毒素原性大腸菌 O25:H42 および O169:H41 の 混合感染による食中毒とその感染経路について

塚本定三^{*1}・河合高生^{*1}・久米田裕子^{*1}・濱野米一^{*1}
川津健太郎^{*1}・依田知子^{*1}・浅尾 努^{*1}・石橋正憲^{*1}
柴田忠良^{*1}・吉田 薫^{*2}・甲山祥彦^{*2 (1)}

(^{*1}大阪府立公衆衛生研究所, ^{*2}池田保健所 (⁽¹⁾現 寝屋川保健所))

(受付 平成7年2月24日)

(受理 平成7年5月12日)

An Outbreak of Mixed Food Borne Infection with Enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:H42, O169:H41 and the Infection Route of Causative Bacteria

Teizo TSUKAMOTO^{*1}, Takao KAWAI^{*1}, Yuko KUMEDA^{*1}, Yonekazu HAMANO^{*1},
Kentaro KAWATSU^{*1}, Tomoko YODA^{*1}, Tsutomu ASAO^{*1}, Masanori ISHIBASHI^{*1},
Tadayoshi SHIBATA^{*1}, Kaoru YOSHIDA^{*2} and Yoshihiko KOHYAMA^{*2 (1)}

(^{*1}Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537 and

^{*2}Ikeda Public Health Center, 3-19 Masumicho, Ikeda-shi, Osaka 563. ⁽¹⁾Present address:

Neyagawa Public Health Center, 28-3 Yasakacho, Neyagawa-shi, Osaka 569.)

An outbreak of mixed food borne infection with 2 serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* occurred twice at a wedding hall in Osaka during the period from September 11 through 23, 1993. During the first outbreak, 776 out of 1242 persons were affected, while 350 out of 627 persons were affected during the second outbreak. The major clinical symptoms observed among patients in both cases were diarrhea and abdominal pain. *E. coli* O25:H42 and O169:H41 were isolated from the feces of the patients (first outbreak), and were confirmed to produce heat stable toxin (ST). We succeeded in detecting *E. coli* O169:H41 from the incriminated food (Kaiseki Ryouri). This may be the first report of an enterotoxigenic *E. coli* isolated from incriminated food as the cause of outbreak in Japan.

Key words: Mixed food borne infection, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Two serotypes, Incriminated food.

緒 言

わが国の細菌性食中毒のうち、下痢原性大腸菌（病原大腸菌）によるものは厚生省の1993年の統計によると発生件数ではサルモネラ、腸炎ビブリオ、ブドウ球菌に次ぐが、患者数はサルモネラの次に多い⁸⁾。これは1事件当たりの患者数がほかの食中毒起因菌のそれに比べて

多く、その発生は大規模になることを意味しており、1988年から1993年までの5年間で1事件当たりの患者数が500名以上の食中毒38件のうち12件は下痢原性大腸菌によるものである⁸⁾。今回、著者らが経験した食中毒事例は、ある結婚式場において2度続けて発生した大規模なもので、病因物質が毒素原性大腸菌であり、2血清型の混合感染というまれなものであった。また、検査として保存されていた会席料理から毒素原性大腸菌を検出したので報告する。

^{*1} ☎537 大阪市東成区中道 1-3-69

^{*2} ☎563 池田市満寿美町 3-19

⁽¹⁾ ☎572 寝屋川市八坂町 28-3

材料および方法

1. 材料

1 度目の食中毒については、1993 年 9 月 18 日から 24 日にかけて採取された患者および結婚式場の調理従事者のふん便、保存してあった会席料理の検食、調理施設のふきとりならびに使用水、汚水を検査材料とした。2 度目は 9 月 27 日から 30 日にかけて採取した 1 度目と同様の品目について行った。また、検食から病原菌が検出された場合にはその検食と同一ロットの製品（未開封）についても検査対象とした。

2. 検査方法

1) 病原菌の検索

食中毒起因菌を対象に常法⁶⁾に従って検索を行った。なお、食品中の毒素原性大腸菌の菌数測定には検査材料の 10 倍および 100 倍希釈液を作製し、その 0.1 ml を直接 DHL 寒天培地に塗抹した。37°C、24 時間培養後、発育した大腸菌様集落をできるだけ多く釣菌して、それらについて生化学的性状、血清型別を行った。さらに以下に述べる毒素産生試験を実施して毒素原性大腸菌を同定し、菌数を算出した。

