

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び

診療の標準化に関する研究

(H24-新興-一般-012)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

平成 25 年 (2013 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究班 名簿

区分	研究者名	所属研究機関	職名
研究代表者	大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部	部長
研究分担者	井口 純	宮崎大学 (IR推進機構)	特任助教
研究分担者	八尋錦之助	千葉大学病原分子制御学	特任准教授
研究分担者	伊豫田淳	国立感染症研究所 細菌第一部	主任研究官
研究分担者	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム研究センター	センター長
研究分担者	林 哲也	宮崎大学フロンティア科学実験総合センター	センター長/教授
研究分担者	桑原知巳	香川大学・分子微生物学	教授
研究分担者	綿引正則	富山県衛生研究所	主任研究員
研究分担者	勢戸和子	大阪府公衆衛生研究所	主任研究員
研究分担者	甲斐明美	東京都健康安全研究センター	部長
研究分担者	五十嵐 隆	国立成育医療研究センター	総長
研究分担者	齋藤 昭彦	新潟大学大学院小児科学	教授
研究分担者	伊藤 秀一	国立成育医療研究センター・腎臓・リウマチ・膠原病科学	医長
研究分担者	幡谷 浩史	東京都立小児総合医療センター・腎臓内科	医長
研究分担者	水口 雅	東京大学大学院医学系研究科 発達医科学・小児神経学	教授
研究分担者	森島 恒雄	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・小児科学	教授

研究協力者	大西 健児	東京都立墨東病院感染症科	部長
研究協力者	川村 尚久	大阪労災病院小児科	部長
研究協力者	北山 浩嗣	静岡県立こども病院腎臓科	医長
研究協力者	芦田 明	大阪医科大学小児科	講師
研究協力者	要 伸也	杏林大学医学部第一内科	准教授
研究協力者	種市 尋宙	富山大学医学部小児科	助教
研究協力者	佐古まゆみ	国立成育医療研究センター治験推進室	医員

もくじ

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究
総括報告書

大西 真 国立感染症研究所細菌第一部 1

国内で分離される重症者由来の非典型的な腸管出血性大腸菌に関する研究

伊豫田 淳 国立感染症研究所細菌第一部 8

非典型的 EHEC のプロファイリングに関する研究

甲斐 明美 東京都健康安全研究センター微生物部 15

大腸菌 O 血清群の核酸検出法に関する研究

井口 純 宮崎大学・IR推進機構 20

抗大腸菌抗体検出系の開発に関する研究

勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所 22

non-O157 EHEC のゲノム配列決定

林 哲也 宮崎大学 28

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究
— Stx フェージの多様性についての解析 —

綿引 正則 富山県衛生研究所 35

O111 ゲノム構造解析

黒田 誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 40

Non-O157 STEC の産生する新規毒素 SubAB に関する研究

八尋 錦之助 千葉大学病原細菌制御学 48

幼若無菌 BALBc/A マウスを用いた腸管出血性大腸菌の病原性の評価法
に関する研究

桑原 知己 香川大学医学部 52

溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドラインの作成 五十嵐 隆 国立成育医療研究センター	54
腸管出血性大腸菌感染症の診断と治療 齋藤 昭彦 新潟大学医歯学総合研究科小児科学分野	138
溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドラインの作成 伊藤 秀一 国立成育医療研究センター腎臓・リウマチ・膠原病科	139
HUS の診断・治療に関する研究 幡谷 浩史 東京都立小児総合医療センター腎臓内科	142
腸管出血性大腸菌感染症に併発する脳症に関する研究 水口 雅 京大学大学院医学系研究科・発達医科学	146
HUS 脳症における Risk Factor の検討 森島 恒雄 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学	149
研究成果の刊行に関する一覧表	152

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究
(H24-新興-一般-012)

研究代表者 大西 真 (国立感染症研究所・細菌第一部・部長)

研究要旨.

腸管出血性大腸菌(EHEC)は、経口接種され腸管に到達し、定着・増殖、志賀毒素産生により急性の下痢症を惹起する。激烈な腹痛、血性下痢を伴う出血性腸炎を引き起こすことを特徴とし、溶血性尿毒症症候群、脳症等の重篤な病態を引き起こす。わが国では血清群 O157 EHEC の分離頻度が最大であるが、多様な大腸菌が血清群 O157 EHEC 同様の腸管細胞へ接着する能力、志賀毒素を産生する能力を共有している。時に、非典型的な EHEC (血清型、病原因子型等)による重症化例が存在し、その細菌学的検査診断を困難にし、診療に関しても困難な症例が存在する。本研究班では、内外の最新のエビデンスレベルの高い研究報告に基づき、わが国の医療状況に合致した EHEC 感染症ならびに HUS とその合併症に対する以下の特色を満たすガイドライン(案)を作成した。加えて、EHEC 感染症およびそれに関連する、HUS、脳症に関する研究が実施され、知見が蓄積された。また国内で分離される EHEC の細菌学的基盤情報を集積した。重症化に寄与する新規病原因子の検索、新しい診断ツールの開発、ゲノム情報の取得、メタゲノム解析の応用、動物モデルによる病原性評価系の開発に関する研究を行った。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)の病原性発揮には、腸管細胞付着能と志賀毒素産生能が最低限必要であると考えられている。国内においてEHEC感染症は、血清群O157に属する菌株を原因とする症例が多数を占める。EHEC O157は2つの志賀毒素遺伝子stx1, stx2のいずれか、あるいは両方を有し、細胞接着能力はLEE領域と呼ばれるIII型タンパク質分泌機構に依存していると考えられている。しかしながら、異なる血清型に属する多様なEHECが存在することが知られていることに加え細胞付着に関する病原因子にも多様性があることが知られている。

