呈する割合や死亡などの重症例は、EHEC O111 より、O157 による方が多いことが知られている。本事例では重症例が多い上、EHEC O111 と O157 の 2 種類の EHEC が検出された。そこで、この重症者の多い食中毒事例の病因をさらに詳細に検討するために、患者の免疫応答の一つである血清抗体価の上昇に着目し解析を行った。

一方、*Yersinia enterocolitica* も腸管感染症起因菌の一つであるが、感染事例の報告はそれ程多くはなく、わが国で 2018 年現在報告されている集団事例は 25 事例程度である。*Y. enterocolitica* のリザーバーとしては豚が知られているが、食中毒の原因食品・感染源についてはその多くが不明である。

2012年に富山県で患者4名の *Y. enterocolitica* による集団感染事例が発生した。本事例の病因について明らかにする目的で、発生状況及び原因菌について疫学的解析を行うとともに、原因と推定された簡易水道水から原因菌を検出する方法について検討を行い、感染源の解明を図った。

これら稀な病原菌による病因について検討したところ、以下の結果を得た。

1. 腸管出血性大腸菌による食中毒事例の病因について

1. 181名の患者糞便を対象とした細菌学的検査の結果、55名から EHEC O111:H8 (*stx*₂) または EHEC O157:H7 (*stx*₁ & *stx*₂ / *stx*₁ / *stx*₂)、あるいはその両方が検出された。内訳は、EHEC O111のみ検出25名、O111 & O157 検出12名、O157のみ検出18名、両菌陰性126名であった。

中でも、HUS発症者34名では、EHEC O111のみ検出9名、O111 & O157 検出8名、O157のみ検出1名、両菌陰性16名であった。また、急性脳症発症者21名では、EHEC O111のみ検出7名、O111 & O157 検出6名、両菌陰性8名であった。死亡者5名では、3名から EHEC O111のみ検出、他の2名は陰性であった。

2. 患者181名のうち、60名から収集された血清について、凝集反応 (Microagglutination: MA) 試験により、*E.coli* O111 及び O157 の O 抗原に対する血清抗体価を測定した結果は以下の通りであった。

1) 患者60名の血清抗体価では、O111に対する抗体陽性者は45名(75.0%)であったが、O157に対しては10名(16.7%)であり、O111に対する抗体陽性率がO157陽性者に比べて有意に高かった($p < 0.001$)。

2) *E.coli* O111, O157 の両方あるいはどちらか一方が分離された患者41名の抗体陽性者は、O111に対して33名(80.0%)であったのに対し、O157に対しては8名(19.5%)であり、O111に対する抗体陽性率はO157に対する陽性者に比べて明らかに高かった。これらの患者の *E.coli* O111 に対する血清抗体価は、最も高い値は1:10,240であったのに対し、O157に対する最も高い血清抗体価は1:320であった。

3) *E.coli* O111 に対する血清抗体価の中央値は、HUS患者および血便患者ではいずれも1:1,280であったのに対し、下痢便患者では1:40と低かった。また、HUS患者と下痢患者、血便患者と下痢患者を比較すると、いずれもHUS患者、血便患者の血清抗体価の方が有意に高かった($p < 0.01$)。

4) *E.coli* O111, O157 の両方が分離されなかった患者19名の抗体陽性者は、O111に対して12名(63.2%)、O157に対して2名(10.5%)であり、O111に対する抗体陽性率はO157に対する抗体陽性者より高かった。これらの患者の血清抗体価の中央値は、O111に対しては1:640であるのに対し、O157に対しては1:20であった。これらを比較すると、O111に対する血清抗体価が有意に高かった($P < 0.01$)。

3. 上述した血清診断の結果から、本事例の病因において EHEC O111:H8 *stx*₂ が主要な役割を果たしたことが示唆された。

4. さらに、EHEC O157のみが分離された患者の血清で、O111に対する抗体価が陽性であった事例も確認されたことから、複数の EHEC に感染している患者の場合、患者便から分離される EHEC が

主要な起因菌であるとは限らないことが示唆された。また、*E.coli*に対する血清抗体価を測定することは、複数の EHEC による感染症において、それが O157 以外の血清群においても、きわめて有用であることが明らかとなった。

