

201420021A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

平成 27 年 (2015 年) 3 月

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
総括研究報告書

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 16

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 22

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 29

non-O157 EHEC のゲノム配列決定

林 哲也 宮崎大学 33

Stx ファ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 41

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 50

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 56

幼若無菌 BALB/cA 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 59

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	63
腸管出血性大腸菌感染に対する治療に関する研究 齋藤 昭彦 新潟大学医歯学総合研究科小児科学分野	66
志賀毒素産生性大腸菌による溶血性尿毒症症候群の診断・治療 ガイドラインの作成と小児死亡例の全国調査 伊藤 秀一 横浜市立大学大学院医学研究科発生成育小児医療学	68
溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドラインの作成 幡谷 浩史 東京都立小児総合医療センター腎臓内科	71
腸管出血性大腸菌感染症に併発する脳症の研究 水口 雅 京大学大学院医学系研究科・発達医科学	73
研究成果の刊行に関する一覧表	77
研究成果の刊行物・別刷	

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者： 大西 真 (国立感染症研究所・細菌第一部)

研究要旨

国内で分離される腸管出血性大腸菌の血清群、保有病原因子の解析を行った。また、血清診断およびPCR法を組み合わせたHUSの原因となった大腸菌血清群の推定方法の検討が進められた。ゲノム情報の整備、蓄積が進められるとともに、同一血清群における性状の違いについて検討がなされた。動物モデルの構築が進められ、腸管での炎症反応が重症化のトリガーになる可能性が示唆された。

診療ガイドラインの整備がなされるとともに、死亡18例の解析から、下痢から死亡までの日数の中央値は7.5日、HUS発症から死亡までは中央値3日と急激な経過が特徴であることが指摘された。抗菌剤の非投与例では、投与例に比して下痢から死亡までの経過が短い可能性が示唆された。また、脳症に対する副腎皮質ステロイドの有効性が示唆された。

感染症研究国際ネットワーク推進プログラムとの連携でコレラ菌 (n=426) のドラフトゲノム情報を取得した。さらには感染研保存株等を用いて腸管出血性大腸菌 0111 (n=872) のドラフトゲノム配列を今年度追加した。

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名を数える。国内ではHUS発症率は有症状者の4%程度であると考えられているが、時に多数のHUS症例および死亡者を含む集団事例が発生することがある(ドイツ atypical EHEC 0104 事例、日本 EHEC 0111 事例等)。

本研究では非典型的な EHEC 感染症が発生した際に遅滞無く対応できる検査体制の整備ならびに重傷例における診療の標準化を行なうことを目的とした。

国内分離株の情報整理、分離株の血清群の分布、病原因子プロファイル解析、非典型病原因子、subABの機能解析、非典型的な血清群の迅速な決定/推定法の検証、血清診断の検証、ゲノム情報の蓄積、動物モデルの構築、EHEC 感染症における死亡例の臨床的解析を実施した。

B. 研究方法

各分担研究報告に詳細を記述した。

感染症研究国際ネットワーク推進プログラムとの連携でコレラ菌のゲノム解析を実施した。コレラ菌 0 型別参照株 210 株のゲノム解析と併せて、岡山大学インド拠点、大阪

大学タイ拠点、長崎大学ベトナム拠点、神戸大学インドネシア拠点と連携を深めるため、感染研よりゲノム DNA 調整のプロトコールを提示し、各拠点による調整したゲノム DNA を感染研に送付し、感染研において Illumina MiSeq あるいは HiSeq を用いてドラフトゲノム配列を取得した。感染研保存株 EHEC 0111 においても同様にドラフトゲノム配列を取得した。

