

保育園におけるメロンが原因の腸管出血性大腸菌 O157:H7による集団食中毒事例

内村真佐子, 岸田 一則, 依田 清江, 小岩井健司
久門 勝利, 鶴岡 佳久¹⁾, 水口 康雄

Melon-associated food poisoning in a day nursery due to
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Masako UCHIMURA, Kazunori KISHIDA, Kiyoe YODA, Kenji KOIWA
Katsutoshi KUMON, Yoshihisa TSURUOKA and Yasuo MIZUGUCHI

I はじめに

1996年, 腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157による集団食中毒が全国的に多発し, 有症患者10名以上の事例は16件に及んだ。発生施設は小学校, 保育園, 老人ホーム等で, いずれも給食が原因と考えられているが, 原因食品が特定された例はわずか3例であった。集団給食による食中毒事例が多発したことを受けて, 厚生省は同年7月25日, 学校, 幼稚園等大規模給食施設における検食保存の条件及び期間を, -20°C 以下で2週間以上とするよう通知した。これは, 食中毒発生時の原因食品究明を円滑かつ確実に実施するために措置されたものである。一方EHEC O157の検査に関する新しいキットや分離培地等が世界各地で次々と開発され, 我が国にも導入されてきた。このように, EHEC O157に関する限り, 1996年の大発生時に比べるとその1年後は, 食中毒発生時の原因究明のための対策が様々な面で発展したと言える。我々は1997年7月に, 保育園におけるEHEC O157による集団食中毒事例を経験し, 保存検食のメロンからEHEC O157を検出することができた。そこで, 事件の概要を示すとともに食品の検査結果および分離株の性状について報告する。

II 事件の概要

1997年7月4日, 柏市内の医療機関からEHEC O157患者発生の届け出がなされた。また患者と同じ保育園に在籍する他の4名の園児も, 同様の症状で入院検査中であることが明らかとなり, 保健所は保育園を中心としたEHEC O157集団感染症発生の疑いで, 疫学的調査及び病原菌検査を開始した。その結果, 患者発生は6月28日から7月5日に認められ, 最終的な菌陽性者数は32名であることが明らかとなった。菌陽性者の内訳は, 保育園児24名 (有症者: 22, 非発症者: 2), 保育園職員4名 (非発症者: 4), 園児家族4名 (二次感染者, 有症者: 2, 非発症者: 2)であった。本集団事例の発生原因として, 園児らが共通に喫食した給食を疑い保存検食の検査をしたところ, 6月27日に供されたメロンからEHEC O157を検出した。疫学調査結果に加え, 患

者およびメロン由来株の生化学的性状, DNAパターンが一致したことから, 本事例はメロンを原因食品とする集団感染事例であることが明らかとなった (表1)。

表1 保育園集団食中毒事例の概要

発生の届け出	7月 4日
初発患者発生日	6月 28日
最終感染者判明日	7月 12日
感染者数	32名
園児 (有症)	22
(無症状)	2
職員 (無症状)	4
二次感染者 (家族)	4
暴露日	6月 27日
原因食品	給食 (メロン)
原因物質	EHEC O157:H7 (VT1+VT2産生)

III 材料及び方法

1. 便からの菌分離

患者からの菌分離は病院検査室, 民間検査所で実施され, 接触者の検便は保健所で行った。保健所では, 分離平板にSIB寒天培地 (極東製薬) を用い, 直接培養法及び, ノボビオシン加mEC培地による増菌培養を併用して行った。

2. 食品からの菌分離

1) 検査材料

原因菌究明および汚染経路の解明のため, 6月19日から7月2日の12日間の保存検食・食材187検体および調理器具等のふき取り45検体について検査を行った。

2) 検査方法

食品25gにノボビオシン加mEC培地 (極東製薬) 225mlを加え, ストマッカー処理後, 42°C で18~20時間静置培養を行った。その培養液についてイムノクロマト系キット (イムノキット) による検査を行い, 陽性および疑陽性を示す検体は腸管出血性大腸菌O157用免疫磁気ビーズ (DYNABEADS™ anti-E.coli O157, DYNAL) による集菌を使用書に従って行った。イムノキットは, VIP (Biocontrol), Reveal (Neogen), PATH-STIK

千葉県衛生研究所

1) 千葉県衛生研究所, 現: 千葉縣市原保健所
(1998年11月12日受理)