2) 大腸菌の同定

分離した大腸菌の生化学的性状は EWING²⁾の記載に準じて行った。血清型別は O および H 型により決定した¹⁴⁾。供試菌の O 抗原は生菌を用いた市販の病原大腸菌診断用血清（デンカ生研）によるスライド凝集反応で推定した。その後、供試菌を 100°C、1 時間加熱し、O1~173 までの自家免疫した抗 O 血清を用いて定量凝集反応を実施して O 型を決定した。H 型別は供試菌を半流動培地で数回通過させた後、H1~56 の抗 H 血清を用いて常法に従って調べた²⁾。

3) 毒素産生試験

供試菌を CAYE 培地で 37°C、24 時間振とう培養後、その培養液を遠心して上清のろ過したものを試料とした。易熱性エンテロトキシン (LT) 産生性は VET-RPLA（デンカ生研）を用い、耐熱性エンテロトキシン (ST) 産生性はコリスト EIA（デンカ生研）で調べた。また、Vero 毒素 (VT) 産生性は試料を大腸菌ペロトキシン検出用キット（デンカ生研）を用いて行った。

4) HeLa 細胞への付着性試験

SCALETSKY ら¹²⁾の報告に準じて既報¹⁷⁾のごとく実施した。

5) プラスミドプロファイル型別

分離した大腸菌について Kado and Liu の記載した方法³⁾に準じてプラスミド DNA を抽出した。得られたプラスミドは 0.7% アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイドによる染色を行った。プラスミドの大きさのマーカーとして神戸市環境保健研究所 村瀬 稔博士より分与された大腸菌 R222 (70 megadalton [Md]), RP4 (36 Md), R46 (32 Md) および RSa (23 Md) を用いた。

結 果

1. 概要

1993 年 9 月 16 日、大阪府下の某結婚式場において 9 月 11 日の結婚披露宴に出席した者の中から下痢、腹痛などの食中毒症状を呈している者がいる旨の連絡があった。当該結婚式場に事情聴取し調査したところ、9 月 12 日、15 日および 16 日に出席したグループの中にも同様の食中毒患者がいることがわかり、合わせて 21 組の喫食者 1242 名のうち患者は 776 名 (62.5%) となった。所轄の保健所は披露宴の会席料理が原因であるとして、結婚式場の調理施設に対して 9 月 17 日および 18 日の 2 日間営業停止を命じた。調理施設を改善したのち再開したが、9 月 19 日および 9 月 23 日に出席したグループからも食中毒患者が発生し、調査の結果 12 組の喫食者 627 名のうち患者 350 名 (55.8%) がいることが判明した。原因食品として前回と同様に当該施設の披露宴による会席料理以外に共通食はなく、同施設を 10 月 7 日から 10 月 16 日までの 10 日間、再度営業停止を行った。

2. 疫学調査

患者の主な臨床症状を Table 1 に示した。1 度目と 2 度目の患者の臨床症状は同様な傾向がみられ、下痢は 1 度目は 746 名 (96.1%)、2 度目は 342 名 (97.7%) でともに最も多く、ついで腹痛が 1 度目は 576 名 (74.2%)、2 度目は 257 名 (73.4%) であった。下痢は 1 度目、2 度目ともに 1 日に 5 回程度、便性はほとんどが水様性であった。また、腹痛は上腹部、臍部、下腹部と特定できなかった。倦怠感 は 1 度目 228 名 (29.4%)、2 度目 77 名 (22.0%)、脱力感 は 1 度目 212 名 (27.3%)、2 度目 82 名 (23.4%) であった。発熱は 1 度目 171 名 (22.0%)、2 度目 64 名 (18.3%) でほとんどの患者は微熱で 37~38°C 程度のものが多かった。そのほかに、おう気、頭痛もみられた。