C. 研究結果

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

国内で 2013 年 12 月から 2014 年 12 月までに重症者（血便または溶血性尿毒症候群発症者）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）0 血清群は順に 0157, 026, 0121, 0111, 0103, 0145, 0165 となった。これら 7 つの 0 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 (*stx1* および [または] *stx2*) に加え、接着因子である Intimin をコードする *eae* 遺伝子である。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する目的で、2013 年から 2014 年 4 月までに国内で分離された上記の 7 血清群を除く 0 血清群のうち、有症者由来株 (n=18) について *eae* の分布状況を解析した。その結果、8 株が *eae* 陰性の非典型的な EHEC (LEE-negative EHEC) であり、このうち 4 株は接着遺伝子として *saa* を保有する株であった。残り 4 株のうち、血便由来株は 1 株であり、血清型 091:H-であった。2011 年のドイツ集団発生株で見られたハイブドタイプ (EAggHEC) は存在しなかった。2014 年 6 月に HUS 患者の血液（および尿）培養液から分離された EHEC 0115:H10 について同様な解析を行ったところ、これらの株は LEE-negative EHEC で *Saa*, *Eib* 等既知の蛋白質性接着因子を保有しない *stx1* 型株であ

ることが明らかとなった。

国内で分離される EHEC 026:H11/H-の多くは *stx1* のみを保有するが、近年 *stx2* のみを保有する株が重症者からいくつか分離されている。*stx2* のみを保有する EHEC 026 の multi-locus sequencing typing (MLST) 型を解析したところ、*stx1* のみや *stx1 stx2* の両方を保有するほとんどの 026 株に見いだされる ST21 以外に ST29 が存在することが明らかとなった。

東京都の調査においては、2014 年に 358 株のうち、血清群 0157, 026 および 0111 以外の株は 44 株 (12.3%) であったことが示された。44 株の血清群は、0103 (13 株, 3.6%), 0121 (11 株, 3.1%), 091 および 0145 が各 3 株 (0.8%), OUT が 8 株 (2.2%) であったが、これらが検出された患者に HUS 発症などの重症事例はなかった。

付着因子等の病原遺伝子保有状況について調べた結果、有症者からの分離が多い血清群 0103, 0121, 0145 は全ての株で *eae*, *hlyA* を保有していた。

2) 食品由来、ウシ由来 EHEC 株

勢戸らの調査によると、ウシ糞便 50 検体の精査の結果、EHEC が分離された検体は、合計 41 検体 (82%) であった。0 抗原型や毒素遺伝子のサブタイプは決定できていないが、少なくとも 18 検体で毒素型や性状の異なる複数の EHEC が分離された。

甲斐らの調査によると、食中毒の原因究明および感染経路の調査のために東京都健康安全研究センターに搬入された食品および環境材料から分離された 4 株の血清群は 074 (豚ハツ由来), 0119 (牛ツラミ刺し由来), 0142 (豚タン由来), OUT (牛小腸由来) であった。これらの株はいずれも VT2 産生株であったが、*eae* 等の病原因子関連遺伝子は、全て陰性であった。

3) 血清診断

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染が疑われる

溶血性尿毒症症候群 (HUS) 患者などの血清について、重症患者からの分離が多いとされている 7 タイプの O 抗原 (0157、026、0111、0103、0121、0145 および 0165) に対する抗体価を測定した (大阪府 勢戸)。17 症例中 15 症例は 0157 抗体陽性、1 症例は 0111 抗体陽性で、陽性と判定された抗原以外に疑陽性を示した検体もあったが、非特異反応であると推察された。

4) 大腸菌 O 血清群の核酸検出法

大腸菌の血清学的判定に対応した安価で迅速な核酸検出法の開発を目指し開発した大腸菌 O 血清群-PCR 検査系 (*E. coli* O-genotyping PCR 法) を、野生株 690 株 (O 血清群が判定できた 579 株に加え、判定できなかった 111 株を含む) を用いて本法の妥当性および有効性を評価した (宮崎大 井口)。本研究で開発した手法は、分離菌株の O 血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有用であると考えられた。