細胞付着因子の多様性に関しては、血清型O104:H4大腸菌によるドイツを中心とした広域食中毒事例の発生を機に注目を集めている。細胞付着因子および血清群の多様性の視点から、いわゆる「O157」感染症とは異なる非典型的なEHEC感染症に関する基盤情報の蓄積と整理が必要である。

我が国においてEHEC感染症は年間3000-4000例

発生している。重篤な合併症(HUS、脳症)を発症し、さらに死亡例も毎年報告されている。急性脳症発症例では、回復しても重篤な中枢神経障害を残すことが問題である。先に述べたドイツでの事例において多数のHUS患者が発生し、死者も50名を超える事態となった。診断に加えて、治療法の体系的な評価と、提言の必要性が高まった。

本研究の目的は、(1) 診断・治療法に関して最新の情報を基盤に再検討を加えること、(2) 非典型的なEHEC感染症に対応可能な検査系を確立することである。

(1) 「腸管出血性大腸菌感染に伴うHUSの診断・治療のガイドライン」(日本小児腎臓病学会)は、作成から既に15年が経過した。内外の最新のエビデンスレベルの高い研究報告に基づき、わが国の医療状況に合致したEHEC感染症ならびにHUSとその合併症に対する以下の特色を満たすガイドラインを早急に作成する。

(a) 実践的・具体的なものとし、市中病院においても的確な診断/治療可能

- (b) 専門施設への転送基準の明示
- (c) EHEC感染症に由来しないHUS (atypical HUS) の診断や治療について検討
- (d) アジア圏を含む諸外国でも利用可能な診断・治療のガイドラインとして世界に発信

(2) 非典型的EHEC株の基盤情報を収集することを出発点として、情報のとりまとめを行なう。非典型的なEHECの全ゲノム配列を決定し他の大腸菌との比較解析を行い、さらに、非典型EHECが産生する新規毒素・接着因子の機能解析を進める。O血清群の核酸検出による同定補助法、新規病原因子を標的とした検査法、菌株検出法、HUSの病原診断のための検査法の開発を目指す。

H24年度においては、各研究分担者において以下のテーマで研究を実施した。

- ・ 溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドラインの作成 (統括：五十嵐、齋藤、伊藤、幡谷、水口、森島、大西健児、川村、北山、要、種市、佐古) (伊藤)
- ・ 腸管出血性大腸菌感染症の診断と治療 (齋藤)
- ・ HUS 脳症における Risk Factor の検討 (森島)
- ・ HUS の診断・治療に関する研究 (幡谷)
- ・ 腸管出血性大腸菌感染症に併発する脳症に関する研究 (水口)
- ・
- ・ 国内で分離される重症者由来の非典型的な腸管出血性大腸菌に関する研究 (伊豫田)
- ・ 非典型的 EHEC のプロファイリングに関する研究 (甲斐)
- ・ 抗大腸菌抗体検出系の開発に関する研究 (勢戸)
- ・ 大腸菌 O 血清群の核酸検出法に関する研究 (井口)
- ・ non-O157 EHEC のゲノム配列決定 (林)
- ・ O111 ゲノム構造解析 (黒田)
- ・ Stx フェージの多様性についての解析 (綿引)
- ・ 幼若無菌 BALBc/A マウスを用いた腸管出血性大腸菌の病原性の評価法に関する研究 (桑原)
- ・ Non-O157 STEC の産生する新規毒素 SubAB に関する研究 (八尋)

これらの詳細は分担研究報告書に記載しているが、ここでは、それらの概要と相互の関連性についてまとめる。さらに、研究代表として取得したデータのとりまとめと (研究協力：石原朋子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官) 併せて報告する。

B. 研究方法

菌株は地方衛生研究所から国立感染症研究所へ分与された腸管出血性大腸菌、健常者検便から分離された志賀毒素産生菌を用いた。解析の詳細については、伊豫田分担報告書を参照。倫理面への配慮 は各報告書に記載した

C. 研究結果

腸管出血性大腸菌の多様性解析 -無症状保菌者由来株の解析-

調理従事者らの業態者検便において分離された腸管出血性大腸菌 400 株 (2010.4 月～2012.3 月) を分与いただき、血清群別、stx 遺伝子型別、*eeae*, *saa*, *subA*, *aggR* 遺伝子の有無を検討した。

400 株中 46 株は O 血清群別不能であったが、354 株から 68 種類の O 群が見いだされ、そのうち 45 血清群は複数株存在した (表 1)。

伊豫田分担報告ならびに甲斐分担報告においてそれぞれ有症者分離株を含む EHEC の分離状況に関して報告がなされた。感染研集計あるいは東京都健康安全研究センター集計のいずれかで把握されている O 血清群 21 種のうち 18 種は業態者検便でも分離されていることが明らかとなった。しかしながら、その分離比率に関しては差が認められた (表 1)。

業態者検便由来 400 株の EHEC の志賀毒素遺伝子型は、202 株が *stx1* 遺伝子単独保有株、160 株が *stx2* 遺伝子単独保有株、38 株が両遺伝子保有株であった (表 2)。O157 をはじめとする臨床由来 EHEC 株の分離頻度の高い血清群に属する菌株は LEE 領域にコードされる接着因子を保有しているが (伊豫田分担報告書)、業態者検便由来 400 株のうち 55 株 (13.8%) が LEE 保有株であった。血清群としては () 内は菌株数、O103 (21), O157 (13), O26 (6), O156 (4), Untypeable (3), O145 (2), O18 (1), O76 (1), O121 (1), O153 (1), O177 (1), O187 (1) であった。このうち、*stx2* を保有し、かつ LEE 陽性株は O157 (12), O121 (1), O145 (1), O153 (1), untypeable (1) の 16 株存在した。