原因食品については 1 度目、2 度目ともに和食、洋食の会席料理のうち和食を喫食したグループのみ患者が発生していたため、和食の会席料理と推定した。また、9 月 11 日から 16 日の喫食調査をもとに χ^2 検定を行ったところ、多くの食品が高い数値を示しており、各種食品が詰め合わされている会席料理のうち、どれが原因食品

Table 1. Main clinical symptoms of 776 patients (first time) and 350 patients (second time)

Symptom	No. of patients (%)	
	First time	Second time
Diarrhea	746 (96.1)	342 (97.7)
Abdominal pain	576 (74.2)	257 (73.4)
Weariness	228 (29.4)	77 (22.0)
Enervation	212 (27.3)	82 (23.4)
Fever	171 (22.0)	64 (18.3)
Nausea	134 (17.3)	52 (14.9)
Headache	106 (13.7)	47 (13.4)

Table 2. Isolation of *E. coli* and other pathogenic bacteria from various specimens

Specimens	No. of examined	No. of positive for					Plesio. ^e
		O25:H42 ^a	O25:HNT ^{*b}	O169:H41 ^c	O25:H42 + O169:H41	O25:H42 + Camp. ^d	
Patient's feces (first time)	20	4		4	4	1	
(second time)	1						
Foodhandler's feces (first time)	32	2		2			1
(second time)	2						
Food (first time)	16						
(second time)	81			1			
Water drinking (first time)	1						
(second time)	16						
drainage (first time)	1						
(second time)	8		1				
ice (second time)	3		1				
Swabs (first time)	20						
(second time)	27		2				

* NT: Nontypable

^a: *E. coli* O25:H42, ^b: *E. coli* O25:HNT, ^c: *E. coli* O169:H41, ^d: *Campylobacter*, ^e: *Plesiomonas*Table 3. Biochemical characteristics of *E. coli* O25:H42 and O169:H41

Characteristic	O25:H42 ^a	O169:H41 ^b	Characteristic	O25:H42	O169:H41
Hydrogen sulfide (TSI)	—	—	Glucose/Gas	+ / +	+ / +
Urease	—	—	Lactose	+	+
Indole	+	+	Sucrose	+	+
Methyl red	+	+	Mannitol	+	+
Voges-Proskauer	—	—	Salicin	(+)*	(+)
Citrate (Simmons')	—	—	Adonitol	—	—
Citrate (Christensen's)	—	—	Arabinose	+	+
Motility	+	+	Sorbitol	+	+
Gelatin	—	—	Maltose	+	+
Lysine decarboxylase	+	—	Phamnose	+	—
Arginine dihydrolase	—	—	Xylose	+	—
Ornithine decarboxylase	—	+	Dulcitol	+	—
Malonate	—	—	Inositol	—	—
Oxidase	—	—	Trehalose	+	+

* Positive reaction after 3 or more days.

^a All of 11 strains (9 strains from patients and 2 strains from foodhandlers) showed identical results.^b All of 14 strains (8, 2, 4 strains from patients, foodhandlers, foods, respectively) showed identical results.

なのか特定するに至らなかった。一方、調理施設では井戸水を塩素殺菌した特設水道の水を使用しており、水系による感染の可能性も疑われた。

3. 細菌学的検査成績

患者および調理従事者のふん便、検食、調理施設のふきとりならびに使用水、汚水からの食中毒原因菌の検出状況は Table 2 に示すとおりである。1 度目の患者ふん便 20 検体中 4 検体から大腸菌 O25:H42, 4 検体から大腸菌 O169:H41, 4 検体から大腸菌 O25:H42 と O169:H41, 1 検体から大腸菌 O25:H42 と *Campylobacter jejuni* を検出した。調理従事者のふん便 30 検体中 2 検体から大腸菌 O25:H42, 2 検体から大腸菌 O169:H41, 1 検体から *Plesiomonas shigelloides* を検出した。2 度目は患者、調理従事者のふん便それぞれ 1 検体、2 検体からの病原菌の検出はなかった。また、2 度目の食品の