II. *Y. enterocolitica* による集団感染事例の病因について

1. 2012年7～8月、富山県において *Y. enterocolitica* O8 による患者4名の集団感染事例が発生した。感染源追及の過程で、患者らが共通に飲用していた簡易水道水から、大腸菌は検出されなかったが、一般細菌数が最大 700 CFU /mL 検出され、本飲用水は水質基準である一般細菌数 100 CFU /mL を超えていることが判明した。
2. この簡易水道水を感染源と疑い、起因菌である *Y. enterocolitica* O8 を分離する方法について検討した。すなわち、水から *Y. enterocolitica* を分離することは非常に困難であると考え、効果的に集菌する方法として、本菌の O 抗原に対する抗体を磁気ビーズに感作して自家免疫磁気ビーズを作製し、これを用いて簡易水道水から *Y. enterocolitica* O8 を分離することに成功した。とりわけ、水道水中の夾雑菌により *Y. enterocolitica* のビーズへの吸着が抑制されることを考慮し、増菌培養液を 10 倍希釈して培養することで *Y. enterocolitica* O8 をより高率に分離することができた。
3. 分離株について、制限酵素 *Not I* による分子疫学的解析法の一つである PFGE により解析した結果、水道水から分離された *Y. enterocolitica* O8 株と4名の患者便から分離された株は同一の PFGE 型を示し、同一起源の由来株であることが明らかとなった。この結果により、患者4名は簡易水道水を飲用したことによる集団食中毒であると判断するに至った。
4. 簡易水道水が本菌に汚染された原因は、貯水タンクのパイプに注入されることになっている塩素タンクが空であったことと推定された。このことから、飲用水については、塩素濃度を適切に維持し、衛生的に管理する体制が重要であることが再認識された。
5. 塩素消毒による衛生管理が不十分な簡易水道水を原因とする *Y. enterocolitica* O8 集団感染事例は、日本では初めての報告である。

このように、腸管出血性大腸菌による非常に重症例の多い大規模食中毒事例において、原因菌として EHEC O111:H8 と O157:H7 の2種類の菌が検出された。一般的に EHEC の血清群の中では、O157の方が、O111より病原性が強いと考えられているが、本集団事例の病因においては、EHEC O111:H8(*stx2*)が O157より主要な役割を果たしたことが、菌の分離状況に加え、血清学的診断によっても裏付けることができた。また、希な病原菌の一つである *Y. enterocolitica* O8 による集団感染事例において、その感染源が塩素管理の不十分な簡易水道水であったことを解明した。簡易水道水を原因とする *Y. enterocolitica* による集団感染事例は、日本では初めての報告である。

以上のように、2つの集団感染症事例について、詳細な細菌学的検討を行うことにより、希な腸管病原菌による感染症の病因を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は、1982 年に出血性腸炎の原因菌として最初に報告された比較的新しい病原菌である。2011 年 4 月から 5 月にかけて富山県をはじめとした北陸 3 県と横浜市において、牛肉ユッケを原因食品とした EHEC による大規模な食中毒が発生した。患者数 181 名、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic-uremic syndrome: HUS) 発症者 34 名(19%)、HUS 34 名中 21 名が急性脳症を発症、5 名が死亡するという非常に重症例の多い事件であった。そこで、この重症者の多い食中毒事例の病因をさらに詳細に検討するため、患者の免疫応答の一つである血清抗体価の上昇に着目して解析を行った。

一方、*Yersinia enterocolitica* も腸管感染症起因菌の一つであるが、感染事例の報告は少なく、わが国で 2018 年現在報告されている集団事例は 25 事例程度である。*Y. enterocolitica* のリザーバーとしては豚が知られているが、食中毒の原因食品・感染源については不明な点が多い。2012 年に富山県で患者 4 名の *Y. enterocolitica* による集団感染事例が発生した。本事例の病因を明らかにする目的で発生状況及び原因菌について疫学的解析を行うとともに、原因と推定された簡易水道水から原因菌を検出する方法について検討を行い、感染源の解明を図った。

まず、腸管出血性大腸菌による食中毒事例の病因についての検討では、181 名の患者糞便を対象とした細菌学的検査の結果、55 名から EHEC O111:H8 (*stx*₂) または EHEC O157:H7 (*stx*₁ & *stx*₂ / *stx*₁ / *stx*₂)、あるいはその両方が検出され、126 名は両菌陰性であった。その内訳は、EHEC O111 のみ検出 25 名、O111 & O157 検出 12 名、O157 のみ検出 18 名であった。中でも、HUS 発症者 34 名では、EHEC O111 のみ検出 9 名、O111 & O157 検出 8 名、O157 のみ検出 1 名、両菌陰性 16 名であった。また、急性脳症発症者 21 名では、EHEC O111 のみ検出 7 名、O111 & O157 検出 6 名、両菌陰性 8 名であった。死亡者 5 名では、3 名から EHEC O111 のみ検出、他の 2 名は陰性であった。