5) ゲノム解析

平成 23 年 4 月に発生した焼肉チェーン店を原因施設とした腸管出血性大腸菌 (EHEC) の集団食中毒事例では、EHEC 0111 だけでなく EHEC 0157 も分離された。昨年までの Stx2 ファージの解析と 0157 EHEC の Stx2 プロファージの PCR による多型解析により、Stx2 遺伝子が 2 コピー存在する株の存在から、*in vivo* で 2 つの血清群 EHEC 由来 Stx2 ファージの交差感染が示唆された。これを明らかにするため、今年度は EHEC 0157 の Stx2 プロファージのゲノムの構造解析を行い、EHEC 0111 及び Stx2 ファージの構造と比較したところ、本食中毒事例で分離された複数の EHEC 株は、*in vivo* で 2 つの血清群の EHEC 由来 Stx2 ファージの交差感染の結果であることがさらに強く示唆された (富山衛研 綿引)。

また、本事例の富山の HUS 患者由来分離菌

株 (EHEC 0111 110512 株) の解析 (感染研 黒田) から、7 つの完全長 plasmid を決定し、染色体の gap 箇所は stx2 ファージを除く λ ファージ領域 3 箇所である。本事例の特徴的な領域を抽出するために、国内分離株 106 株の配列決定を行い、染色体配列および plasmid も含めた包括的な解析を行ったところ、HUS 発症患者由来 EHEC に特徴的な ORF が Stx2 prophage 上に存在することが示唆された。

加えて、本研究において、いまだ全ゲノム情報が整備されていない non-0157 EHEC の全ゲノム配列を決定することを進めてきた (宮崎大 林)。本年度は、昨年度までに全長ゲノム配列を決定した 3 種類の non-0157 EHEC (0121:H19, 0145:HUT, 0165:H-) のアノテーションを終了した。また、各血清型の国内分離株・欧州分離株を追加収集するとともに (61, 42, 41 株)、そのドラフトゲノム配列を取得し、Stx2 産生量の測定を行った。さらに、0115:H10/H- の国内分離株 21 株のドラフトゲノム配列を取得した。一方、初年度の解析でヒトでの集団感染を起こしうる腸管病原体であることが明らかとなった *E. albertii* に関しては、昨年度までに取得した 4 株 (1 株は Stx2f 産生株) の完全長配列と 25 株 (Stx2f 産生株を 1 株含む) のドラフトゲノム配列に関して、菌種内ゲノム比較解析及び全ゲノム配列が決定されている大腸菌及び *Escherichia fergusonii* との属内での菌種間ゲノム比較解析を行った (昨年度からの継続)。その結果、本菌種のコアゲノム、遺伝的特性、大腸菌との相違点や本菌が保有する病原遺伝子群等に加え、*Escherichia* 属 3 種 (*E. albertii*, 大腸菌, *E. fergusonii*) のコアゲノムが明らかになった。また、比較ゲノム解析情報を基に、本菌を特異的に検出できる nested PCR 系を作成した。

更にゲノム解析データを有効利用するために、大量のゲノムデータを蓄積することとした (感染研 大西)。細菌性下痢症のなか

でEHEC 0111 およびコレラ菌のゲノムの大量取得を実施した。コレラ菌に関しては、426株のドラフトゲノム配列を取得し、EHEC 0111 に関しては、黒田らによる 106 株の解析に加えて、本年度計 872 株のドラフトゲノム配列を取得した。

8) EHEC の非典型的な病原因子の機能解析
Non-0157 型の腸管出血性大腸菌が産生する SubAB は ER ストレスセンサー蛋白質の一つである PERK の活性化を促し、Bax/Bak の構造変化、会合体形成、ミトコンドリアからのチトクロム c の放出に起因する細胞致死 (アポトーシス) を引き起こす。この研究では、昨年度取り組んだ SubAB の細胞内侵入機構の解析を引き続き行い、SubAB は lipid-raft, actin 依存性に細胞内に取り込まれた。更に、SubAB の細胞致死誘導、オートファジー阻害に関与する蛋白質として death associated-protein 1 (DAP1) を見出した。