検食 81 検体中 1 検体（貝柱キャビア）から大腸菌 O169:H41 を検出した。一方、水道水などの水の検査については、2 度目の汚水 8 検体、冷却用水 3 検体からそれぞれ 1 検体ずつ大腸菌 O25:H 型別不能を検出した。また、調理器具などの拭き取りについては、2 度目の 27 検体のうち 2 検体から大腸菌 O25:H 型別不能を検出した。

大腸菌 O169:H41 が検出された検食の貝柱キャビア（タイラギ貝の貝柱にトビウオの卵をまぶしたもの）についてその菌数を調べてみたところ、40 個/g であった。また、それと同一ロットの製品 3 検体についても、それぞれ 593 個/g, 338 個/g, 309 個/g の大腸菌の O169:H41 が検出された。

分離した大腸菌の詳細な生化学的性状を Table 3 に示した。患者および調理従事者のふん便から分離した大腸

Table 4. Pathogenicity of *E. coli* O25:H42, O25:HNT and O169:H41

Source	<i>E. coli</i> serotype	No. of strains tested	No. of positive strains			
			ST ^a	LT ^b	VT ^c	adherence ^d
Patient	O25:H42	9	9	0	0	0
	O169:H41	8	8	0	0	0
Foodhandler	O25:H42	2	2	0	0	0
	O169:H41	2	2	0	0	0
Food (incriminate) (same lot)	O169:H41	1	1	0	0	0
	O169:H41	3	3	0	0	0
Water (drainage) (ice)	O25:HNT*	1	0	0	0	0
	O25:HNT	1	0	0	0	0
Swabs	O25:HNT	2	0	0	0	0

* NT: Nontypable.

^a Heat-stable enterotoxin, ^b Heat-labile enterotoxin, ^c Verotoxin, ^d Adherence to HeLa cells.

菌 O25:H42 の 11 株はすべて同一の性状を示し、典型的な大腸菌と同定された。また、同様に患者および調理従事者のふん便、検食および同一ロットの貝柱キャビアから分離した大腸菌 O169:H41 の 14 株も生化学的性状はすべて同一であった。なお、汚水、冷却用水およびふきとりから分離した大腸菌 O25:H 型別不能の 4 株は各々いくつかの生化学的性状が異なっていた。

分離した大腸菌の病原性を調べるために毒素産生試験 (LT, ST, VT) および HeLa 細胞への付着性試験を行った成績を Table 4 に示した。患者および調理従事者のふん便から分離したすべての大腸菌 O25:H42 および O169:H41 は ST の産生がみられ、LT, VT および HeLa 細胞への付着性は陰性であった。また、検食およびそれと同一ロットの貝柱キャビアから分離した大腸菌 O169:H41 も ST を産生した。そのため、これらの大腸菌 O25:H42 および O169:H41 は ST 産生の毒素原性大腸菌と同定した。しかし、汚水、冷却用水、調理器具の拭き取りから分離した大腸菌 O25:H 型別不能は LT, ST, VT のいずれも産生せず、HeLa 細胞への付着性も認められなかった。

患者および調理従事者のふん便から分離した大腸菌 O25:H42 の 11 株についてプラスミドプロファイルを実施した結果、これらはすべて泳動パターンが同一で約 55 Md と約 20 Md のプラスミドを保有していた。また、大腸菌 O169:H41 については患者および調理従事者のふん便、検食の貝柱キャビアおよびそれと同一ロットの製品から分離した合計 14 株はすべて約 100 Md の大きなプラスミドを保有していた。

考 察

今回著者らが経験した結婚式場における食中毒事例は、病因物質が毒素原性大腸菌であり、2 度続けて発生した大規模なものであった。1 度目においては、患者のふん便 20 検体中 4 検体から大腸菌 O25:H42、4 検体から大腸菌 O169:H41、4 検体から大腸菌 O25:H42 と

O169:H41、1 検体から大腸菌 O25:H42 と *Campylobacter jejuni* を検出した。これらの検査成績から少なくとも 1 度目の食中毒事例は、毒素原性大腸菌 O25:H42 および O169:H41 の 2 血清型の混合感染によるものと考えられた。病因物質が 2 種類の細菌による食中毒事例についてはいくつか報告されており、例えばサルモネラとカンピロバクター、ブドウ球菌と下痢原性大腸菌、カンピロバクターと下痢原性大腸菌の混合感染例などがある^{7,9)}。また、サルモネラ、腸炎ビブリオなどにおいては血清型の異なる 2 菌種による食中毒事例も報告されている^{10,11,15)}。しかし、今回のように毒素原性大腸菌による食中毒で血清型の異なる 2 菌種による事例はまれである。

