

市販和風キムチに起因する腸管出血性大腸菌 O157 : H7

Diffuse Outbreak 事例

埼玉県衛生研究所

尾関由姫恵 倉園 貴至 斎藤 章暢
岸本 剛 山口 正則

(平成 15 年 3 月 3 日受付)

(平成 15 年 4 月 15 日受理)

Key words : diffuse outbreak, enterohemorrhagic *E. coli* O157 : H7, PFGE

要 旨

埼玉県内の某全寮制児童自立支援施設で、2001 年 8 月に腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 : H7 (Stx 1 & 2 産生性) による集団事例 (発症者 13 名, 菌陽性者 29 名) が発生した。疫学的調査並びに細菌学的検査の結果、最終的に本事例の原因食品は、埼玉県内で製造され、主として埼玉県及び東京都内で市販されていたキムチ風味の浅漬け「和風キムチ」であることが明らかにされた。同時期に、本食品を原因とする EHEC O157 の家庭内発生例が同県内 (5 家族 8 名)、更には東京都内でも多発しており、本集団事例は和風キムチを原因食品とする Diffuse Outbreak の一端であったことが明らかにされた。

Diffuse Outbreak では、広域に発生している個々の事例の共通性を迅速に把握することが重要である。

本事例の解明には、複数の自治体間での疫学的情報の交換、及び PFGE を用いた分離株の遺伝子レベルでの同一性の推測が重要な役割を果たした。

〔感染症誌 77 : 493 ~ 498, 2003〕

序 文

埼玉県内の 2001 年における腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 感染者数は、前年の 96 名に比べ 2.2 倍の 213 名であった。これは散発事例数が急増したことによるが、集団事例も 3 例確認されている。このうち 8 月に発生した 1 集団事例は、施設内での一峰型の患者発生状況から、この施設で提供された食品を介した単純な集団食中毒であると考えられた。しかしながら、最終的に本事例の原因食品は、埼玉県内で製造され、主として埼玉県及び

東京都内で市販されていたキムチ風味の浅漬け「和風キムチ」であることが明らかになった。同時期に、本食品を原因とする EHEC O157 の家庭内発生例が埼玉県内、更には東京都内でも多発しており、本集団事例は和風キムチを原因食品とする diffuse outbreak の一端であったことが判明した。本報では集団事例と家庭内発生例の事件探知から集結までの詳細について時間的な流れを中心に報告する。

材料と方法

1. 疫学的調査

2001 年 8 月 27 日、埼玉県下の某施設の専属医師から「8 月 23 日から生徒等 13 名が相次いで下痢、腹痛、嘔吐などの食中毒症状を示し、うち 5

別刷請求先 : (〒338 0824) 埼玉県さいたま市上大久保 639 1

埼玉県衛生研究所 臨床微生物担当

尾関由姫恵

平成15年7月20日

名が EHEC O157 感染症の疑いで入院した」との報告が管轄保健所にあった。保健所担当者により患者及び関係者に対する喫食，発症の有無，発症時刻，症状などの聞き取り調査が実施された。

2. 細菌学的検査

1) 病原菌検索

患者及び関係者の糞便 91 検体，冷凍保存食(調理済み食品及び原材料)109 検体，施設の拭き取り 109 検体，その他井戸水など 9 検体について各種病原菌の検査を実施した。

2) 生化学的性状試験

分離された菌株の生化学的性状試験は常法¹⁾に準じて行った。なお，アミノ酸分解試験はメーカーの培地に各アミノ酸を 1%，糖分解試験ではフェノールレッドブロスに各糖を 1% 加えた培地で，14 日間観察した。

3) 血清型別試験

O 血清型及び H 血清型は，それぞれ市販されている病原大腸菌診断用血清 1 号セット及び 2 号セット(デンカ生研)を用い，O 血清型別については，121 15 分の加熱死菌を抗原としてスライド凝集反応により実施した。H 血清型別は，半流動培地で数回通過させた後，試験管凝集法で行った。

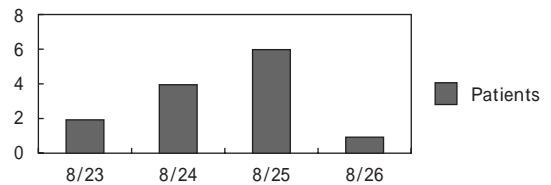
4) ペロ毒素 (Stx) 産生試験

ペロ細胞毒素遺伝子 *stx1* 及び *stx2* について，Pollard らの報告²⁾に基づき PCR 法により検出した。テンプレートは供試菌株を一夜培養後，蒸留水 100 μ l に懸濁し 100 ，10 分加熱したものをを用いた。2% アガロースゲルにて電気泳動を行い，遺伝子の増幅を確認した。また，毒素産生性については VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いて確認した。