9) 動物実験モデルの構築

富山県や福井県で集団食中毒を起こした菌株 (Ty-1) を含む 0111 血清型を中心に、Stx の産生を誘導する生体内因子を検索した。また、菌株間でのヒト白血球活性化能の違いを調べ、EHEC に対する炎症反応の強さが個人間でどの程度異なるのかを調べた。3 mM 過酸化水素を添加して静置培養を行うと、全ての菌株で Stx2 量が増加した。感染部位に集積した好中球などの炎症細胞が産生する過酸化水素などの活性酸素種が、EHEC 感染による大腸粘膜での炎症を誘導し Stx2 産生を促すことで組織傷害を増強する可能性が示唆された。そこで、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いた EHEC 感染モデルを検討した。すると、Ty-1 株を接種後、滅菌水道水を与えたマウスでは大腸粘膜および腎組織にはほとんど組織障害を認めず、一方、Ty-1 株を接種後、2% DSS を飲料水として与えると、大腸粘膜の著しい破壊と腎臓におけ

る顕著な急性尿細管壊死を示す尿細管の拡張が認められた。以上から、大腸局所の炎症反応の強弱が Stx2 産生量に影響し、重症化への移行に重要な因子となると考えられた。

10) 診療ガイドライン

Evidence Based Medicineに基づく溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診断・治療ガイドラインを2013年度に作成し、書籍として公表すると共に、英語版を作成し日本腎臓学会英文誌 Clinical Experimental Nephrology誌に公表した。本ガイドラインはMindsのガイドライン作成基準に則った溶血性尿毒症症候群の診断・治療に関するわが国発のガイドラインで、Mindsのホームページにも公表された。

溶血性尿毒症症候群 (HUS) は志賀毒素産生性腸菌 (STEC) 感染者の約1-10%に発症し、1/4-1/3の患者が中枢神経症状を呈し、急性期死亡率は約2-10%である。わが国では年間100名程のSTEC-HUS患者が発生し年に数名が死亡する。しかし、これまで小児死亡例の疫学調査はなく、その実態は不明であった。今回、わが国における志賀毒素産生性大腸菌による溶血性尿毒症症候群により死亡した小児患者の実態調査を実施した。2000年以降のSTEC-HUSによる死亡18名報告された。下痢から死亡までの日数の中央値は7.5日、HUS発症から死亡までは中央値3日と急激な経過が特徴であった。一方、経過中に抗菌薬の使用患者では、下痢から死亡までは、中央値8日、一方、非使用患者のそれは4日(4-5日)と有意に短かった ($p=0.047$)。

脳症は HUS 死亡例の約半数における直接死因となっており、出血性大腸炎の最も重篤な合併症である。全般型で最も警戒すべき症状は痙攣重積であり、これはバルビツール剤の持続点滴療法などの集中治療の対象となる。特異的治療法として有効性の確立したものはないが、2011年の富山における0111集団感染事例では、脳症に対する副腎皮質ステロイドの有効性が示唆された。

D. 考察

複数の重症者が発生する集団事例が起きた際には、一早い初動が必要である。EHEC 感染症を強く疑う場合には適切な選択培地の選択および Stx 産生性から、Major な血清群、特に血清群 O157 の検出は可能であり、迅速な対応が可能であると考えられる。しかしながら、1) O 血清群別が困難である場合、2) 適切な選択培地がない場合などでは、臨床検査部門において混乱を来す可能性がある。非典型的な性状を示す EHEC による重症者多発する事例において、O 血清群、毒素型、CT に対する感受性、糖の分解性についていち早く情報を共有することが重要である（甲斐分担報告 表 5）。

