

厚生省
平成11年度

新興・再興感染症研究事業

O157等腸管出血性大腸菌感染症に関する
研究班

研究報告書

平成12年3月

主任研究者 **佐藤成大**
(岩手医科大学細菌学講座教授)

厚生省
平成11年度

新興・再興感染症研究事業

O157等腸管出血性大腸菌感染症に関する
研究班

研究報告書

平成12年3月

主任研究者 **佐藤成大**
(岩手医科大学細菌学講座教授)

○157等腸管出血性大腸菌感染症に関する研究班 平成11年度 分担研究者・研究協力者名簿

研究組織

分担研究者

佐藤成大 (岩手医科大学細菌学講座 教授)
千田勝一 (岩手医科大学小児科学講座 教授)
品川邦汎 (岩手大学農学部 教授)
玉田清治 (岩手県衛生研究所 所長)
中村義孝 (岩手県盛岡保健所 所長)

研究協力者

佐々木美香 (岩手医科大学小児科学講座)
一戸貞人 (岩手医科大学小児科学講座 講師)
吉田新二 (岩手県医師会)
森田友明 (森田小児科医院)
木村重信 (岩手医科大学口腔微生物学講座 教授)
根本優子 (岩手医科大学口腔微生物学講座 講師)
小林昌彦 (岩手医科大学口腔微生物学講座)
池田代子 (岩手医科大学口腔微生物学講座)
Francois Taddei (ジャック・モノー研究所)
Miroslav Radman (ジャック・モノー研究所)
齋藤和好 (岩手医科大学外科学第一講座 教授)
寺島雅典 (岩手医科大学外科学第一講座 講師)
柏葉匡寛 (岩手医科大学外科学第一講座)
厨 信一郎 (岩手医科大学第三内科血液部門 教授)
石田陽治 (岩手医科大学第三内科血液部門 講師)
小野葉子 (岩手医科大学第三内科血液部門)
N.H.Russel (Division of Hematology, Nottingham University, UK)
野坂洋一郎 (岩手医科大学口腔解剖学第一講座 教授)
藤村 朗 (岩手医科大学口腔解剖学第一講座 助教授)
重茂克彦 (岩手大学農学部 講師)
松田いぶき (岩手大学農学部)
永井謙一 (岩手県立宮古病院院長)
上野照子 (岩手県立宮古病院臨床検査科)
狩野 敦 (盛岡市立病院院長)
神 光輝 (盛岡市立病院臨床検査)
下沖 収 (岩手県立久慈病院外科)
小林良雄 (岩手県立衛生研究所 細菌部長)
熊谷 学 (岩手県立衛生研究所)
齋藤幸一 (岩手県立衛生研究所)
菅原喜弘 (岩手県立衛生研究所)
佐藤 卓 (岩手県立衛生研究所)

田頭 滋 (岩手県立衛生研究所)
後藤太一 (小岩井農場技術研究センター 前所長)
川畑享子 (小岩井農場技術研究センター)
萱野裕是 (小岩井農場技術研究センター 所長)
高橋勝雄 (岩手医科大学薬剤部 部長)
小野寺直人 (岩手医科大学薬剤部)
川村芳則 (小田島盛岡臨床検査センター)
木村美浩 (小田島盛岡臨床検査センター)
平田陸正 (岩手医科大学細菌学講座 助教授)
稲田捷也 (岩手医科大学細菌学講座 講師)
高橋清実 (岩手医科大学細菌学講座 嘱託講師)
堤 玲子 (岩手医科大学細菌学講座 助手)
一戸奈穂子 (岩手医科大学細菌学講座 研究生)
蒲沢一行 (岩手医科大学細菌学講座 研究生)
小幡史子 (岩手医科大学細菌学講座 嘱託)

目次

1. O157等腸管出血性大腸菌感染症に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
総括研究者：佐藤成大（岩手医科大学細菌学講座）
2. 分担研究報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
分担研究者：千田勝一（岩手医科大学小児科学講座）
共同研究者：佐々木美香（岩手医科大学小児科学講座）
3. 腸管出血性大腸菌感染症における抗LPS抗体測定法の検討・・・・・・・・ 10
分担研究者：佐藤成大（岩手医科大学細菌学講座）
共同研究者：一戸奈穂子、下沖収、小幡史子、堤玲子
高橋清実、稲田捷也、平田陸正
（岩手医科大学細菌学講座）
4. 腸管出血性大腸菌O157、O26、O111に対する母牛の初乳
および子牛血清中の抗LPS抗体測定に関する研究・・・・・・・・ 17
分担研究者：品川邦汎（岩手大学農学部）
共同研究者：松田いぶき、重茂克彦
5. 新興・再興感染症の情報及び支援機構の構築に関する研究・・・・・・・・ 25
分担研究者：玉田清治（岩手県衛生研究所）
6. 岩手県における腸管出血性大腸菌分離株の地理的分布について・・・・・・・・ 33
分担研究者：中村義孝（岩手県盛岡保健所）
7. O57t等腸管出血性大腸菌感染症に関する研究
－パルスフィールド電気泳動法による集団事例の解析－・・・・・・・・ 37
分担研究者：玉田清治（岩手県衛生研究所）
共同研究者：熊谷 学、齋藤幸一、菅原喜弘、佐藤 卓
田頭 滋、小林良雄（岩手県衛生研究所）
8. 腸管出血性大腸菌O157:H7の形態変化および志賀様毒素発現におよぼす
ホスホマイシン、ノルフロキサシンの作用・・・・・・・・・・・・・・・・ 42
研究協力者：根本優子（岩手医科大学口腔微生物学講座）
一戸奈穂子（岩手医科大学細菌学講座）