5) 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会 (NCCLS) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準³⁾に基づき，センシディスク (BBL) を用いて行った。供試薬剤は，クロラムフェニコール (CP)，テトラサイクリン (TC)，ストレプトマイシン (SM)，カナマイシン (KM)，アンピシリン (ABPC)，ナリジクス酸 (NA)，ゲンタマイシン (GM)，シプロフロキサシ

Fig. 1 Numbers of patients in the case of outbreak



ン (CPFX)，セフトキシム (CTX)，ST 合剤 (SXT)，トリメトプリム (TMP)，ホスホマイシン (FOM) の 12 薬剤である。

6) パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝子解析

供試菌株 DNA を制限酵素 *Xba*I で 37 18 時間消化した後，泳動用アガロースには 1% アガロースゲル (PFC Agarose, BIO-RAD)，泳動装置は CHEF DRII (BIO-RAD) を用いて，6V/cm，4 to 8 sec 9 hrs，8 to 50 sec 13 hrs の条件で泳動し，DNA 切断パターンを比較した。

成 績

1. 疫学的調査成績

発生施設は，厚生労働省が所轄する全寮制の児童自立支援施設で，広大な敷地内には学生の学習棟，作業棟，寮棟をはじめ，調理棟，職員寮棟等が点在する。施設内の居住者は生徒 38 名，職員 42 名，調理人 4 名，職員家族 49 名，実習生 7 名の計 140 名である。施設の調理棟で提供される食事は 1 日 4 食で，全生徒と実習生及び 36 名の職員，計 81 名が喫食していた。Fig. 1 に示したように，下痢，腹痛，嘔吐などの症状を呈したのは 13 名で，8 月 23 日から 26 日にかけて発症し，全員が調理棟で提供された食事を摂っていた。Table 1 に示したように調理棟での非食事提供者からの発症者は確認されなかったことより，調理棟の調理喫食者 81 名を母数とし，喫食調査をもとに発症者と非発症者の各種食品喫食の有無についてのカイ 2 乗検定，オッズ比を求めた。結果，最もオッズ比が大きかったのは 8 月 20 日の夕食で，そのメニューは豚カツ，キャベツ，スパゲッティ，キムチ納豆であった。しかし，原因食品を特定できる結果は得られず，原因食品の追求は困難かと考えられた。

Table 1 An EHEC O157 outbreak in child independence support facilities, in Saitama August 2001

	Patient	%	Isolated	%
Students (38)	11	28.9	27	71.1
Stuff (42)	1	2.4	2	4.8
Cook (4)	0	0	0	0
Family of the stuff (49)	0	0	0	0
Apprentice (7)	1	14.3	0	0
Total (140)	13	9.3	29	20.7

Table 2 Isolated cases of diffuse outbreak relate with Wafu-Kimuchi in Saitama

Family	Age	Sex	Day of onset	Eating	Available period
A - 1	36	F	8/18	Yes	8/24
2	45	M	8/22	Yes	8/24
B - 1	66	F	8/21	Yes	unknown
2	40	F		Yes	unknown
C	34	F	8/22	Yes	8/24
D - 1	16	F	8/26	No	unknown
2	40	F		Yes	unknown
3	13	M		Yes	unknown
E	25	F	8/29	Yes	unknown

この解決の転機となったのは、東京都からの食中毒に関連する製造者に関する調査依頼で、都内で発生しているいくつかの O157 感染例における共通食品が、埼玉県で製造されている和風キムチであるというものであった⁴⁾。8月20日に施設で夕食に出されたキムチ納豆は、この和風キムチと納豆を和えたもので、本事例の原因食品としても和風キムチが疑われることになった。製造者に対する調査を行うと同時に、同時期における県下の同菌感染患者に対し和風キムチに的を絞った聞き取り調査が再度行われた。その結果 Table 2 に示したように 5 家族 9 名のうち 8 名において和風キムチの喫食が確認され、その 1 家庭に残存していた和風キムチ 1 検体から同菌が検出された。

2. 細菌学的検査成績

1) 病原菌検索成績

施設の患者及び関係者 91 名の糞便検査の結果、29 名から分離された EHEC O157, 29 株は H 血清型 7 で、Stx 1 及び 2 産生株であった。一方、保存食 109 検体、施設の拭き取り 109 検体、井戸水

6 検体、ウォータークーラー水 2 検体及びプール水 1 検体からは、同菌は検出されなかった。

また上述の疫学調査の結果、和風キムチの喫食が確認できた家庭内発生例 8 名からの分離株及び和風キムチからの分離株はいずれも EHEC O157 : H7 で Stx 1 及び 2 産生株であった。