他の接着因子である *saa* 遺伝子陽性あるいは Eib 陽性株は、それぞれ 125 株 (31.3%), 103 株 (25.8%) であった。ドイツでの集団事例株の保持する接着因子関連遺伝子 *aggR* 陽性株は存在しなかった。*eeae*, *saa*, *aggR*, Eib いずれも陰性であった株は 117 株 (29.3%) 存在した。Non-O157 型の腸管出血性大腸菌が産生する SubAB の業態者検便由来株は 110 株 (27.5%) であった。

業態者検便において O 血清群として非典型的な志賀毒素産生大腸菌が多数分離され、また病原因子プロファイル的にも典型的ではない。しかしながら、重症化 (出血性下痢、HUS を伴う) 症例の中には、非典型的な EHEC によるものが存在するとの解析結果が得られている (伊豫田 分担報

告)。特に、SubAB 産生株の重症化例として、甲斐らにより示され（甲斐 分担報告）、海外でも重症化例の報告がなされている。また、八尋らによる分担研究では、マクロファージにおいて、SubAB が LPS 誘導性の NO の誘導を NF- κ B の活性化を阻害することで抑制し、菌の増殖亢進に寄与していることを示しており、無症状保菌者由来株および重症化症例由来株との比較が必要である。SubAB は非典型的な腸管出血性大腸菌による重症化事例の原因となる可能性があるため、検出系の整備を検討する必要がある。

今年度桑原らによって、幼若無菌 BALBc/A マウスへの経口感染による非典型的腸管出血性大腸菌の病原性の比較方法が検討された（桑原 分担報告）。本モデルの利用法ならびに炎症感受性の高いマウスモデルによる検討の必要性が考えられた。

感染研集計、東京都の集計、さらには調理従事者の業態者検便由来株においても、非典型的な O 血清群に属する EHEC に LEE 領域陽性株が存在することが示された。LEE 領域がコードする III 型分泌装置をターゲットにした菌株濃縮のためのツールの開発は、より効率的な EHEC 分離の可能性はある。そのために、III 型分泌装置に特異的抗体の作成を進めた。

非典型的な血清群に属する大腸菌の検出系開発に関する研究

2011 年のドイツの 0104 集団事例のように非典型的な O 血清群による大規模事例が発生した際には、現状の検査体制では対応が困難な可能性がある。現実として、2011 年当時 0104 に対する抗血清は国内において限られた施設にしか存在しなかった。

そこで、血清を用いた手法を補助する形の核酸検出を用いた系の開発を試みた。井口による分担研究によって、これまでに塩基配列情報が発表されていない 98 種類の大腸菌 O 血清群の O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列が決定された。既知配列情報を含む全 184 種類の大腸菌 O 抗原合成遺伝子領域塩基配列情報をもとに比較解析を行い、147 種類の個別判定用プライマーセットおよび 15 種類のグループ判定用プライマーセット（35 種類の大腸菌 O 血清群を含む）を設計された。それぞれのプライマーセットについて全 184 種類の大腸菌 O 血清群標準株精製 DNA を用いて特異的増幅、マルチプレックス PCR 法をデザインし、その特異的増幅も確認されている。

EHEC 感染症における HUS 発症時には患者血清中の抗大腸菌抗体価を測定することで、菌株が分離されない場合、あるいは分離株の血清型別不能な場合でも、原因となった EHEC を推定することが

可能である。しかし、市販の検査試薬は 0157 抗体測定だけ可能であるため、勢戸らは HUS 症例および HUS 未発症症例における 0157、026 および 0111 に対する血清抗体価を in house で実施可能な試験管法で測定し、その有効性を示した。市販の 0157 抗体測定法は、試験管法に比べて感度が低い可能性が示された。

感染研においては、依頼があった場合には HUS 症例に対してのみ、0157、026、0111、0145、0121、0103、0165 に対する抗体価を測定している。いずれの抗体価も陰性となる症例が約 30%存在する。勢戸らの報告においても HUS 発症 92 例のうち抗体価陰性の症例 19 例（約 30%）が存在する。EHEC 以外の原因、血清分離の時期等によって、陽性結果が得られていない可能性があるが、他の血清型に対する抗体価の検証する必要がある。

non-0157 EHEC のゲノム配列決定

EHEC には 0157 以外にも様々な血清型を有する菌株（non-0157 EHEC）が存在するが、基礎的研究や分子疫学解析など、幅広い研究を推進するために必要な全ゲノム情報の整備は遅れている。林らの分担研究によって、3 種類の non-0157 EHEC（0121:H19、0145:HUT、0165:H-）のゲノム解析を進められ、3 株の完全配列の取得がほぼ終了したといえる段階に到達している。（詳細は林 分担報告）また、最近 Shiga toxin (Stx) 産生株が存在することが明らかになった *Escherichia albertii* についても 4 株の全ゲノム配列を取得することに成功し、ゲノム構造等の詳細が明らかにされた。また、世界初の *E. albertii* による集団感染事例を同定し、本菌がヒトにおいて集団感染を起こしうる腸管病原体であることを明確に示した。（詳細は林 分担報告）

また、黒田らによって富山県を中心に発生した 2011 年に発生した多数の重症化例を含む EHEC 0111/0157 による集団事例の HUS 患者由来分離株の完全長ゲノム配列決定が進められた。现阶段で、gap 箇所は stx2 フェージを除く λ フェージおよび、パラログ遺伝子を含む約 20 箇所である。stx2 フェージおよびその近傍の配列決定の結果、他の Stx2 フェージとの比較解析結果が示された。また、メタゲノム解析手法を用いて本事例患者 5 名とコントロール群の糞便メタゲノム解析が行なわれた。0111 と 0157 の患者糞便中の存在比率を定量的に解析したところ、0157 よりも 0111 が圧倒的に多く、主に 0111 による食中毒事例であることがメタゲノム解析からも示された。（詳細は黒田 分担報告）