毒素原性大腸菌による食中毒、集団下痢症において、その感染源として水系が疑われたときに飲料水などから原因菌が検出された報告はある¹⁶⁾。しかし、今回の事例のように感染源の一つとして食品が疑われ、検食そのものから患者由来の大腸菌 O169:H41 と同一の血清型の菌が検出されたことはわが国では初めてと思われる。検食のうち大腸菌 O169:H41 が検出された貝柱キャビアは 1 度目、2 度目の和食の会席料理に供されていたものであった。また、この貝柱キャビアと同一ロットの製品についても大腸菌 O169:H41 が検出されたことは、貝柱キャビアそのものが広く当該大腸菌で汚染されていた可能性がある。貝柱キャビアの原料（タイラギ貝およびトビウオの卵）は輸入されたもので、その原産国は不明であり、大阪市内の加工所で加工、冷凍された後にある業者を通して結婚式場の調理施設に納入された。また、加工所で同時期に加工販売されたものについては、ほかからの苦情は確認されなかった。なお、患者、調理従事者、検食の貝柱キャビアおよびそれと同一ロットの製品から分離した大腸菌 O169:H41 は、詳細な生化学的性状やプラスミドプロファイルの泳動パターンが同一でいずれも ST を産生した。

大腸菌 O169:H41 が検食の貝柱キャビアから 40 個/

g, 同一ロットの製品3検体からそれぞれ309個/g, 338個/g, 593個/g 検出された。本品は冷凍で調理施設に保存されており, 自然解凍後, 調理されることなく直ちに供されるもので, それは1度目, 2度目ともに同様の方法であった。貝柱キャビアの重さは1個約30gで一人当たり2~3個喫食したと考えると, 摂取菌量は $10^3 \sim 10^4$ 個となり, ヒトへの発症について菌数との関係を考える上で興味深い。しかし, 本事例は大腸菌 O169:H41 と O25:H42 の混合感染であるため, O169:H41 のみの菌数だけでなく O25:H42 の菌数との総数で発症の有無を考える必要があろう。

一方, 大腸菌 O25:H42 については, 検食を詳細に検索したにもかかわらず検出されなかったため, 調理に用いた使用水, 汚水などを重点的に調べたところ, 汚水, 冷却用水から大腸菌 O25:H 型別不能を検出した。しかし, これらの菌株は患者からの分離株と血清型で O 型は一致したが H 型が異なり, さらに LT, ST, VT のいずれも産生せず, HeLa 細胞への付着性も認められないものであった。そのため大腸菌 O25:H42 の感染経路を明らかにすることはできなかった。しかし, 調理には井戸水を塩素殺菌した特設水道の水を使用していたが, 1度目の食中毒事例直後の水道管末の検査では残留塩素が認められず, 大腸菌群が検出された。このように十分な殺菌の行われていない水を調理に用いていたことで, 施設内が今回の原因となった毒素原性大腸菌を含めた病原菌で汚染されていた可能性も否定できない。

今回の食中毒の原因となった大腸菌 O25:H42 および O169:H41 はともに毒素を産生する血清型として報告があり^{1,13)}, 私達の分離したこれらの血清型の菌株も ST 毒素を産生する毒素原性大腸菌であった。毒素原性大腸菌の食中毒においては水系による感染が多いとされているが^{13,16)}, 生カキが原因と推定された事例も報告されている⁴⁾。本事例は輸入された冷凍の貝柱キャビアから毒素原性大腸菌を検出されたものであるが, エビ, タコ, イカなどの輸入生鮮魚類からコレラ菌が検出されることもある⁹⁾。このように輸入生鮮魚類のなかには漁獲(養殖)場所で既に病原菌の汚染を受けているものもあり, 特に生食用については保存, 調理など取り扱いに十分注意を払う必要がある。