9.	腸管出血性大腸菌に対する各種抗菌剤最小発育阻止濃度の測定 - 3種類の測定法による比較検討 -	47
	研究協力者：高橋勝男、小野寺直人（岩手医科大学薬剤部） 川村芳則、木村美浩（小田島盛岡臨床検査センター） 狩野 敦（盛岡市立病院） 神 光輝（盛岡市立病院臨床検査部） 永井謙一（岩手県立宮古病院） 上野照子（岩手県立宮古病院臨床検査部）	
10.	腸管出血性大腸菌O157:H7集団感染における抗生剤投与の有効性と 安全性に関するretrospective study	63
	分担研究者：佐藤成大（岩手医科大学細菌学講座） 森田友明（森田小児科医院） 吉田新二（岩手県医師会） 一戸貞人（岩手医科大学小児科学講座）	
11.	病原性大腸菌のDNA安定性の研究	69
	研究協力者：小林昌彦、根本優子、木村重信（岩手医科大学 口腔微生物学講座） Francois Taddei、Miroslav Radman （ジャック・モノー研究所・微生物学講座）	
12.	PCR法によるVT1およびVT2遺伝子の定量に関する基礎的検討	75
	研究協力者：蒲沢一行、高橋清実（岩手医科大学細菌学講座）	
13.	PCR産物の新たな定量法に関する基礎的検討 -DNA sequencerによる Microsatellite typing および 定量的Stx 遺伝子解析への応用 -	83
	研究協力者：小野葉子、石田陽治、厨 信一郎 （岩手医科大学第三内科血液部門） N.H.Russel (Division of Haematology, Nottingham University, UK)	
14.	GERUBUアジュバントを用いた不活化Stx免疫によるウサギ およびウシ血清抗体価の推移	89
	分担研究者：佐藤成大（岩手医科大学細菌学講座） 研究協力者：後藤太一、川畑享子、萱野裕是 （小岩井農場技術研究センター）	

藤村 朗、野坂洋一郎
(岩手医科大学口腔解剖第一講座)

15. 樹状細胞をアジュバントとして利用する粘膜ワクチンの有用性..... 94

研究協力者：堤玲子 (岩手医科大学細菌学講座)

16. 腸管出血性大腸菌に関する腸管免疫の研究
-Dendritic cell を用いた感染症、および抗腫瘍ワクチンの研究..... 99

研究協力者：柏葉匡寛、寺島雅典、齋藤和好
(岩手医科大学第一外科学講座)
堤玲子 (岩手医科大学細菌学講座)

総括研究報告書（平成11年度）

1. O157等腸管出血性大腸菌感染症に関する研究

主任研究者： 佐藤成大（岩手医科大学細菌学講座教授）

研究要旨

腸管出血性大腸菌感染症の封じ込めを目的として、医学、獣医学および行政による研究班を組織し、総合的に研究を推進してきた。本年度はその2年目にあたる。感染対策ネットワークについてのアンケート調査では、回答を寄せた36機関すべてが共用活用できるデータの必要性を認めている一方で、緊急時の検査対応に不安を抱いている施設が多く見られた。検査法においては、ELISAによる血清診断法はO157の診断に有用であることが確認されたが、特異性の向上において改良すべき点がみいだされた。また、特にO157感染症において、牛アルブミンなど他種動物のアルブミンに対する抗体が上昇している例がみられ、O157感染によるポリクローナルなB細胞の活性化と病態との間に関係があることが推察された。Stx遺伝子のコピー数を定量的PCR法で測定することで、細菌数と毒素産生量の関係をより定量的に測定する可能性ができた。過去3年間の腸管出血性大腸菌感染症の発生はほとんどすべてが散発例であり、疫学的に原因食品が特定されたケースはなかった。集団事例についてはパルスフィールド電気泳動によるゲノム解析が感染経路の分析に有効であった。薬剤耐性菌については、過去3年間に分離されたStx産生性のO157、O26、O111の計115株のMICを調べたが、高度耐性の変異株はみいだされなかった。大腸菌における酸化ストレス適応機構であるSoxRSレギュロンと、活性酸素に起因するDNA変異との関係においては、酸化ストレス適応機構はむしろヌクレオチドの酸化を促進し変異率を上昇させる傾向があることが伺われ、スーパーオキシドアニオンラジカルの発現促進がその一因である可能性が示された。免疫については、ウサギや牛にアジュバントとともにStxを免疫するとStx1、Stx2とも良好な抗体産生を示したが、小児の自然感染例においては一般にStxに対する抗体産生は低いレベルに抑えられていた。この点に関し、樹状細胞を用いた癌免疫やウイルスワクチンの研究から、Stxに対しても樹状細胞を用いたトキシド免疫の可能性が示唆された。これらの研究成果をもとに、さらに研究の進展を図る必要がある。

分担研究者

千田勝一（岩手医科大学小児科）
品川邦汎（岩手大学獣医学科）
玉田清治（岩手県衛生研究所）
中村義孝（岩手県盛岡保健所）

平成8年のO157の全国的な流行で、感染症危機管理システムの必要性が強く求められた。我々は、O157等腸管出血性大腸菌感染症の封じ込めを目的として、腸管出血性大腸菌の疫学、細菌学的検査の精度管理および有効な血清診断法の開発、予防免疫の研究などを中