EHEC のなかでも 7 つの典型的 O 血清群に対するスクリーニング法 (PCR 法) に加えて、非典型的な血清群に関してもいち早く血清群別（あるいはその推定）が可能となるよう、PCR 法による決定（推定）法の検証が進めてきた。地方衛生研究所および国立感染症研究所のネットワークのなかで迅速に対応可能にしておく必要がある。

時に、便からの EHEC 分離が難しい症例が存在する。これは便中の EHEC 菌数が著しく少ないことがあるからであるが、Stx 遺伝子を運ぶファージが不安定で染色体から脱落することもその一因となる。下痢が先行する HUS 症例のなかでも、初期の検査においても EHEC 分離がみられない場合があり、その原因診断において難渋する場合がある。このような場合には、血清中の大腸菌 O 抗原に対する抗体の存在を示すことで、EHEC 感染が HUS の原因となっていたことを示すことが可能である。特に便中の菌数が少数の場合や、稀な血清群による EHEC 感染症の場合には積極的な血清診断の利用が望まれる。

溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診断・治療ガイドラインにおいて、これまでの知見の整理がすすみ、広く活用出来る状態となっている。また、本ガイドラインの英語版も完成し、公

表された。Minds のガイドライン作成基準に則った溶血性尿毒症症候群の診断・治療に関するわが国発のガイドラインで、Minds のホームページにも公表された。

未だ脳症発症の機構については未解明の部分が残されているが、脳症に対する副腎皮質ステロイドの有効性が示唆された事例の解析が行われた。これらの新知見に関して、再度評価を実施し、本ガイドラインの改訂に繋げる必要がある。そのためにも、重症例の詳細な検討を細菌学的な解析と臨床からの解析を進める必要がある。

重症例多発事例には、菌側の要因が大きく関与していることが推測される。本研究で進められてきたマウスモデルがその機構解明に利用可能か更なる検討が必要である。

E. 結論

国内における EHEC 感染症の情報が整理され、非典型的な EHEC 感染症発生の際に如何に対応すべきか、その細菌学的知見を蓄積した。また、Minds のガイドライン作成基準に則った溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診断・治療ガイドラインが完成した。

F. 健康危機情報 なし

G. 研究発表

1) Iyoda S, Manning SD, Seto K, Kimata K, Isobe J, Etoh Y, Ichihara S, Migita Y, Ogata K, Honda M, Kubota T, Kawano K, Matsumoto K, Kudaka J, Asai N, Yabata J, Tominaga K, Terajima J, Morita-Ishihara T, Izumiya H, Ogura Y, Saitoh T, Iguchi A, Kobayashi H, Hara-Kudo Y, and Ohnishi M, EHEC Working Group in Japan: Phylogenetic clades 6 and 8 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with particular stx subtypes are more frequently found in isolates from hemolytic uremic syndrome patients than from asymptomatic carriers. Open Fo