(Lumac), EZ Coli (Difco), Now E.coli (Binax) を用いた。分離培地はセフィキシム (0.05mg/1000ml), 亜テルル酸カリウム (2.5mg/1000ml) サプリメント (MAST DIAGNOSTICS) 添加ソルビトールマッコンキー培地 (MAST DIAGNOSTICS) (CTSMAC) およびクロモアガー (Microbiology) を用いた。分離培地上の疑わしい集落は、生化学的性状試験を行い大腸菌であることを確認し、血清型別およびVTEC-RPLA (デンカ生研) によるベロ毒素産生試験を行った。MPN 法による菌数測定は0.1%ペプトン加生理食塩水を用いて作成したメロンの10%乳剤の10ml, 1ml, 0.1ml, 0.01mlを、それぞれノボビオシン加mEC培地で37°C, 20時間培養後、腸管出血性大腸菌O157免疫磁気ビーズによる集菌を行い、CTSMACおよびクロモアガー上に塗抹培養して行った。

3. 薬剤感受性試験

センシディスク (BBL) を用い、使用書に従い測定を行った。アンピシリン, テトラサイクリン, ストレプトマイシン, クロラムフェニコール, カナマイシン, ナリジクス酸, スルフォメトキサゾール/トリメトプリム及びノルフロキサシンの8剤について試験を行った。

4. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

DNA の抽出と試料の調整は、満田ら¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、供試菌をBrain heart infusion培地で37°C, 18時間振とう培養後、その100µlを遠心集菌した。菌体に50µlのSEバッファー (75mM NaCl, 25mM EDTA) と等量の1%低融点アガロース (Bio-Rad) およびlysozyme (25mg/ml) を4µl加え、サンプルゲルブロックを作成した。ゲルブロックをlysis solution (1M NaCl, 0.1M EDTA [pH8.0], 0.5% [w/v] Brij-58, 0.2% [w/v] deoxycholate, 0.5% [w/v] sarkosyl, 1mg/ml lysozyme) 内で37°C, 1時間反応させ溶菌を行った。次いで、蛋白分解液 (0.25M EDTA [pH8.0], 1% [w/v] sarkosyl, 0.1mg/ml proteinase K) 中で16~20時間, 50°Cで蛋白消化を行った後、1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride を含むTEバッファー (10mM Tris, 1mM EDTA [pH8.0]) 中で30分間室温放置し、以後、TEバッファーで4回洗浄した。このゲルを適当な大きさに切断後、制限酵素Xba I で37°C, 18時間処理した。電気泳動は、CHEF-DR III (Bio-Rad) システムで、0.5xTBEバッファー, 1%アガロースゲルを用い、200V, 14°Cの条件下、パルスタイム4~8秒で10時間, 8~50秒で12時間行った。

5. Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

インスタジーンDNA精製マトリックス (Bio-Rad) によりDNAを抽出した。PCR反応液は、鋳型DNA (50µg/ml) 1µl, Taqポリメラーゼ (ベーリンガー 5u/ml) 0.5µl, ポリメラーゼ添付 x10 Buffer 2.5µl, 2.5mM dNTP混合液 (Takara) 2µl, プライマー (10µM) 1µl に純水18µlを加え作成した。PCR条件は、95°Cで3分反応後、93°C30秒, 55°C30秒, 72°Cを35サイクル繰り返し、72°C3分で行った。プライマーは、G11 (Operon)²⁾を用いた。電気泳動は1%アガロースを使用して行い、エチジウムブロミド染色後紫外線光源下で写真撮影した。

IV 結果

1. 食中毒原因菌検索

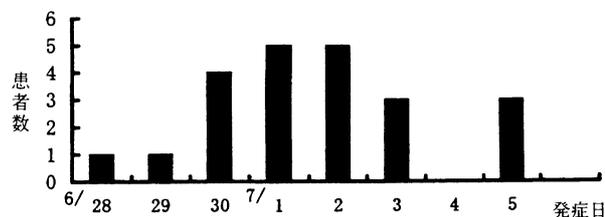
食中毒患者及び接触者の検便は医療機関及び保健所検査室において行われ、保育園児24名の他、保育園職員4名および園児家族4名の合計32名からEHEC O157が検出された。菌陽性保育園児の年齢別内訳は、3歳児10名 (38.4%), 4歳児7名 (50.0%), 5歳児7名 (38.8%) で、0歳, 1歳および2歳児からはEHEC O157は検出されなかった (表2)。園児における患者発生は6月28日から7月5日まで認められ、日別発症状況は7月1日および2日をピークとする一峰性を示した (図1)。潜伏時間は1日から8日で、平均潜伏時間は4.6日であった。また菌陽性園児24名の内非発症者2名を除く22名の症状は、下痢20名 (91%), 腹痛7名 (32%), 発熱2名 (9%) で、下痢の程度は水様下痢14名、血便5名、軟便1名であった。