研究目的

心とした総合的な研究を行うこととした。また、同時にこれらの研究目的達成のための感染症対策ネットワークの構築とその問題点の検討も併せて行うこととした。

研究方法

(1)細菌学的研究:O157菌株を抗生剤で処理し、生菌数の測定、Shiga-like toxin(Stx)量の測定、電顕による形態観察を行った。また、O157集団感染時における抗生剤投与の効果および副反応について解析した。パルスフィールド電気泳動法はバイオラドの試薬キットを用いた。MICの測定は微量希釈法で行った。酸化ストレス耐性機構であるSoxRSレギュロンとDNAの変異の関係については、SoxSを強制発現させた*mutT*欠損株を用いて、酸化ストレスのDNAに対する影響を8-oxo-dGTPによるDNA変異として測定した。(2)疫学的研究:岩手県における保健所管区別のStx陽性菌の分離件数を比較した。hemolytic uremic syndrome(HUS)の発生率は腸管出血性大腸菌感染症患者、および疑いの患者で、腸管出血性大腸菌検出症例と非検出例について検討した。検体採取、患者情報についてはインフォームドコンセントに基づき人権を損ねないよう配慮した。(3)免疫学的研究:樹状細胞を用いた癌免疫は抹消血培養由来の樹状細胞を胃癌細胞でパルスしてCTLの誘導をおこなった。ウイルスに対する樹状細胞免疫の研究はC57B/6Jマウスの樹状細胞を用いて研究した。牛初乳および子牛血清の抗体価測定はELISA法により行った。牛糞便中のStx遺伝子の検出はPCR法でおこなった。(4)ネットワークについて:岩手医大細菌学講座、岩手医大小児科学講座、岩手大学農学部獣医学科微生物学講座、岩手県衛生研究所、岩手県盛

岡保健所、民間臨床検査センターをネットワークの骨子とした。アンケート調査は岩手県内の医療機関、保健所等46施設を対象に行った。

結果と考察

(1)抗生剤処理によるStx放出に関しては、ノルフロキサシン処理では菌体外Stx量は測定限界以下であったが、ホスホマイシン処理では増加を認めた。ホスホマイシン処理によるStxの放出はStx遺伝子の発現による合成の誘導ではなく、溶菌によることが示された(根本、一戸)。パルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析を集団発生事例に応用した結果、牛の糞便由来のO157株と患者由来の株が一致した事例、食品由来のO26株と患者由来の株が一致した事例、ハエ由来のO26株と患者由来の株が一致した事例の3例について感染経路の推定が可能であった(斉藤、玉田)。薬剤感受性については、O157,O26,O111(Stx産生菌)を含む115株のFOMに対するMIC rangeは好気性培養0.12~512 μ g/ml、嫌気培養では0.12~64 μ g/mlと広く、株により感受性に大きな差がみられた。過去3年間の腸管出血性大腸菌の薬剤感受性のパターンからFOM、NFLX、KMのいずれかの薬剤にMIC128 μ g/ml以上の低感受性を示す菌株は115株中12株(10.4%)であることが示された(高橋)。大腸菌DNAの変異に関しては、*mutT*欠損株ではSoxS発現下の大腸菌は生育能力が低下し、変異率が上昇することが示され、その一因がスーパーオキシドディスムターゼの発現促進にあることが示された(小林、木村)。(2)岩手県における保健所管区別のStx陽性菌の分離件数は、平成9,10,11年とも盛岡管区の分離件数が最も高かった(中村)。HUSの発生は腸

管出血性大腸菌検出例50例中4例(8%)、非検出例23例中2例(8,7%)であり、両群ともほぼ同様の発生率であった(佐々木、千田)。(3)牛の免疫については、母牛の初乳は分娩直後に抗O157,O26,O111抗体を大量に含むこと、子牛に移行した抗体は少なくとも1ヶ月持続する事が示された。また、Stx遺伝子の保有率は、母牛では分娩前後で差はみられないが、子牛は初乳摂取後は低く、経時的に上昇することが明らかになった。従って、子牛の初乳摂取が子牛の腸管出血性大腸菌感染防御に重要であると考えられた(重茂、品川)。(4)大学、行政、民間臨床検査センターからなるネットワークは、検体採取、患者情報について、インフォームドコンセントに基づいた対応ができることが確かめられた。また、獣医畜産領域の参加により、O157のような人獣共通感染症に対する畜産関係の情報を集めることが可能になった。感染防止ネットワークに関するアンケート調査では、回答のあった36施設(回答率78.3%)の回答をもとに集計解析した。感染情報の共有活用についてはすべての施設が必要と考えていた。検査施設では地域における発生状況のデータを必要としていた。食中毒、伝染病、感染症等での緊急検査依頼については22施設で対応したことがあり、その検査に満足している施設は半数の11施設で、他の11施設は緊急時を考えると不安と答えていた。共有データを作成する機関の候補としては衛生研究所が最適とする回答が最も多かった。研修会に参加したいとする施設は32施設あり、研修内容の希望は技術研修が最も多かった。情報提供の手段としては、今回の集計ではファックスが最多であったが、今後電子メールによる提供が現実的なものになる可能性が考え