要 約

1993年9月, 大阪府下の一つの結婚式場において結婚式披露宴の参列者の間で下痢症状を呈する食中毒事件が続けて2度発生した。患者数は初回においては776名, 2度目には350名の大規模なものであった。患者らのふん便検査の結果から原因物質は毒素原性大腸菌であり, O25:H42 および O169:H41 の2血清型の混合感染による非常にまれなものであった。また, 保存してあった検食から毒素原性大腸菌 O169:H41 を分離した。毒素原性大腸菌による食中毒で検食から原因菌を検

出したのはわが国では最初のものと思われる。

稿を終えるにあたり, プラスミドの分子量測定のための菌株を分与していただいた神戸市環境保健研究所, 村瀬 稔博士に深謝いたします。また, 終始御協力を頂きました大阪府食品衛生課ならびに食品衛生特別監視機動班の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 安藤佳代子, 板屋民子, 青木敦子, 斎藤章暢, 正木宏幸, 徳丸雅一: 毒素原性大腸菌 O169:H41 による集団食中毒の細菌学的・疫学的検討。食品と微生物, **10**, 77-81 (1993)。
- 2) Ewing, W. H.: Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th Ed., Elsevier Science Publishing Co., New York (1986)。
- 3) Kado, C. I. and Liu, S. T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol., **145**, 1365-1373 (1981)。
- 4) 甲斐明美, 伊藤 武, 斎藤香彦, 柳川義勢, 稲葉美佐子, 高橋正樹, 松下 秀, 工藤泰雄, 坂井千三, 篠原 楷: 生カキが原因食品と推定された毒素原性大腸菌食中毒2事例の調査成績, 東京衛研年報, **34**, 121-125 (1983)。
- 5) 春日 斉: 輸入魚介類のコレラ菌汚染。食品衛生研究, **36**, 47-53 (1986)。
- 6) 厚生省生活衛生局監修: 食品衛生検査指針 微生物編, p. 108-225, 日本食品衛生協会, 東京 (1990)。
- 7) 厚生省生活衛生局食品保健課: 平成3年食中毒発生状況。食品衛生研究, **42**, 77-104 (1992)。
- 8) 厚生省生活衛生局食品保健課: 平成5年食中毒発生状況。食品衛生研究, **44**, 73-100 (1994)。
- 9) 長尾章郎: カンビロバクターおよび病原大腸菌に汚染された井水による集団食中毒について。食品衛生研究, **34**, 17-36 (1984)。
- 10) 仲西寿男: 腸炎ビブリオ, 食中毒。坂崎利一編集, p. 69-104, 中央法規出版, 東京 (1981)。
- 11) 坂井千三, 伊藤 武, 津野正朗, 丸山 務, 岡沢久美子, 善養寺 浩: *Salmonella kottbus* と *Salmonella kasenyi* の混合感染によると推定される集団食中毒について。食品衛生学雑誌, **14**, 322-323 (1973)。
- 12) Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M. & Trabulsi, L. R.: Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun., **45**, 534-536 (1984)。
- 13) 田村和満, 坂崎利一: 下痢原性大腸菌。食水系感染症と細菌性食中毒。坂崎利一編集, p. 180-201, 中央法規出版, 東京 (1991)。
- 14) 塚本定三: 病原細菌の群別と型別法, 大腸菌。臨床と微生物, **15**, 69-74 (1988)。
- 15) 塚本定三, 浅尾 努, 木下善雄, 光田文吉: サルモネラの2菌型混合感染によると推定される食中毒事例について。大阪府立公衛研所報, **7**, 121-124 (1976)。
- 16) 塚本定三, 大津啓二, 木下善雄, 大中隆史, 本田武司, 三輪谷俊夫: 毒素原性大腸菌による食中毒の発生と患者ふん便からの ELAISA 法によるエンテロトキシンの検出。感染症学雑誌, **60**, 1119-1124 (1986)。
- 17) 塚本定三, 竹田美文: ブラジル, ミャンマーおよびわが国の下痢症患者, 健康者からの拡散性の腸管付着性大腸菌の検出と血清型。感染症学雑誌, **67**, 753-757 (1993)。