表2 クラス別患者発生状況

クラス	園児数	O157 陽性者数	(陽性率)
0歳	4	0	(0)
1歳	15	0	(0)
2歳	11	0	(0)
3歳	26	10	(38.4)
4歳	14	7	(50.0)
5歳	18	7	(38.8)
合計	88	24	

3~5才園児平均発症率 24/58 (41.4%)

図1 日別患者発生状況
(有症園児22名)



食中毒の原因食品追求のため、冷凍保存されていた2週間分の検食についてEHEC O157検査を行った。保存検食の内訳は、調理済み食品81品目, 野菜・肉等の食材106品目であった。検査の結果、調理済み食品は何れも菌陰性であったが、非加熱食品の内6月27日にデザートとして供されたメロンからEHEC O157が分離された。メロンのEHEC O157菌数をMPN法により測定したところ、43cfu/gであった。調理器具等のふき取り45検体からは、EHEC O157は検出されなかった。

2. 分離株の性状

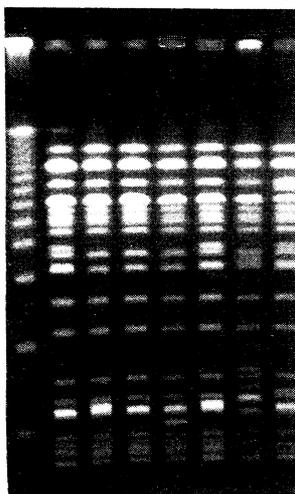
患者由来株及びメロン由来株の生化学性状を表3に示す。患者由来32株およびメロン由来株は共に大腸菌の生化学的性状を示し、血清型はO157:H7, 毒素型はVT1, VT2両毒素産生型であった。分離株の薬剤感受性試験の結果、患者由来株, メロン由来株共にSMに中等度耐性を示し、その他の7剤には感受性を示した。

表3 分離株の生化学的性状

試験項目	性状	
	患者由来株	メロン由来株
インドール	+	+
V-P	-	-
クエン酸 (シモンズ)	-	-
硫化水素 (TSI)	-	-
ウレアーゼ	-	-
リジンデカルボキシラーゼ	-	-
オルニチンデカルボキシラーゼ	-	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-	-
運動性	+	+
マロン酸	-	-
β-グルクロニダーゼ	-	-
ブドウ糖：ガス産生	+	+
糖：ブドウ糖	+	+
L-アラビノース	+	+
セロビオース	-	-
乳糖	+	+
麦芽糖	+	+
メリビオース	+	+
ラフィノース	+	+
ラムノース	+	+
白糖	+	+
トレハロース	+	+
D-キシロース	+	+
アドニット	-	-
ズルシット	+	+
マンニット	+	+
ソルビット	-	-
サリシン	-	-
イノシット	-	-
マンノース	+	+
ソルボース	-	-

図2 集団食中毒由来株のPFGE

M 1 2 3 4 5 6 7



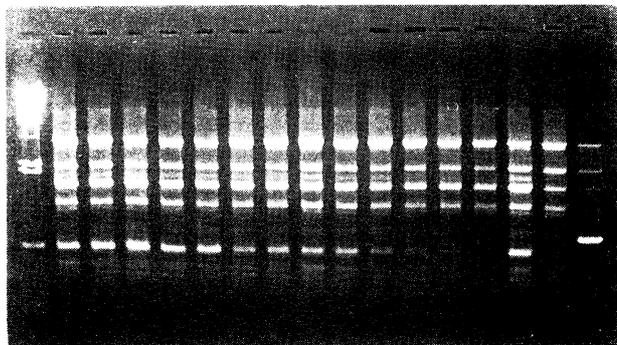
Lane
M：分子量マーカー
1：メロン由来株
2～5：患者由来株
6：感染研 2 (広島県由来)
7：感染研 212 (堺市由来)