られた。情報公開については十分に考慮する必要があると考えられた(小林、玉田)。

結論

地域的な感染症対策ネットワークの構築は、地域の中核となる医療機関と検査体制の実情に応じて構成する必要があると考えられた。アンケート調査では、感染情報の共有活用についてはすべての施設が必要と回答していたことから、今後とも積極的にかつ多角的にネットワーク活動を行ってゆく必要があると考えられた。特に、医師会、行政(地方衛生研究所、保健所を含む)、大学および民間臨床検査センターなどを有機的に結びつける必要があると考えられた。また、ネットワークを機能させるために、インターネット通信を積極的に活用するとともに、技能研修会、セミナーなどを定期的に行い、さらに院内感染対策や集団感染対策などの日常的な課題に対する取り組みをそれぞれの現場で行ってゆく必要があると判断された。

細菌学的検査の精度管理と技能向上の点から、パルスフィールド電気泳動法やPCR法を中核の検査機関でおこない教育とその普及に努めるとともに、MIC測定などの自動機器についての情報は積極的に公開し、できるだけ多くの機関に導入することを勧めてゆく必要があると考えられた。

過去3年間の腸管出血性大腸菌の薬剤感受性のパターンからFOM、NFLX、KMのいずれかの薬剤にMIC128 μ g/ml以上の低感受性を示す菌株が約10%認められたことから、今後とも耐性菌の増加に注意を払う必要があると考えられるが、高度耐性株は検出されず、今回のMIC測定により現行の抗生剤による治療に一定の評価を

与えることができたと考える。大腸菌 DNAの変異機構については今後とも研究を継続する必要がある。HUSの発生は腸管出血性大腸菌検出例50例中4例(8%)、非検出例23例中2例(8.7%)であり、両群ともほぼ同様の発生率であったことから、今後とも、原因の究明に取り組む必要があると考えられた。

免疫については、有効な免疫法の開発が重要であると考えられるが、アジュバントの使用によりStxの免疫原性は十分証明されたので、今後、安全で多価ワクチンの可能性がある樹状細胞を用いた免疫法の研究に力を入れてゆきたい。牛などの家畜の保菌率を低下させるための免疫方法も重要であり、母牛の初乳は分娩直後に抗O157、O26、O111抗体を大量に含み、子牛に移行した抗体は少なくとも1ヶ月持続する事が示された。子牛のStx遺伝子の検出率は初乳摂取後低く、経時的に上昇してゆくことから、子牛の初乳摂取が子牛の腸管出血性大腸菌感染防御に重要であると考えられた。

2. 厚生科学研究補助金（O157等腸管出血性大腸菌感染症に関する研究事業） 分担研究報告書

共同研究者 佐々木美香（岩手医科大学小児科学）
分担研究者 千田 勝一（岩手医科大学小児科学）

要 旨

腸管出血性大腸菌のO26、O111、およびO157感染者の血清LPS (lipopolysaccharide) 抗体と、血清ベロ毒素抗体を測定し、その診断的意義を検討した。対象は腸管出血性大腸菌の感染群42例（急性期血清 n=38、回復期血清 n=35）、および腸管出血性大腸菌以外の細菌性腸炎またはその疑いのある比較対照群15例（急性期血清n=15、回復期血清n=9）で、この血清を用いてO26、O111、およびO157のLPSに対するIgG、IgA、IgM抗体と、ベロ毒素型のVT1、VT2抗体をELISA法により測定した。この結果、感染群の急性期血清では、IgG、IgA、IgM抗体とも陽性を示す者が多く、この陽性率はIgA抗体で最も高かった。しかし、検出菌以外の他のO抗原の型に対しても弱陽性を示す血清がみられた。これらの回復期血清では、急性期に比べてIgG抗体値の変化があまりみられないものの、IgAおよびIgM抗体値が有意に低下し、比較対照群と同等のレベルとなるものが多かった。VT1とVT2抗体の陽性率や推移には一定の傾向が認められなかった。溶血性尿毒症症候群（HUS）発症例（n=6）では、O157が検出された4例と病原菌が検出されなかった2例の全例において、O157に対するIgAおよびIgM抗体が陽性であり、またこれらのベロ毒素型は、全例がVT1陰性でVT2陽性であった。

以上のことから、1）腸管出血性大腸菌O26、O111、およびO157のLPSに対するIgG、IgA、IgM抗体の測定は、腸管出血性大腸菌感染症の診断に有用と考えられた。ただしO抗原の型別判定は困難であった。2）腸管出血性大腸菌の産生するベロ毒素型に対する血清ベロ毒素抗体の測定では、ベロ毒素型の判定に有用な成績は得られなかった。

3）HUS発症例では病原菌が検出されない例でもO157感染がHUSの病因となっていた可能性のあることが推定された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌のO26、O111、およびO157感染者の血清LPS (lipopolysaccharide) 抗体と、血清ベロ毒素抗体を測定し、その診断的意義を検討した。

B. 研究対象と方法

岩手県立衛生研究所からの腸管出血性大腸菌検出者の発生情報をもとに、小児患者を対象としてその主治医に血液採取を依頼した。また、比較対照として腸管出血性大腸菌以外の細菌性腸炎、または下痢症状からその疑いのある小児患者の血液を採取した。これに際しては保護者に研究の説明をして同意を得た。