また、患者 181 名のうち、60 名から採取された血清についての免疫学的検討では、凝集反応 (Microagglutination: MA) 試験により、*E.coli* O111 及び O157 の O 抗原に対する血清抗体価を測定したところ、O111 に対する抗体陽性者は 45 名(75.0%)であったが、O157 に対してはわずか 10 名(16.7%)であり、O111 に対する抗体陽性率が O157 陽性者に比べて有意に高かった($p < 0.001$)。*E.coli* O111、O157 の両方あるいはどちらか一方が分離された患者 41 名の抗体陽性者は、O111 に対して 33 名(80.0%)であったのに対し、O157 に対しては 8 名(19.5%)であり、O111 に対する抗体陽性率は O157 に対する陽性者に比べて明らかに高かった。これらの患者の *E.coli* O111 に対する血清抗体価は、最も高い値は 10,240 倍であったのに対し、O157 に対する最も高い血清抗体価は 320 倍であった。*E.coli* O111 に対する血清抗体価の中央値は、HUS 患者および血便患者ではいずれも 1,280 倍であったのに対し、下痢便患者では 40 倍と低かった。また、HUS 患者と下痢患者、血便患者と下痢患者を比較すると、いずれも HUS 患者、血便患者の血清抗体価の方が有意に高かった($p < 0.01$)。*E.coli* O111、O157 の両方が分離されなかった患者 19 名の抗体陽性者は、O111 に対して 12 名(63.2%)、O157 に対して

2名(10.5%)であり、O111に対する抗体陽性率はO157に対する抗体陽性者より高かった。これらの患者の血清抗体価の中央値は、O111に対しては640倍であったが、O157に対しては20倍であり、これらを比較するとO111に対する血清抗体価が有意に高かった(P<0.01)。

以上の血清診断の結果から、本事例の病因においてEHEC O111:H8 *stx*₂が主要な役割を果たしたことが示唆された。さらに、EHEC O157のみが分離された患者の血清でもO111に対する抗体価が陽性であったことから、複数のEHECに感染している患者の場合、患者便から分離されるEHECが主要な起原菌であるとは限らないことが示唆された。また、*E.coli*に対する血清抗体価を測定することは、複数のEHECによる感染症において、それがO157以外の血清群においても、きわめて有用であることが明らかとなった。

次に、*Y. enterocolitica*による集団感染事例の病因については、2012年7月から8月、富山県で発生した*Y. enterocolitica* O8による患者4名の集団感染事例について検討した。感染源追及の過程で、患者らが共通に飲用していた簡易水道水から大腸菌は検出されなかったが、一般細菌数が最大700 CFU/mL検出され、本飲用水は水質基準である一般細菌数100 CFU/mLを超えていることが判明した。この簡易水道水を感染源と疑い、起原菌である*Y. enterocolitica* O8を分離する方法について検討した。すなわち、水から*Y. enterocolitica*を分離することは非常に困難であると考え、効果的に集菌する方法として、本菌のO抗原に対する抗体を磁気ビーズに感作して自家免疫磁気ビーズを作製し、これを用いて簡易水道水から*Y. enterocolitica* O8を分離することに成功した。とりわけ、水道水中の夾雑菌により*Y. enterocolitica*のビーズへの吸着が抑制されることを考慮し、増菌培養液を10倍希釈して磁気ビーズと培養することで*Y. enterocolitica* O8をより高率に分離することができた。さらに、分離株について、制限酵素Not Iによる分子疫学的解析法の一つであるpulsed-field gel electrophoresis (PFGE)により解析したところ、水道水から分離された*Y. enterocolitica* O8株と4名の患者便から分離された株のPFGE型は一致し、同一起源の由来株であることが明らかとなった。この結果により、患者4名は簡易水道水を飲用したことによる集団食中毒であると判断するに至った。また、簡易水道水が本菌に汚染された原因は、塩素タンクが空であり、消毒薬を貯水タンクのパイプに注入できなかったことによるものと推定された。このことから、飲用水については、塩素濃度を適切に維持し、衛生的に管理する体制が重要であることが再認識された。このような塩素消毒による衛生管理が不十分な簡易水道水を原因とする*Y. enterocolitica* O8集団感染事例は日本では初めての報告であった。

これらの結果から、2つの集団感染症事例について詳細な細菌学的検討を行うことにより稀な腸管病原菌による感染症の病因を明らかにすることができた。すなわち、腸管出血性大腸菌による非常に重症例の多い大規模食中毒事例において、原因菌としてEHEC O111:H8とO157:H7の2種類の菌が検出された。一般的にEHECの血清群の中ではO157の方がO111より病原性が強いと考えられているが、本集団事例の病因においてはEHEC O111:H8 (*stx*₂)がO157より主要な役割を果たしたことが、菌の分離状況に加えて血清学的診断によっても裏付けることができた。また、希な病原菌の一つであ

る *Y. enterocolitica* O8 による集団感染事例において、その感染源が塩素管理の不十分な簡易水道水であったことを解明した。

本研究で明らかになった知見は、感染症における疫学ならびに公衆衛生学の発展に貢献するものであり、それ故に博士（学術）を授与するにふさわしい業績であると審査委員一同判断した。