3. 分離株の遺伝子パターンの比較

患者由来株およびメロン由来株のPFGEによる遺伝子パターンを図2に示す。メロン由来株 (レーン1) および患者由来株の2株 (レーン5に代表株を示す) で200kb付近に付加的バンドが認められ、患者由来株の5株 (レーン4に代表株を示す) で55kb付近に付加的バンドが認められたが基本的なパターンは同一であった。RAPDによる遺伝子パターンを図3に示す。メロン由来株 (レーン1) と患者由来株 (レーン2～14) は同じパターンを示した。

図3 集団食中毒由来O157のRAPDパターン

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



Lane
M：分子量マーカー
1：メロン由来株
2～14：患者由来株
15：感染研 2 (広島県由来)
16：感染研 212 (堺市由来)

V 考察

EHEC O157による食中毒の潜伏時間については、原因食品が特定された例が少ないことから、よく知られていないのが現状である。1997年8月に伊勢崎市の寿司屋で発生したマグロの血合いが原因の事例では、潜伏時間は1.8日から11.2日で平均5.2日と報告されている³⁾。また原因食品は明らかになっていないが、岡山県邑久町の集団発生事例では、潜伏時間が1日から12日で菌陽性者の平均潜伏時間を4.6日、新見市の事例では1日から17日で菌陽性者の平均潜伏時間を5.3日⁴⁾、および奈良県における事例では2日から11日で平均潜伏時間を5.1日⁵⁾と推定している。柏市の保育園で発生した事例では、初発患者は原因食品を喫食した1日後に腹痛と水様下痢を訴え発症し、最後の患者発生は喫食の8日後で、平均潜伏時間は4.6日と計算された。本事例で、最長潜伏時間が8日と他の事例に比べて短い理由として、保健所に集団発生の通報がなされた翌日に行われた関係者の一斉検便で、その時点における排菌者を全員検出する事ができたことがあげられる。Karchら⁶⁾は、抗生物質治療が行われていない小児のEHEC O157患者の検便を繰り返し行って、患者は感染後2日から65日と長期にわたって排菌したと報告している。従って潜伏時間を考えるとき、経口感染した原因菌によって発症したのか、感染後の保菌状態が続いている時に別の何らかの原因で下痢症状を呈した時に

たまたま検便したのかを慎重に考える必要がある。また、EHEC O157は感染に必要な菌量が少ないために、食品からの感染のみならずヒトからヒトへの二次感染が認められる。本事例においても4名の二次感染者が認められた。これまでに発生した集団事例でも、二次感染が認められているが何れも家族内に限られ、それ以外に拡大した例は認められていない。本事例においても、二次感染者は患者の家族に限られていた。

EHEC O157による集団食中毒の原因としてこれまでに、おなかサラダ(岐阜市・小学校)、カボチャサラダ・シーフードソース(盛岡市・小学校)、ポテトサラダ(帯広市・幼稚園)、マグロの血合い(伊勢崎市・寿司屋)、日本そば(岡山市・病院)が特定されている。マグロの血合いを除いた食品は何れも調理済み食品であり、材料が汚染されていたのか調理過程で汚染されたのか推定が難しい。食中毒関連食品のEHEC O157汚染菌量は、盛岡市・小学校の事例では4~18cfu/100gで、摂取菌量は9~57cfu/ヒトと推定されており⁷⁾、1998年に発生したイクラによる事例では検体によって0.9cfu/100g⁸⁾あるいは1~5cfu/10g⁹⁾と報告されている。柏市保育園事例のメロンの汚染菌数は43cfu/gで、各園児は八等分にした一片約50gを食べていることから、摂取菌量は約2000cfuと推定される。メロンは前述の事例と比較すると約100倍の菌量で汚染されていたことになる。事件の後、原因となったメロンと同種類のメロン54検体について検査を行った結果、EHEC O157は検出されなかったものの、果皮部分の一般細菌数は $10^3 \sim 10^6$ cfu/gのレベルを示し、大腸菌群数が 6×10^3 cfu/gを示す検体も認められた。一方果肉部分は、一般細菌数、大腸菌群数共に300cfu/g以下であったが、実験的にEHEC O157を接種し37℃で培養すると、接種菌量が数個でも一晚培養後には 10^8 cfu/mlレベルまで増殖することが確認された。水分が多いメロンの一片を検食として保存する際、保存容器の中では果皮部分が果肉のジュースに浸る状況が生じる。もし果皮が何らかの原因でEHEC O157に汚染されていたならば、凍結保存が完了するまでの間に菌が増えた可能性は十分考えられる。また本事例では、0~3歳児では発症者がなく、患者は4~6歳児に限られていた(表2)。当該保育園では、0~3歳児と4~6歳児は別のフロアで保育されており、給食も別々に調理されていた。しかし調理人は共通であったことから、メロンが洗浄及びカットされる過程で調理人により汚染されたとは考えにくい。