血液は急性期（発症から15日以内）と回復期（発症30日以降）に採取し、直ちに血清分

離後、-20℃に凍結保存した。LPS抗体はO26、O111、およびO157に対するそれぞれIgG、IgA、IgM抗体と、ベロ毒素抗体はVT1、VT2抗体について、細菌学講座でELISA法により測定した。検体の抗体値は、陽性対照の血清希釈系列の吸光度から検量直線を作成し、その200倍希釈にあたる吸光度を示すものを100として求めた。

C. 研究結果

腸管出血性大腸菌の感染群は42例で、年齢の中央値は3歳（範囲3か月～13歳）であった。O26が20例、O111が5例、O157が17例に検出された。このうち急性期血清は38例（採取中央値は発症4日、範囲1～15日）、回復期血清は35例（採取中央値は発症36日、範囲30～60日）から得られた（表1）。

比較対照群は15例で、年齢中央値は3歳（範囲3か月～17歳）であった。サルモネラ菌が4例、病原性大腸菌のO1とO25が各1例に検出されたが、他の11例では病原菌は検出されなかった。このうち急性期血清は15例（採取中央値は発症4日、範囲1～9日）、回復期血清は9例（採取中央値は発症35日、範囲30～65日）から得られた（表1）。

以上の対象中で溶血性尿毒症症候群（HUS）は6例（1～4歳）に合併し、4例でO157が検出されたが、他の2例では病原菌は検出されなかった。

1. LPS抗体

比較対照群のうちHUSの2例を除く13例の急性期および回復期血清について、O26、O111、O157のLPSに対するIgG、IgA、IgM抗体を測定し、そのそれぞれの平均値+3SD以上を抗体陽性と定義した。

1) 急性期の抗体値

O26、O111、O157の感染群の急性期血清では、IgG、IgA、IgM抗体とも陽性を示す者が多かった（表2、図1）。この陽性率はIgA抗体で最も高く、次いでIgM抗体で高かった。しかし、検出菌以外のO抗原の型に対しても陽性を示す血清がみられた。この理由として、検出菌に対するLPS抗体が、それ以外のO抗原の型が異なる菌とも交差反応をすることが考えられた。しかし、これらの抗体値は、検出菌に対するLPS抗体値よりも低く、弱陽性の値であった。HUS発症例では、O157に対するIgAおよびIgM抗体が全例で陽性を示した（表3）。

2) 回復期の抗体値

O26、O111、O157の感染群の回復期血清では、急性期に比べてIgG抗体値の変化があまりみられないものの、IgAおよびIgM抗体値が有意に低下し、比較対照群と同等のレベルとなるものが多かった。この傾向はHUS発症例でも認められた。

2. ベロ毒素型とベロ毒素抗体

比較対照群のうちHUSの2例を除く13例について、VT1、VT2それぞれに対する抗体を測定し、それぞれの平均値+3SD以上を抗体陽性と定義した。

1) ベロ毒素型

腸管出血性大腸菌の産生するベロ毒素(VT)

の型は、O26感染群ではVT1が17例、VT2が1例であった（表4）。O157感染群ではVT1はなく、VT2が9例、VT1とVT2の両者が7例であった（1例は未検査）。O111感染群ではベロ毒素は検出されなかった。HUSを発症したO157感染群では、4例ともVT1が陰性でVT2が陽性であった（表3）。

2) 急性期の抗体値

VT1の産生が認められたO26感染群の17例とO157感染群の7例のうち、VT1抗体はO26感染群の2例（49単位、2,710単位）とO157感染群の1例（4,143単位）で陽性を示した。また、VT2の産生を認めたO26感染群の1例とO157感染群の7例のうち、VT2抗体はO157感染群の2例のみが陽性であった。HUS発症例のVT1抗体は1例が陽性であった。

3) 回復期の抗体値

回復期血清ではO26感染群4例のVT1抗体が新たに陽性となり、逆に急性期にVT1抗体が陽性であった1例が陰性となった。VT2抗体に新たな変化を認めたものはいなかった。

D. 結論

1. 腸管出血性大腸菌O26、O111、およびO157のLPSに対するIgG、IgA、IgM抗体の測定は、腸管出血性大腸菌感染症の診断に有用と考えられた。ただしO抗原の型別判定は困難であった。
2. 腸管出血性大腸菌の産生するベロ毒素型に対する血清ベロ毒素抗体の測定では、ベロ毒素型の判定に有用な成績は得られなかった。
3. HUS発症例では、O157が検出された4例と病原菌が検出されなかった2例の全例において、O157に対するIgAおよびIgM抗体が陽性を示した。このことから、病原菌が検出されない例でもO157感染がHUSの病因であった可能性のあることが推定された。またHUS発症例のベロ毒素型は、全例がVT1陰性でVT2陽性であった。

謝辞：検体収集にご協力をいただいた以下の
諸先生方に深謝申し上げます（敬称略）。

県立中央病院	根本 照子
県立北上病院	小野寺典夫
県立江刺病院	及川 亨
県立千厩病院	千田 修
県立宮古病院	川原田隆司
県立釜石病院	平賀 祥子
八戸赤十字病院	大山 和成
もりおかこども病院	米沢 俊一
川久保病院	小野寺けい子
北上済生会病院	村上 洋一
新里診療所	赤坂真奈美
八角医院	八角 正司
伊藤小児科医院	伊藤 伸郎
根本小児科医院	根本 瑩子
広岡小児科医院	広岡 豊
三浦小児科医院	三浦 義孝
小林小児科医院	小林 泰宏