- rum Infectious Diseases, 1 (2): first published online July 18, 2014.
- 2) Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the Escherichia coli O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research* 22:101-107 (2015)
- 3) von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling Å, Dougan G. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli (EPEC) clades with long-term global distribution. *Nature Genetics* 46:1321-1326 (2014)
- 4) Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N. Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *Journal of Food Protection* 77:1269-1274 (2014)
- 5) YAHIRO, K., TSUTSUKI, H., OGURA, K., NAGASAWA, S., MOSS, J. & NODA, M. 2014. DAP1, a Negative Regulator of Autophagy, Controls SubAB-Mediated Apoptosis and Autophagy. *Infect Immun*, 82, 4899-908.
- 6) NAGASAWA, S., OGURA, K., TSUTSUKI, H., SAITOH, H., MOSS, J., IWASE, H., NODA, M. & YAHIRO, K. 2014. Uptake of Shiga-toxigenic Escherichia coli SubAB by HeLa cells requires an actin- and lipid raft-dependent pathway. *Cell Microbiol*, 16, 1582-601.
- 7) Watahiki, M., Isobe, J., Kimata, K., Shima, T., Kanatani, J., Shimizu, M., Nagata, A., Kawakami, K., Yamada, M., Izumiya, H., Iyoda, S., Morita-Ishihara, T., Mitobe, J., Terajima, J., Ohnishi, M. and Sata, T. Characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, 52:2757-2763.
- 8) N. Sudo, A. Soma, A. Muto, S. Iyoda, M. Suh, N. Kurihara, H. Abe, T. Tobe, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, M. Ohnishi, Y. Sekine: A novel small regulatory RNA accelerates cell motility in enterohemorrhagic Escherichia coli. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60: 44-50, 2014.
- 9) M. Kusumoto, D. Fukamizu, Y. Ogura, E. Yoshida, F. Yamamoto, T. Iwata, T. Ooka, M. Akiba, T. Hayashi: The lineage-specific distribution of IS-excision enhancer in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(4): 1394-1402, 2014.
- 10) A. Hinenoya, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Ooka, T. Hayashi, T. Ramamurthy, S. Faruque and S. Yamasaki: Molecular characterization of cytotoxic distending toxin gene-positive Escherichia coli from healthy cattle and swine in Nara, Japan. *BMC Microbiology*, 14: 97, 2014.
- 11) R. Kajitani, K. Toshimoto, H. Noguchi, A. Toyoda, Y. Ogura, M. Okuno, M. Yabana, M. Harada, E. Nagayasu, H. Maruyama, Y. Kohara, A. Fujiyama, T. Hayashi, T. Itoh: Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.*, 24(8): 1384-1395, 2014.
- 12) Igarashi T, Ito S, Sako M, Saitoh A, Hataya H, Mizuguchi M, Morishima T, Ohnishi K, Kawamura N, Kitayama H, Ashida A, Kaname S, Taneichi H, Tang J, Ohnishi M; Study group for establishing guidelines for the diagnosis and therapy of hemolytic uremic syndrome: Guidelines for the management and investigation of hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol* 18:525-557, 2014
- 13) 溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドライン作成班班員（総括責任者：五十嵐隆）：溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドライン、東京医学社、東京、2014

- 14) Hattori M, Sako M, Kaneko T, Ashida A, Matsunaga A, Igarashi T, Itami N, Ohta T, Gotoh Y, Satomura K, Honda M, Igarashi T: End-stage renal disease in Japanese children: a nationwide survey during 2005-2011. Clin Exp Nephrol 2014 (in press)
- 15) 伊藤秀一. HUS up to date 欧州における大規模集団感染を中心に. 日本小児腎不全学会雑誌 ; 33 : 16-19 2013
- 16) 伊藤秀一. 志賀毒産生性大腸菌による HUS の治療 ; 日本腎臓病学会 TTP/HUS/aHUS ; 56 (7) : 1075-81 日本腎臓病学会雑誌 2014
- 17) Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S: Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the Joint Committee of the Japanese Society of Nephrology and the Japan Pediatric Society. Clin Exp Nephrol 18:4-9, 2014
- 18) Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S: Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the Joint Committee of the Japanese Society of Nephrology and the Japan Pediatric Society. Pediatr Int 56: 1-5, 2014
- 19) 芦田 明、玉井 浩: 溶血性尿毒症症候群 (典型的/非典型的) . 小児内科 46: 209-213, 2014
- 20) 芦田 明、玉井 浩: 補体調節因子異常による非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) . 小児科診療 77: 771-777, 2014
- 21) 芦田 明、玉井 浩: エクリズマブ : aHUS. 腎と透析 76: 77-80, 2014
- 22) 芦田 明、玉井 浩: 典型的 HUS. 日本血栓止血学会雑誌 25: 706-712, 2014
- 23) 芦田 明、玉井 浩: 非典型溶血性尿毒症症候群. 日本アフェレシス学会雑誌 34: 40-47, 2014
- 24) 芦田 明、玉井 浩: aHUS とアフェレシス. 日本アフェレシス学会雑誌 34: 40-47, 2014
- 25) 北山 浩嗣・和田 尚弘: 新生児・小児の敗血症に対するエンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP) . 日本アフェレシス学会雑誌 34: 2015 (in press)
- 26) 種市 尋宙, 六車 崇, 太田 邦雄, 小西道雄, 奥村 彰久, 高梨 潤一, 水口 雅, 宮脇 利男: 腸管出血性大腸菌 O111 集団感染における危機対応, 日本小児科学会雑誌 118: 1103-1108, 2014
- 27) 種市 尋宙: 腸管出血性大腸菌 O111 集団感染における小児重症例の特徴とその対策. 小児科 55:1017-1025, 2014
- 28) 種市 尋宙 腸管出血性大腸菌 O111 の治療: 集団感染から学ぶもの. 感染症内科 2: 195-202, 2014
- 29) 種市 尋宙: 腸管出血性大腸菌感染症による急性脳症の病態と治療戦略 Neuroinfection, 2015 (in press)
- 30) Shimizu M, Kuroda M, Inoue N, Konishi M, Igarashi N, Taneichi H, Kanegane H, Ito M, Saito S, Yachie A: Extensive serum biomarker analysis in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111-induced hemolytic-uremic syndrome. Cytokine 66:1-6, 2014
- 31) Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M: Clinical and radiologic features of encephalopathy during 2011 *E coli* O111 outbreak in Japan. Neurology 82: 564-572, 2014