保存検食および食材は、イムノキットでスクリーニングし、陽性あるいは疑陽性を示した検体についてのみビーズ法を行った。イムノキットは数社から市販されているが、何れも検出感度は 10^5 cfu/mlで製品による差はほとんど認められない。本事例の検査では保存食品・食材数は187検体と多数であったことから、手元にあった5種類のイムノキットを全て充当して検査を行った。イムノキットは疑陽性反応の頻度が高いことが指摘されているものの、EHEC O157検出率はビーズ法と比較して差がないと報告されている^{10,11)}。今回の事例においても、イムノキットによる疑陽性検体は10%程度に認められたが、作業行程が複雑なビーズ法で菌分離を行う検体数を十分の一に減らすことができ、結果として作業量が少なく、効果的かつ速やかに原因食品を特定することができた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本事例の調査及び検査を担当し、情報の提供及び菌株の分離及び送付をしてくださった柏保健所の担当者の皆様に深謝いたします。

VI 文 献

- 1) 満田年宏, 荒井一二, 川本 進, 横田俊平(1995): パルスフィールドゲル電気泳動法による感染症の分子疫学的解析, 日細菌誌, 50: 1077-1086.
- 2) 国立感染症研究所細菌部(1997): Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), 腸管出血性大腸菌O157の検出・解析等の技術講習会資料, 32-42.
- 3) 斉藤朝子, 黒澤 肇, 石川哲也, 狩野文子, 小林洋平, 大月邦夫, 猿谷 繁(1998): 出前寿司に起因した腸管出血性大腸菌O157: H7集団下痢症一群馬県, 病原微生物検出情報: 19, 57-58.
- 4) 第55回日本公衆衛生学会緊急シンポジウム 病原性大腸菌O157と地域保健, 資料集 平成8年10月31日 大阪大学医学部 公衆衛生学教室
- 5) Karch H, H. Rüssmann, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, and J. Heesemann, 1995. Long-term Shedding and Clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157 in diarrheal diseases. J. Clin. Microbiol. 33: 1602-1605.
- 6) 熊谷 学, 斉藤幸一, 田頭 滋, 五日市恵里, 吉田耕次, 一ノ渡義巳, 山目行人, 赤沼柳子, 田澤光正, 玉田清治, 高田清巳, 藤田紀弥, 緒方 剛, 佐藤成大, 品川邦汎. 1997. 学校給食を原因とする腸管出血性大腸菌O157の集団感染事例について. 日本食品衛生学会 第73回学術講演会講演要旨集: 50.
- 7) 北海道立衛生研究所食品科学部(1998): イクラ醤油漬の腸管出血性大腸菌O157汚染に関する調査-北海道, 病原微生物検出情報: 19, 225-226.
- 8) 神奈川県衛生研究所細菌病理部(1998): 「イクラ」からの腸管出血性大腸菌O157: H7の検出-神奈川県, 病原微生物検出情報: 19, 204-205.
- 9) 岡山県邑久郡邑久町及び新見市における腸管出血性大腸菌(O157: H7)集団食中毒事件 報告書 平成9年3月 岡山県
- 10) 熊谷 進他(研究室間共同研究班員21名)(1997): 牛挽肉からの腸管出血性大腸菌O157: H7の検出法: 研究室間共同研究(Collaborative study). 日本食品衛生学会 第74回学術講演会 講演要旨集, 82.
- 11) 尾上洋一他(研究室間共同研究班員21名)(1997): カイワレ大根からの腸管出血性大腸菌O157: H7の検出法: 研究室間共同研究(Collaborative study). 日本食品衛生学会 第74回学術講演会 講演要旨集, 83.