2) 生化学的性状

施設関連の分離株 29 株、家庭内発生例 8 株及び和風キムチからの 1 株、計 38 株の各種生化学的性状試験成績を Table 3 に示した。全株とも通常の EHEC O157 に一致する同一の生化学的性状であった。

3) 薬剤感受性

供試 12 薬剤に対して全 38 株いずれも感受性であった。

4) PFGE による遺伝子解析

Xba I で消化した PFGE による遺伝子切断パターンを代表株について Fig. 2 に示した。バンド 1 本の相異のみが認められる 2 種類のパターン (type A 及び type B) に分けられた。全 38 株にお

Table 3 Biochemical reactions of test strains

Test	Reaction (days of incubation)
Metyl red	+
Voges-Proskauer	-
Simmons citrate	-
Malonate	-
Indole production (LIM)	+
H ₂ S (TSI)	-
Lysine decarboxylase	+ (1 ~ 2)
Ornithine decarboxylase	+ (1)
Arginine dihydrolase	+ (3)
β-Glucuronidase	-
Motility	+
Glucose (gas)	+ (1)
Glucose (acid)	+ (1)
Arabinose	+ (1)
Rhamnose	+ (1)
Xylose	+ (1)
Lactose	+ (1)
Maltose	+ (1)
Sucrose	+ (1)
Trehalose	+ (1)
Raffinose	+ (1 ~ 2)
Cellobiose	- (14)
Melibiose	+ (1)
Adonitol	- (14)
Dulcitol	+ (1 ~ 3)
Mannitol	+ (1)
Sorbitol	- (14)
Salicin	- (14)

ける type A 及び type B の状況は、Table 4 にまとめたように、type A が 26 株、type B が 12 株であった。

考 察

埼玉県下の某施設における本集団事例が発生したほぼ同時期(8月16日~8月30日)に、感染症発生動向調査に基づく EHEC O157 : H7 (Stx 1 & 2) の感染患者届出数は 16 名であり、この 16 名の接触者(家族)検便から 6 名の保菌者を確認した。この 22 名に対し和風キムチに的を絞った聞き取り調査が再度行われた。また、報道を通じて情報を公開することで、県民からの情報を積極的に収集し、キムチの残品および糞便の検査を実施した。その結果、8 名から和風キムチの喫食が確認され、その 1 家庭に残存していた和風キムチ 1 検体から

Fig. 2 PFGE analysis of Xba I restriction

fragments of STEC O157 : H7 strains
lane 1 : Origin by outbreak (type A)
lane 2 : Origin by outbreak (type B)
lane 3 : Origin by diffuse outbreak (type A)
lane 4 : Daughter of the lane 3 (type B)
lane 5 : Origin by diffuse outbreak (type A)
lane 6 : Origin by Wafu-Kimuchi eated patient of the lane 5 (type B)
M : Lambda DNA ladders

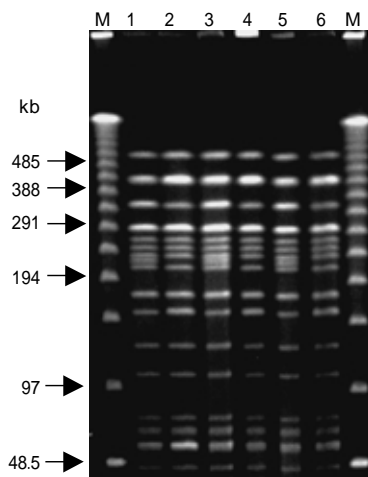


Table 4 Results of digested DNA patterns Type A or B by PFGE

Cases	Family	A	B
Outbreak		21	8
Diffuse Outbreak	A	2	0
	B	1	1
	C	1	0
	D	0	2
	E	1	0
	Wafu-Kimuchi	0	1
Total		26	12

も同菌が検出された。患者 8 名およびキムチからの分離株計 9 株は、集団事例で分離された株と同一の生化学的性状及び薬剤感受性を示した。また、PFGE の泳動パターンも同様の結果が得られている。以上のことより今回の集団を含む感染事例は、東京、埼玉で流通する食品を感染源とした diffuse

outbreak 事例であると結論された。

この diffuse outbreak で分離された 38 株の遺伝子解析において、*Xba*I 消化後の泳動で観察された 2 種類のパターンが同一集団内 (type A 21 株, type B 8 株) と同一家庭内 (家庭 B) に認められたこと、相異がバンド 1 本のみであることより、これらの菌株は本質的には同一由来であると結論した⁵⁾。なお、補足的に *Bln* I を用いた泳動も試みた結果は、同じ遺伝子切断パターンであった。