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)
研究課題名(課題番号):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 26 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: 李 謙一, 石嶋 希, 石原 朋子(国立感染症研究所・細菌第一部)

研究要旨

国内で2013年12月から2014年12月までに重症者(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, O121, O111, O103, O145, O165となった。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(*stx1* および[または]*stx2*)に加え、接着因子であるIntiminをコードする*eae* 遺伝子である。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する目的で、2013年から2014年4月までに国内で分離された上記の7血清群を除くO血清群のうち、有症者由来株(n=18)について*eae*の分布状況を解析した。その結果、8株が*eae*陰性の非典型的なEHEC(LEE-negative EHEC)であり、このうち4株は接着遺伝子として*saa*を保有する株であった。残り4株のうち、血便由来株は1株であり、血清型O91:H-であった。2014年6月にHUS患者の血液(および尿)培養液から分離されたEHEC O115:H10について同様な解析を行ったところ、これらの株はLEE-negative EHECでSaa, Eib等既知の蛋白質性接着因子を保有しない*stx1*型株であることが明らかとなった。

国内で分離されるEHEC O26:H11/H-の多くは*stx1*のみを保有するが、近年*stx2*のみを保有する株が重症者からいくつか分離されている。*stx2*のみを保有するEHEC O26のmulti-locus sequencing typing (MLST)型を解析したところ、*stx1*のみや*stx1 stx2*の両方を保有するほとんどのO26株に見いだされるST21以外にST29が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(ここでは血便または[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)。これまでの我々の研究から、2007年から

2013 年における重症者由来株として分離頻度の多い血清群として O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165 が明らかとなっている。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方) 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。2011 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 *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*: EA_gEC) が保有する病原性遺伝子群 (*agg*) を保有することから、EA_gEC と EHEC のハイブリッド型 (EA_gEH_C) であった。そこで本研究では、日本国内において、EA_gEH_C 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) を用い、*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*) については未発表 (伊藤ら、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 cycler (Biometra), DNA Engine (Bio-Rad), または T100 Thermal Cycler (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) 5) HUS 患者血清における抗大腸菌抗体価解析

EHEC 検査マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC.pdf>) に記載の方法によって HUS 患者血清中の 7 つの主要 O 血清群の抗体価について解析を行った。