表1 対象症例と検体数

	総症例数	急性期血清	回復期血清
腸管出血性大腸菌 感染群	42	38	35
O26 感染群	20	18	17
O111感染群	5	5	3
O157感染群	17	15	15
比較対照群	15	15	9
計	57	53	44

表2 急性期のLPS抗体陽性者

	O26			O111			O157		
	IgG(%)	IgA (%)	IgM (%)	IgG(%)	IgA (%)	IgM (%)	IgG(%)	IgA (%)	IgM (%)
O26 感染群	10 (56)	16 (89)	15 (83)	0	5 (28)	2 (11)	0	8 (44)	2 (11)
O111感染群	0	2 (40)	0	0	2 (40)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	0
O157感染群	3 (20)	11 (73)	2 (13)	0	10 (67)	2 (13)	8 (53)	12 (80)	10 (67)
比較対照群	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 溶血性尿毒症症候群発症例

症例	年齢 (歳)	性別	検出菌	anti LPS									anti VT			
				O26			O111			O157			VT1	VT2	VT1	VT2
				IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM				
1	1	F	O157	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
2	2	M	O157	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
3	3	M	O157	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
4	3	F	O157	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
5	1	F	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
6	4	M	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-

+は陽性、-は陰性を示す

表4 対象感染者のベロ毒素型

	VT1	VT2	VT1 and VT2	産生なし	未検査
O26 感染群	17	1	0	2	0
O111感染群	0	0	0	5	0
O157感染群	0	9	7	0	1

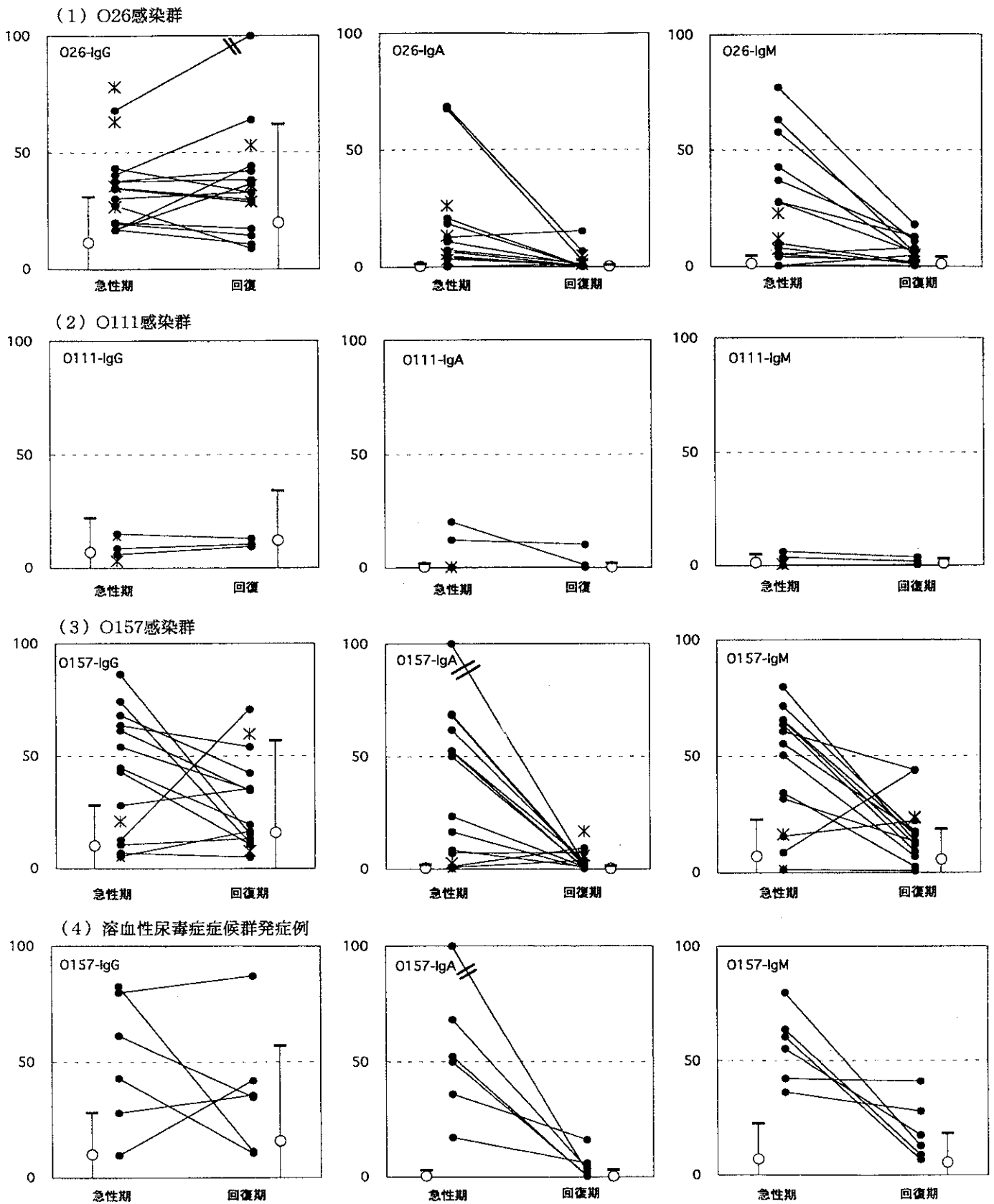


図1 腸管出血性大腸菌感染者および溶血性尿毒症症候群発症例の急性期と回復期の抗体値
 (1) O26感染群、(2) O111感染群、(3) O157感染群のそれぞれに対するIgG、IgA、IgMの抗体値。
 (4) 溶血性尿毒症症候群発症例のO157に対するIgG、IgA、IgMの抗体値。
 縦軸は抗体値、○は比較対照群の平均±3SD、●—●はペア抗体の推移、*はワンポイントのみの抗体値を表す。