これまで、PFGE による遺伝子解析の手法は、集団事例に対して用いられるのが主流であった。つまり既知の「集団」において、患者から分離された菌株及び食品を含めた環境材料からの分離株等、分離された全ての菌株に対し遺伝子レベルでの同一性の確認に応用されてきた。一方、感染者分離株の遺伝子レベルでの同一性から、個々の事例を 1 つの「集団」とみなすことで、感染源を追求できたいくつかの diffuse outbreak が報告^{6,7)}されており、PFGE の有用性がさらに認識されている。今回の diffuse outbreak においても地方衛生研究所間で PFGE の泳動像をメールで交換することにより、自治体を越えて広域的に発生した個々の事例からの分離株も遺伝子レベルでの同一性を確認できた。今後は、単なる画像情報ではなく、画像解析ソフトを用いて数値化されたデータとすることが求められており、各地研間での互換性のある画像解析診断の必要性が示されている⁸⁾。

全国的にも 2001 年の EHEC O157 : H7 (Stx 1 & 2) の検出状況には、例年になく異常な偏りがあった。つまり、国立感染症研究所での遺伝子解析によると遺伝子切断パターンが今回の検討株と同様 type A および type B に代表され、同一クローン由来と推定される株は 624 株で全体の 25% にもおよび、何らかの汚染が全国規模で広がっていたと思われる。本県においてもこの 2 つのパターンは既に 2001 年 5 月から分離され始めていたが、和風キムチとの関連が確認できなかった 38 株は感染源が特定できなかった。PFGE による遺伝子レベルでの同一性という情報を最大限に活用できなかったところにその一因があると思わ

れる。つまり、分子疫学的情報を早急に発信し、保健所等の現場担当者に適切に還元できなかった。このような反省を踏まえ、本県では国立感染症研究所感染症情報センター FETP (実地疫学専門家養成コース) の助言を受け、EHEC O157 等の diffuse outbreak における原因食品を特定することに主眼をおいた調査票を作成し、患者等が記載した結果をデータベース化した。分子疫学情報をもとにデータベース中の個々の患者情報から共通情報を抽出し、現場担当者へ情報を還元する体制を整え、2002 年度から実施している。この様に分子疫学の分野は、感染症において病原体に関する裏付け情報を提供するのみでなく、感染症の蔓延に対する先駆的な情報発信が急務とされ始めた。もちろん、感染症の発生を最初に感知する医療機関との連携、保健所の現場担当者の熱意は欠くことは出来ない。

謝辞：稿を終えるにあたり、貴重な情報を頂いた国立感染症研究所細菌第 1 部寺嶋淳博士、ご指導、御校閲頂いた東京都衛生研究所松下秀博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Ewing WH : *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae* 4th ed. Elsevier science Pubco, New York, 1986.
- 2) Pollard DR, Johnson WM, Rior H, Tyler SD, Rozee KR : Rapid and Specific Detection of Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 540 5.
- 3) The National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard 7th Ed. 2000 ; 20 (1). NCCLS.
- 4) 報道されない健康危機管理 愛と執念の O157 追跡 . 公衆衛生情報 2002 ; 32 : 45 7.
- 5) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2233 9.
- 6) 浅井良夫, 村瀬敏之, 大澤 朗, 沖津忠行, 鈴木理恵子, 佐多 辰, 他 : イクラからの志賀毒素産生性大腸菌 O157 : H7 の分離と分離株のバルスフィールドゲル電気泳動パターン . 感染症誌 1999 ; 73 : 20 4.

- 7) 腸管出血性大腸菌感染症 2001年4月現在.病原
微生物検出情報 2001; 22: 135-9.
8) 渡辺治雄, 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 田村

和満: 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視
体制; パルスネットの構築. 感染症誌 2002;
76: 842-8.

A Diffuse Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7
Related to the Japanese-style Pickles in Saitama, Japan

Yukie OZEKI, Takayuki KURAZONO, Akinobu SAITO,
Tuyoshi KISHIMOTO & Masanori YAMAGUCHI
Saitama Institute of Public Health

We have experienced an outbreak of enterohemorrhagic *E. coli* O157 : H7 (Shiga-like toxin 1 & 2 producing) in child independence support facilities in the all dormitory system, in Saitama August 2001. There were 13 patient and EHEC O157s were detected in a total of 29 specimens. As a result of epidemic inspection and microbiological investigation. We recognized that the causative food was Japanese-style pickles named " Wafu-Kimuchi " which had been sold in Saitama and Tokyo area. As the same period, several infections caused by EHEC O157 were considered the same origin in Saitama (8 patients in 5 families) Furthermore some infections happened also in Tokyo. It was made clear this outbreak was a part of a diffuse outbreak caused by Wafu-Kimuchi.

In diffuse outbreaks, it is important to grasp a common feature of the individual cases in a wide area. The exchange of epidemic information between two or more municipalities and the guess of the identity in the DNA levels of strains were the key role to the elucidation of this case.