綿引らは、上記腸管出血性大腸菌 0111/0157 の集団食中毒事例における糞便検体および分離株から Stx2 フェージを複数分離し、その構造を明

らかにした。その結果、ファージ間の構造は極めて類似していることが明らかになった。本事例の特徴である原因菌が分離されなかった患者群の存在と不安定なプロファージ現象との関連性についてさらに検討が必要である。

溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドラインの作成

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染や溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診療・研究に造詣の深い日本小児腎臓病学会、日本腎臓病学会、日本小児神経学会、日本小児感染症学会、日本感染症学会などの学会に所属する臨床家・研究者と臨床治験の専門家など 14 名から構成される研究班を組織し、エビデンスに基づく診療ガイドラインとして必要な条件を満たした HUS 診断・治療ガイドライン (案) をわが国で初めて作成した。HUS 診断・治療ガイドライン (案) は、五十嵐らによる分担研究報告の資料 3 として報告書に記載した。

幡谷らによって、HUS の下痢の程度や炎症の強さ、血管内容量などさまざまな要因を反映する基本的な検査項目である血清アルブミン値の測定に関して検討を行った。血清アルブミン値を評価・症例間で比較する時には、測定法による差を念頭に置き、測定法を確認する必要があることを示した。また、森島らによって HUS 脳症における Risk Factor の検討がなされた。症例数が少ないために断定的ではないが、HUS のみの症例と比較して、急性期の白血球増多、血小板数の低下、HUS 発症までの日時が早いこと、また期間中の最高値として、CK/AST/ALT などの高値が HUS 脳症群で認められた。水口らは、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症に併発する脳症の臨床経過、頭部画像所見について研究した。富山県下 0111 集団感染事例での脳症症例 21 例を対象に検討を行った。脳症の発症が HUS 発症から 2 日以内であること、神経症状が意識障害とけいれんであること、頭部画像所見として両側対称性深部灰白質病変を有することなど、症例の多くに共通した特徴が見られた。また本事例では予後とステロイド治療に相関があり、同治療法の有効性が示唆された。

D. 考察

業態者検便由来 EHEC の性状解析から、多様な大腸菌が志賀毒素遺伝子を保有していることが示された。大多数の臨床分離 EHEC が持つ細胞接着因子を保有しない株が多数存在した。これらの EHEC が出血性腸炎の原因となる可能性は低いと考えられるが、さらなる検討が必要である。特に EHEC の病原性の評価法の検討が必須であり、比較ゲノム学的解析、動物モデルの改善等を進める。調理従事者らの業態者検便由来志賀毒素産生

大腸菌の病原因子のプロファイリングからは、出血性腸炎を伴う重症化例から分離される菌株と同等と考えられる菌株も多数存在した。調理従事者等を原因とする事例発生のリスクが存在する。検便等のモニタリング、陽性者に対する適切な指導、衛生的な調理工程の指導等が必要となる。

業態者検便由来志賀毒素産生大腸菌は、志賀毒素遺伝子の有無の PCR 法によるスクリーニングを行なうことで分離してきた。下痢症における核酸増幅検査法の積極的な利用により、特に軽症の下痢症における原因診断率が高まる可能性がある。臨床の現場における急性下痢疾患の検査診断・治療の実際を吟味し、必要な検査体制について検証する必要がある。

伊豫田らにより、重症者由来株 (n=40) について *eae* 陰性の非典型的な EHEC (LEE-negative EHEC) 存在が示された。他の既知の接着因子や、SubAB 毒素の保持率が示されたが、重症化に対する影響は未解明な部分が多く残されている。また、未知の細菌側の重症化因子の同定につながる可能性がある。

非典型的な EHEC の情報基盤の構築が進められた。重症化例において、原因診断に至っていない症例がどの程度あるのか未知な部分がある。特に臨床現場で利用しやすい検査ツールの開発が望まれる。HUS 診断・治療ガイドライン (案) の作成のために、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染や溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診療・研究に造詣の深い日本小児腎臓病学会、日本腎臓病学会、日本小児神経学会、日本小児感染症学会、日本感染症学会などの学会に所属する臨床家・研究者と臨床治験の専門家など 14 名がこの研究班に参加している。HUS サーベイランスの実施可能性や、そのために必要なツール、軽症型の EHEC 感染症の実態把握につなげる活動を検討する。

E. 結論

エビデンスに基づく診療ガイドラインとして必要な条件を満たした HUS 診断・治療ガイドライン (案) をわが国で初めて作成された。今後、本案を日本小児科学会、日本小児腎臓病学会、日本腎臓学会などの会員に公表し、会員からの意見を収集する。その後、各学会の承認を得た後、それぞれの学会 home page 等に公表することを検討する。

血清型別や病原因子プロファイルから多様な EHEC が存在することが確認され、無症状保菌者から分離される EHEC を含めた情報の基盤が形成されつつある。現場で役に立つ検査ツールの開発につなげる必要がある。

ゲノム情報の基盤形成、メタゲノム解析の応用、病原性評価系を進めた。ゲノムデータを蓄積し、

メタゲノム解析の評価、動物モデルの検証をさらに進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M, on behalf of the EHEC Study Group. Molecular characterization reveals three distinct clonal groups among clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serogroup O103. *J. Clin. Microbiol.* 50: 2894-2900, 2012.
- 2) 大西 真. 腸管出血性大腸菌 O104 による大規模集団食中毒事例. *J Vet Med.* 65:364-368, 2012
- 3) 大西 真、伊豫田淳. 腸管出血性大腸菌の多様性 *感染炎症免疫* 42: 2-11, 2012
- 4) 大西 真: 腸管感染症の細菌の動向と疫学 *臨床と微生物* 40: 99-104, 2013