3. 腸管出血性大腸菌感染症における抗LPS抗体価について

分担研究者 佐藤成大 (岩手医科大学細菌学講座)

共同研究者 一戸奈穂子 下沖収 小幡史子 堤玲子 高橋清実 稲田捷也 平田陸正
(岩手医科大学細菌学講座)

研究の目的と要旨

1998年から1999年にかけて岩手県内で散発的に発生した腸管出血性大腸菌感染症およびその疑いのあった患者76症例の血清中の抗LPS抗体を測定してきた。その結果、*E.coli* O157感染患者の血清中にはホモのO157抗原に対するLPS抗体に加えて、他の血清型である*E.coli* O26や*E.coli* O111に対するLPS抗体、さらに牛血清アルブミン(BSA)などに対する抗体価の上昇がみられた。一方、*E.coli* O26感染患者の血清中にはホモのO26 LPS抗体が検出されたが、他の抗原に対する抗体上昇は顕著ではなかった。これらのことから、O157とO26や他の抗原との間の交差反応性や、O157 LPSとO26 LPSの多クローン性B細胞活性化(PBA)能の違いなどが想像される。今後、これらの反応性の機序および臨床症状との関連性などを解明することが必要と思われる。

方法

酵素抗体法(ELISA)に基づいた抗LPS抗体測定法(竹田多恵:日本細菌学雑誌1997;52(4):796-9)より、抗O157、O26、O111 LPS抗体価を測定した。その方法を簡単に記すと、はじめに各LPSをマイクロプレートの所定のウェルに固着させ、洗浄後、BSAでブロッキングした。次に、BSA/PBSで希釈した被検血清を加えて反応させ、洗浄後、二次抗体(HRP; horseradish peroxidase 標識抗ヒトIgG(あるいはIgMやIgA))を加え反応させた。洗浄後、基質を加えて発色させ、反応停止液を加えて492nmの吸光度を測定した。なお、我々は、実験間変動を抑えて定量性を高めるため、O157LPSに対して高い抗体価を示した患者血清を陽性コントロールとして、その希釈系列を作って実験ごとに検量線を作成し、その1/200希釈したコントロール血清のOD値を抗体価100として、患者血清のOD値から抗LPS抗体価を算出した。

結果と考察

1) BSAによるブロッキングおよび希釈液にBSAを加える意義について

LPS抗体測定時にプレートにBSAブロッキングを行うことによって偽陽性が認められる事を、1998年にChart H.ら(Lett Appl Microbiol 1998;27(2):76-8)が指摘し、1999年には菅原ら(感染症学雑誌1999;73(6):593-9)もブロッキングを行わない改良法を発表している。

我々は、BSAによるブロッキングの有無による抗体価の違いを確認するために、BSAおよびO157 LPSに対する抗体価が共に低い血清あるいは共に高い血清を用いて、BSAでブロッキングを行ったウェルと行わなかったウェルで抗O157 IgA抗体を測定した。その結果、BSAおよびO157 LPSに対していずれも低値を示す血清では、BSAブロッキングの有無に関わらず、O157 LPSに対するOD値が高値を示す事はなく(図4a)、また、BSAおよびO157 LPSに対して共に高値を示す血清では、BSAでブロッキングすると若干高値を示したが有意差はなかった(図4b)。これらの結果からは、菅

原らと同様に、BSAでのブロッキングが不要である事、更に、LPSに対するウェルのOD値からBSAのOD値を差し引く必要がない事が分かった。

2) 今回測定した76症例136検体の中には、BSAに対して強く反応する血清が多数あった。そこで、*E. coli* O157が検出された20症例20検体（1症例で複数検体のある場合は原則として抗LPS抗体が最高値を示した検体を用いた）の抗O157 LPS IgG/ IgM/IgA抗体価と抗BSA抗体価の相関を調べた結果、いずれのクラスでも抗BSA抗体と有意に相関している事が判明した（図2a、b、c）。更にこれらの検体では、他の血清型LPSに対しても高い抗体価を示す傾向が認められた。しかし、*E. coli* O26の検出された29症例29検体では、抗O26 LPS IgM抗体価と抗BSA IgM抗体価のみ有意差がみられた（図3a、b、c）。

3) BSA以外の抗原に対する抗体価

今回の症例は散発例であり、原因食は必ずしも特定されていないが、BSAに対する抗体上昇は感染時に摂食した牛肉が原因である可能性がある。そこで、BSAに加え、他の動物のアルブミンに対する抗体価を測定したところ、ウシアルブミン(BSA)の他に、ニワトリアルブミン、ブタアルブミン、ウサギ血清などの種々の抗原に対しても反応がみられた（図5）。