2. 学会発表

- 1) Y. Ogura, T. Mako, T. Ooka, M. Ohnishi, T. Hayashi: Comparative genomics of Stx2 prophages in O157:H7. (VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.)
- 2) 小椋義俊, Md. Rakibul Islam, 真子俊博, 大岡唯祐, 大西真, 林哲也: O157 Stx2 phage の包括的ゲノム比較・機能解析により明らかとなった Stx2 高産生型 phagen の存在 (第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, H24. 7 月)
- 3) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、大西真: 大腸菌 O174-0-187 の O 抗原合成遺伝子群の構造解析と PCR 検出法 (第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, H24. 7 月)
- 4) 井口純、伊豫田淳、秋吉充子、大西真: 大腸菌の O 抗原合成遺伝子領域の網羅的解析と菌株分類法への利用の検討 (第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012. 10 月)
- 5) 秋吉充子、井口純、伊豫田淳、大西真: 大腸菌の O 抗原合成遺伝子を標的とした PCR 法と LAMP 法の開発 (第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012. 10 月)

- 6) 大西 真: HUS 症例における腸管出血性大腸菌の血清診断 (第 44 回日本小児感染症学会総会、H24 11 月)
- 7) 大西 真: 腸管出血性大腸菌感染症をめぐる最近の話題 (第 47 回 緑膿菌感染症研究会, H24. 2 月)
- 8) 井口純、伊豫田淳、大西真: 大腸菌 O 抗原合成遺伝子の網羅的解析と感染症対策に向けた利用 (第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013. 3 月)
- 9) 伊豫田淳、石原朋子、勢戸和子、泉谷秀昌、小西典子、甲斐明美、中嶋洋、木全恵子、磯部順子、大西真: 重症者由来 LEE 非保有型 EHEC の病原性因子の解析 (第 86 回 日本細菌学会総会、H25 3 月)
- 10) 井口純、伊豫田淳、大西真: 大腸菌 O 血清群を判定するマルチプレックス PCR 法の開発 (第 86 回 日本細菌学会総会、H25 3 月)
- 11) 小椋義俊, 大西真, 林哲也: 高解像度系統解析による腸管出血性大腸菌 O157 の Stx2 高産生性系統の同定. (第 86 回 日本細菌学会総会、H25 3 月)
- 12) 関塚剛史、綿引正則、磯部順子、大西真、竹内史比古、佐多徹太郎、黒田誠: 糞便メタゲノム解析による大腸菌ポピュレーション解析 (第 86 回 日本細菌学会総会、H25 3 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

O type	業態者検便		感染研集計	東京都集計
	株数	分離率	分離率	分離率
91	88	22.00%	1.10%	0.68%
103	22	5.50%	2.01%	2.32%
8	15	3.75%	0.11%	
113	15	3.75%	0.08%	
128	15	3.75%	0.10%	0.20%
110	13			
157	13	3.25%	69.32%	75.36%
146	10	2.50%	0.16%	0.20%
174	9	2.25%	0.07%	
100	8			
181	8			
55	7	1.75%		0.14%
76	7			
26	8	1.50%	15.50%	11.74%
74	6	1.50%		0.07%
112	5			
115	5	1.25%	0.10%	0.14%
183	5	1.25%	0.21%	0.07%
18	4			
79	4			
93	4			
156	4			
163	4			
172	4			
186	4			

O type	業態者検便		感染研集計	東京都集計
	株数	分離率	分離率	分離率
23	3			
78	3			
141	3			
159	3			
166	3			
168	3			
6	2			
25	2			
28	2			
87	2			
101	2			
109	2			
119	2	0.50%	0.10%	0.07%
124	2			
130	2			
137	2			
145	2	0.50%	1.84%	1.84%
150	2			
153	2			
178	2			
2	1			
5	1	0.25%	0.17%	
15	1			
20	1			
36	1			

O type	業態者検便		感染研集計	東京都集計
	株数	分離率	分離率	分離率
39	1			
53	1			
57	1			
64	1			
65	1			
75	1			
77	1			
82	1			
96	1			
108	1			
117	1			
121	1	0.25%	1.72%	1.02%
136	1			
175	1			
177	1	0.25%	0.06%	
179	1			
185	1			
187	1			
UT	46			
O111	0		3.33%	4.23%
O165	0		0.38%	0.75%
O63	0			0.07%

表1 調理従事者等の検便で分離されたEHEC (n=400) の血清型別

感染研集計: 伊豫田分担報告書より 2007-2011, n=14376

東京都集計: 甲斐分担報告書より 2008-2012, n=1465

黒塗りのカラムは、感染研集計、東京都集計の分離率に比して健康保菌者での分離率が低い血清群を示した。

stx1 単独保有株

O type	no.	<i>ese</i>	<i>saa</i>	E1b	-	<i>subA</i>
91	83		6	76	1	9
103	22	21			1	
55	7		1		6	
76	7	1	5		1	6
26	6	6				
115	5				5	
128	4		1	2	1	3
183	4		2		2	
156	4	4				
18	3	1		2		1
93	3		1		2	
146	2		2			2
181	2		1		1	1
79	2			2		
163	2				2	
186	2		2			1
78	2		2			2
109	2		1		1	
119	2		2			
150	2		2			2
8	1		1			
157	1	1				
172	1		1			
6	1				1	
87	1				1	
137	1		1			
145	1	1				
153	1			1		
178	1		1			1
36	1		1			1
65	1		1			
77	1				1	
82	1		1			
108	1		1			
117	1				1	
136	1				1	
177	1	1				
187	1	1				

stx2 単独保有株

O type	no.	<i>ese</i>	<i>saa</i>	E1b	-	<i>subA</i>
8	14		1		13	1
113	13		8		5	8
110	13				13	
157	8	8				
174	8				8	
100	8		1		7	
181	6		6			6
74	6		6			6
112	5		1	2	2	1
146	4		2	1	1	3
128	3			3		
172	3		3			
23	3		3			1
159	3				3	
166	3		2		1	2
168	3				3	
141	2		2			2
79	2		1		1	1
163	2		1		1	1
25	2				2	
28	2		2			2
101	2				2	
124	2				2	
130	2		2			2
18	1				1	
93	1		1			1
6	1		1			1
87	1				1	
153	1	1				
178	1		1			1
2	1				1	
15	1				1	
20	1				1	
39	1		1			1
53	1				1	
57	1				1	
64	1		1			1
121	1	1				
175	1				1	
179	1		1			1
185	1				1	

stx1 + *stx2* 保有株

O type	no.	<i>ese</i>	<i>saa</i>	E1b	-	<i>subA</i>
128	8		7		1	8
91	5		5			5
146	4		4			4
157	4	4				
186	2		2			2
113	2		2			2
183	1		1			1
78	1		1			1
137	1		1			1
145	1	1				
174	1		1			1
141	1		1			1
5	1			1		1
75	1		1			1
96	1		1			1

表2 調理従事者等の検便で分離されたEHEC (n=400) の血清型と保有病原因子

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究
(H24-新興-一般-O12)

平成 24 年度 分担研究報告書

分担研究課題名：「国内で分離される重症者由来の非典型的な腸管出血性大腸菌に関する研究」

研究分担者：伊豫田 淳（国立感染症研究所・細菌第一部）

研究協力者：石原 朋子（国立感染症研究所・細菌第一部），
泉谷 秀昌（国立感染症研究所・細菌第一部），
中嶋 洋（岡山県環境保健センター）

研究要旨

日本国内で 2007 年から 2011 年にまでに重症者（血便または溶血性尿毒症症候群発症者）から分離され、感染研・細菌第一部に送付された腸管出血性大腸菌（EHEC）のうち、分離頻度の高い（分離数が 10 以上の）O 血清群は順に O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165 となっている。これら 7 つの O 血清群に属する EHEC が共通に保有する病原性遺伝子は志賀毒素遺伝子に加え、接着因子である Intimin をコードする *eae* 遺伝子である。本研究では、一昨年にドイツで発生した非典型的な EHEC O104:H4 の集団発生事例を受け、日本国内における非典型的な EHEC の分離状況およびそれらが保有する病原性遺伝子の分布状況について解析した。2007 年から 2011 年までに国内で分離された上記の 7 血清群以外の O 血清群で重症者由来株（n=40）について *eae* の分布状況を解析したところ、約 17%（17 株）が *eae* 陰性の非典型的な EHEC（LEE-negative EHEC）であることが判明した。これら 17 株の LEE-negative EHEC のうち、13 株（約 76%）は接着因子として Saa を保有し、Eib を保有するものは 1 株、上記のドイツ株と同様な Agg を保有する株は存在しなかった。LEE-negative EHEC に特異的に見出される志賀毒素以外のベロ細胞毒素である Sub は 9 株（約 52%）に存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）による日本国内における感染者は無症状保菌者を含めて年間 3,000 名から 4,000 名を数え、このうち重症者（血便または[および]溶血性尿毒症症候群

[hemolytic uremic syndrome: HUS] 発症者と定義する）は全体の約 30-35%を占める（国立感染症研究所・細菌第一部の集計）。2007 年から 2011 年までのこれらの重症者由来株は分離頻度の多い順に血清群 O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165 となっている。

これら 7 つの O 血清群に属する EHEC は病原性遺伝子として志賀毒素遺伝子 (*stx1* と *stx2* のいずれか一方または両者) と接着因子である Intimin をコードする *eae* 遺伝子を共通に保有することが我々の研究から明らかとなっている。一昨年にドイツで発生した集団発生の原因菌は血清型 O104:H4 の EHEC であった。この菌株は *eae* 非保有性の EHEC (以下、*eae* がコードされている遺伝子領域 [locus of enterocyte effacement: LEE]-非保有型 EHEC: LEE-negative EHEC と表記する) であり、他の下痢原性大腸菌のカテゴリーである腸管凝集性大腸菌(enteroaggregative *E. coli*: EAggEC)が保有する病原性遺伝子群 (*agg*) を保有することから、EAggEC と EHEC のハイブリッド型 (EAggHEC) であることが明らかとなっている。そこで本研究では、日本国内において、EAggHEC を含む他の下痢原性大腸菌カテゴリーと EHEC のハイブリッド型、あるいはその他の LEE-negative EHEC の重症者由来株における分布状況、およびそれらの非典型株が保有する接着因子等の病原性因子の分布状況について解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) 血清型別

デンカ生研またはデンマーク血清学研究所から購入した抗大腸菌 O 血清 (O1-O187: 欠番として O31, O47, O67, O72, O94, O122 があり、O18, O28, および O112 はいずれも因子血清 ab または ac にさらに分類されるため、合計 184 種類存在する) および H 血清 (H1-H56: 欠番として H13, H22, H50 がある

ため合計 53 種類存在する) を用いて日本国内で分離されたヒト由来の EHEC の血清型別 (O:H 型別) を定法に従って行った。

2) PCR

stx1 および *stx2* の PCR には Cebula らのプライマーセット (*J Clin Microbiol.* 1995 33: 248-250) または Scheutz らのセット (*J. Clin. Microbiol.* 2012, 50: 2951-2963) を使い、*saa* は Paton らのセット (*J Clin Microbiol.* 2002, 40: 271-274) を用いた。その他のプライマー (*eae*, *aggR* および *sub*) については未発表 (伊藤ら、未発表; 泉谷ら、未発表) のため、詳細はここでは省略する。Taq DNA polymerase は TaKaRa の Ex-Taq を使用し、サーマルサイクラーは、ABI 9700 (Perkin Elmer), T1 Thermo cyclor (Biometra), DNA Engine (Bio-Rad), または T100 Thermal Cyclor (Bio-Rad) を使用した。