4) 種々の抗原に対する抗体上昇の要因
今回の検討結果、*E. coli* O157感染症では他のO抗原に対する抗体価や牛以外の種々のアルブミン等に対する抗体価も上昇した。しかし*E. coli* O26感染症の場合に抗BSA抗体価上昇はO157感染症ほど顕著ではなかった。このことから、*E. coli* O157感染症ではポリクローナルな抗体産生が惹起されている可能性が示唆された。

LPSはマウスのB細胞をポリクローナル

に活性化する事が知られており、ヒトではマウスほど感受性はないが、高濃度のLPSが同様の活性を示す事が報告されている。*E. coli* O157感染症では感染局所の腸管で高濃度のLPSに暴露され、B細胞がポリクローナルに活性化された可能性が考えられる。今後、ポリクローナルなB細胞活性化についてさらに明確にするため、他の蛋白抗原や腸管フローラに無関係な微生物抗原を用いて抗体価を調べる必要がある。また、腸管感染症の重症化とポリクローナルな抗体産生の関係についても検討を要する研究課題と考えられる。

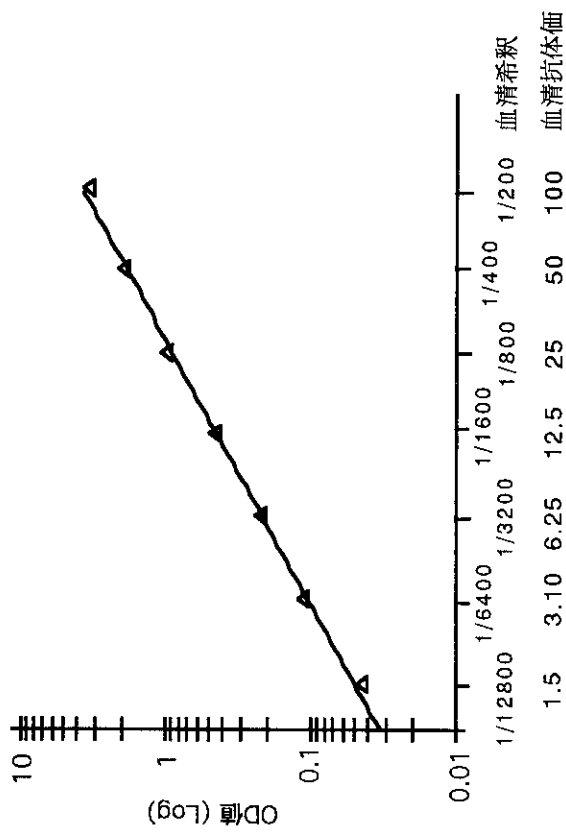


図1 抗LPS抗体測定検量線

O157 LPSに対して高い抗体価を示した患者血清を陽性コントロールとして、実験毎に検量線を作成した。1/200希釈した血清のOD値を100として、患者血清のOD値から抗体価を算出した。

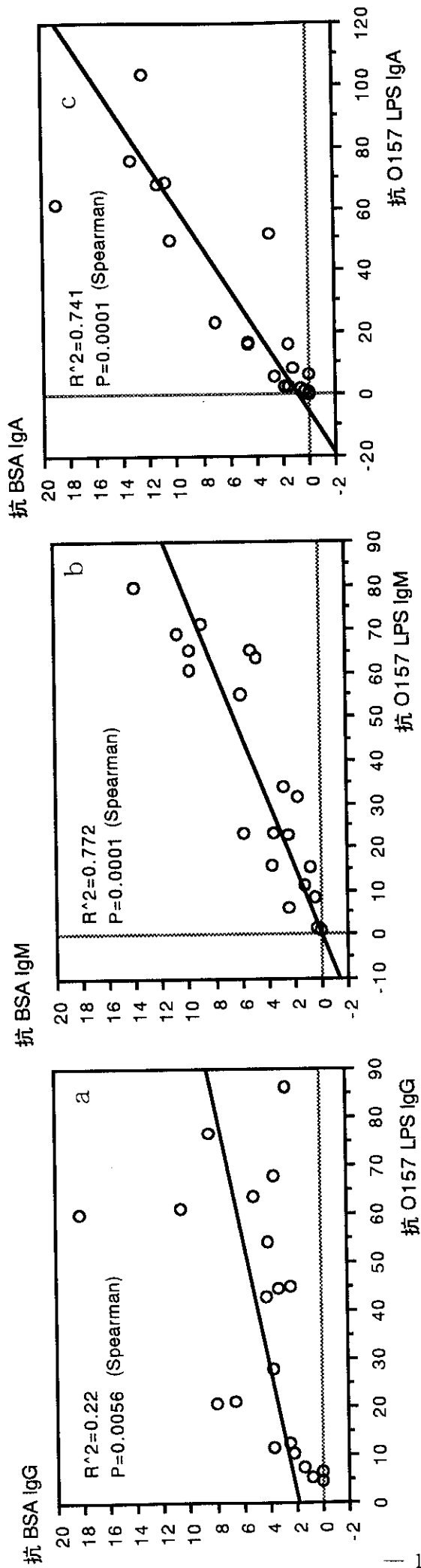


図2 O157 感染患者血清中の抗 O157 LPS 抗体と抗 BSA 抗体の散布図と回帰直線

- a : 抗 O157 LPS IgG vs 抗 BSA IgG
- b : 抗 O157 LPS IgM vs 抗 BSA IgM
- c : 抗 O157 LPS IgA vs 抗 BSA IgA