3) Eib 保有状況の解析

LEE-negative EHEC に特異的に見出される接着遺伝子 *eib* は PCR 検出系が確立されていないため、Eib 蛋白質 (*E. coli* immunoglobulin-binding protein) の特性であるイムノグロブリン結合 (ヒト IgG [Fc の部分] への結合) 活性をヒト IgG (Fc)-HRP を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

4) 細胞接着性の解析

HEp-2 を用いて大腸菌の培養細胞への接着性を定法に従って解析した。

C. 研究結果

1) 血清型別

2007 年から 2011 年までに分離された重症者由来の EHEC 株は分離頻度の高い順に

O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165 となっている。これらの血清群のヒト由来の EHEC は病原性遺伝子として *eae* を保有することが判明している (伊豫田ら、未発表)。日本国内における重症者由来の非典型的な EHEC (LEE-negative EHEC) を同定するために、上記の 7 血清群以外の O 血清群に属する重症者由来の EHEC を抽出した。その結果、疫学的に関連性のない 40 株が存在することが明らかとなった。それらのうち、最も多い血清型が O5:H-と O177:H-でそれぞれ 4 株、OUT (O-untypable) となった株は 9 株であった (図 1)。

2) LEE-negative EHEC の検出

1)で明らかとなった 40 株のうち *eae* の保有状況を PCR で解析したところ、LEE-negative EHEC は 17 株であった (約 42%)。上記の血清群 O5 と O177 は O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165 と同様、すべて LEE 陽性株であった。一方、O91, O183 (血清型としてはすべて O183:H18) , O146, O8, O115, O128, O113, O174 はいずれも LEE-negative EHEC であり、O119 は H 型によって LEE-positive と LEE-negative EHEC に分類されることが明らかとなった (図 1)。

3) *saa*, *Eib*, *subA* の分布状況の解析

2)で明らかとなった 17 株のうち、13 株は *saa* 保有株 (約 76%)、1 株は *Eib* 発現株であった。*Eib* 発現株の O 血清群は O91 であった。*eae*, *saa*, *Eib* いずれの接着因子 (遺伝子) も持たない EHEC 株は 3 株で、O 血清群は 2 株が O115 で、1 株が OUT であった。なお、ドイツ集団発生株で見られたハイブッドタイプ (EA_gHEC) は存在しなかった (図 2)。

4) 培養細胞への接着形態の解析

これまでの解析から、LEE を保有する EHEC 株は局所接着性、*Saa* を保有する株は分散型接着性、*Eib* を保有する株は鎖状接着性を示すことがそれぞれ判明している。これらの接着パターンと保有する接着因子の分布は分散型接着性以外では相関があると考えられている。上記 3)の解析から、これらの接着因子をいずれも保有しない 3 株の培養細胞 (HEp-2) への接着性を解析した。通常の培養条件 (LB 培地で越夜振とう培養した条件) では、これら 3 株のうち O115 の 2 株は培養細胞へ分散型で接着することが明らかとなったが、OUT の 1 株は接着性を示さなかった。以上の結果から、少なくとも O115 に属する 2 株は未同定の接着因子を保有する可能性が示唆された。

5) Sub の分布状況

Stx 以外のベロ細胞毒素として *Saa* を保有する EHEC 株に存在することが見出された Sub (Subtilase toxin) は、国内での分布状況についてはこれまで不明な点が多かった。上記の LEE-negative EHEC 株での分布解析を行ったところ、17 株中 9 株に存在することが明らかとなった。上述した様に、*Saa*, *Eib* および Sub はいずれもこれまで調べた限り、LEE-negative EHEC にのみ存在することが明らかとなっている。

D. 考察

本研究から、日本国内における重症者に由来する LEE-negative EHEC の分布が明らかとなった。上述した通り、国内で分離頻度の高い 7 血清群のほとんどすべては接着遺伝

子群として LEE を保有する。従って、日本国内で分離される大部分の重症者由来株は LEE を保有する株であるといえる。一方で、LEE-negative EHEC による重症例は 2007-2011 年の間に少なくとも 17 例存在し、その多く（約 76%）は接着遺伝子として *saa* を保有することが明らかとなった。*saa* はオーストラリアで発生した HUS 発症者数名から分離された接着因子であり、LEE-negative EHEC に特異的に存在することが明らかとなっている。本研究から、日本国内の分離株にも広く存在することが明らかとなったことから、LEE-negative EHEC の重要なマーカーの 1 つであると考えられる。Stx 以外のペロ毒素をコードする *sub* は 17 株中 9 株に存在することが明らかとなった。今後、これらの病原性遺伝子の重症者以外の症状または無症状由来の EHEC における分布状況を解析することで、重症化への貢献度を解析する必要がある。

日本国内において 1996 年から 2006 年までに死亡例または HUS 患者から分離された EHEC 株はこれまでに、1999 年に鹿児島県の散発死亡例から分離された O86:H-（2011 年のドイツ集団発生由来株と同様に EA_{agg}HEC のハイブリッド型）と、2003 年に富山県の散発 HUS 事例から分離された O170:H16 だけである。本研究から明らかとなった LEE-negative EHEC 株はいずれも血便由来株で HUS 由来株ではない。一方、2012 年以降に分離された株については現在解析中であるが、岡山県で散発 HUS 患者から分離された血清型 O174:H18 は *stx2*, *saa*, *subA* 保有型の LEE-negative EHEC 株であることが明らか

かとなっている。

現時点ではマイナーな菌株であってもそれらが保有する病原性遺伝子について詳細に解析しておくことは、将来を見据えた EHEC の感染症対策に重要であると考えられる。

E. 結論

- 2007 年から 2011 年までに重症者（血便または HUS 発症者）由来株は分離頻度の多い順に血清群 O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165 となっており、これら以外の O 血清群に属する重症者由来株は 40 株存在した。
- 血清群 O5 と O177 は O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165 と同様、すべて LEE 陽性株であった。一方、O91, O183（血清型としてはすべて O183:H18）, O146, O8, O115, O128, O113, O174 はいずれも LEE-negative EHEC であり、O119 は H 型によって LEE-positive と LEE-negative に分類されることが明らかとなった
- 上記の 40 株のうち、17 株が LEE-negative EHEC であることが判明した。
- 17 株の LEE-negative EHEC のうち、13 株（約 76%）は接着因子として *Saa* を保有し、*Eib* を保有するものは 1 株、上記のドイツ株と同様な *Agg* を保有する株は存在しなかった。
- LEE-negative EHEC に特異的に見出される志賀毒素以外のペロ細胞毒素である *Sub* は 9 株（約 52%）に存在することが明らかとなった。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

- ・ Lee K, French NP, Jones G, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Kobayashi H, Sugita-Konishi Y, Tsubone H, Kumagai S; Variation in stress resistance patterns among *stx* genotypes and genetic lineages of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol.* 2012. 78: 3361-3368.

EHEC from human in 2007-2011 (*n* = 14,376)

O group	Total number	BD or HUS
O157	9966	4035
O26	2228	380
O111	479	84
O103	289	40
O121	247	91
O145	265	73
O91	158	3
O165	56	29
O183	30	1
O5	25	4

BD: bloody diarrhea

O group	Total number	BD or HUS
O146	23	0
O8	16	0
O115	15	2
O119	14	3
O128	14	0
O113	12	0
O174	10	0
O177	8	4

LEE-positive

LEE-negative

Identification and Characterization of LEE-negative EHEC
(2007-2011)

EHEC human isolates neither -O157, -O26, -O111, -O121, -O103, -O145, nor -O165 (all LEE-positive).

- BD- and/or HUS-derived: 40 strains in 2007-2011 (except O91)

LEE-negative (*eae*-) : 17 strains (no EAggEHEC)

saa+ : 14 / 17 (82.4%)

Eib+ : 1 / 17 (5.9%)

sub+ : 9 / 17 (52.9%)

eae -, *saa* -, *Eib*-: 2 strains (both O115)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

非典型的 EHEC のプロファイリングに関する研究

研究分担者	甲斐 明美	(東京都健康安全研究センター・微生物部)
研究協力者	小西 典子	(東京都健康安全研究センター・微生物部)
	石塚 理恵	(東京都健康安全研究センター・微生物部)
	齊木 大	(東京都健康安全研究センター・微生物部)
	尾畑 浩魅	(東京都健康安全研究センター・微生物部)
	仲真 晶子	(東京都健康安全研究センター・微生物部)

研究要旨：

主要 3 血清型以外の EHEC に関する基礎データを把握することを目的として、東京都で分離された non-0157 EHEC を対象に分離状況および接着因子等の病原因子保有状況を調べた。

2008 年から 2012 年に東京都内で分離された EHEC のうち 0157, 026, 0111 以外の血清群菌は、127 株(8.7%)であり、13 種類の血清群および OUT に型別された。

付着因子等の病原遺伝子保有状況について調べた結果、*eae* 保有株 95 株中 49 株(51.6%)は有症者からの分離であり、血清群 0103, 0145, 0121, 0165 の全ての株が保有していたが、これ以外では 055, 063 の各 1 株のみであった。

saa 陽性株は 7 株(21.9%)で、陽性株の血清群は 0146 (2 株), 074, 091, 0119, 0183, OUT (各 1 株)であった。*saa* 保有株 7 株では有症者由来は 2 株(28.6%), 無症状者由来は 3 株(42.9%), 不明 2 株(28.6%)で、臨床症状との関連性を明らかにすることはできなかった。

subA 陽性の 11 株中 1 株(0183)は HUS 発症者からの分離であった。*subA* は重症化因子の 1 つである可能性が考えられるが、今後、詳細な検討が必要である。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) による食中毒・感染症患者は、毎年 3,000~4,000 例報告されており、依然として減少傾向にはない。このうち血清群 0157, 026, 0111 による事例が約 90%を占めるが、それ以外の non-0157 EHEC による感染例も発生している。また、3 血清型以外の血清型による HUS 症例や脳症などの重症例も報告されている。2011 年にはドイツを中心としたヨーロッパで 0104:H4 (VT2 産生)による大規模集団食中毒が発生した。この原因株は EHEC と EAggEC のハイブリッド型であり、重症患者も多数報告されている。今後、日本でもこのようなマイナーな血清群菌による集団食中毒・下痢症が発生する可能性も否定できない。

そこで今回、主要 3 血清型以外の EHEC に関する基礎データを把握することを目的として、東京都で分離された non-0157 EHEC を対象に分離状況をまとめた。併せてこれらの菌株について、接着因子等の病原因子の検索を行なった。

B. 研究方法

1) 供試菌株

2008 年から 2012 年の 5 年間に東京都内で分離された EHEC 1,465 株のうち、血清群 0157, 026, 0111 以外の血清群菌 127 株を対象とした。

2) 病原因子保有状況

既知の付着因子あるいは病原因子である *eae*, *saa*, *hlyA*, *aggR*, 新しい毒素として