5) 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。

6) multi-locus sequencing typing (MLST)法

<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>に記載の方法によって実施した。

C. 研究結果

1) LEE-negative EHEC の解析

a) 血清型別

2013年12月から2014年12月までに分離された重症者由来の EHEC 株として分離頻度の高い O 血清群は順に O157 (77.2%), O26 (10.3%), O121 (4.2%), O111 (2.3%), O103 (1.7%), O145 (1.6%), O165 (0.4%) となっており、これら主要 7 血清群の EHEC は病原性 (接着) 遺伝子として *eae* を保有することが判明している。これらの主要 7 血清群に続いて重症者由来株として多い O 血清群として O172 (総分離数 3, 血便由来分離数 3), O177 (総分離数 3, 血便由来分離数 3), O55 (総分離数 9, 血便由来分離数 3), O5 (総分離数 3, 血便由来分離数 3), O91 (総分離数 21, 血便由来分離数 2) となっており、O91 以外の O 群はすべて *eae* 陽性であった。

日本国内における非典型的な EHEC (LEE-negative EHEC) を同定するために、2013年から2014年4月までに分離された EHEC のうち、上記の 7 血清群以外の O 血清群に属する有症者由来株として 18 株が存在することが明らかとなった。

b) LEE-negative EHEC の検出

a)で明らかとなった 18 株のうち *eae* の保有状況を PCR で解析したところ、

LEE-negative EHEC は 8 株であった (約 44%)。

c) *saa* の分布状況の解析

b)で明らかとなった 8 株のうち 4 株は *saa* 保有株 (約 50%) であり、このうち 1 株は血便患者由来株 (血清型 O91:H14) であった。*saa* 非保有の 4 株のうち、血便患者由来株は 1 株であった (血清型 O91:H-)。なお、2011 年のドイツ集団発生株で見られたハイブドタイプ (EAggHEC) は存在しなかった。

d) HUS 患者由来の EHEC O115:H10 株の解析

2014年6月に HUS 患者の血液 (および尿) 培養液から分離された O115:H10 について、上記と同様な解析を行ったところ、これらの株は LEE-negative であり、*saa* 陰性、Eib 陰性であることが判明した。志賀毒素型は *stxI* で、これまでに HUS 症例由来株としては分離例のない、*stxI* だけを保有する LEE-negative EHEC であることが明らかとなった (資料 2)。

本 HUS 患者の便からは EHEC は分離されなかった。EHEC 感染による HUS 症例の確定診断は便からの EHEC 分離、便中の志賀毒素検出、血清中の大腸菌抗体陽性のいずれかを証明する必要があるため、本 HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価を解析したところ、主要 7 血清群の抗体はいずれも陰性となったが、分離された O115 に対する抗体は陽性となった。これらの血清診断結果から EHEC 感染による HUS 症例と確定した。

e) 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

性を示し、接着パターンと保有する接着遺伝子の保有パターンは相関があると考えられている。d)で明らかとなった HUS 患者由来の LEE-negative EHEC O115:H10 の培養細胞への接着性を解析したところ、効率よく培養細胞へ接着することが確認された(データ省略)。さらに、それらの接着パターンは、2007-2011 年分離株の解析から明らかとなった血便患者由来 LEE 非保有型 EHEC の 2 株(いずれも血清型 O115:H10)と同様であることが明らかとなった(データ省略)。

2) *stx2* のみを保有する O26 の MLST 解析

国内で分離される EHEC O26 の大部分は *stx1* のみを保有するタイプであり、次いで *stx1 stx2* 保有型である(資料 3)。2012 年の後半から 2014 年にかけて *stx2* のみを保有するタイプの分離数が増加している(IDWR の集計による)。ドイツを中心としたヨーロッパ各国では *stx2* 保有型の O26 による重症感染事例が多発しており、これらの株の MLST 解析によれば、EHEC O26 の大部分が属する ST21 以外に、ST29 に型別される系統が存在することが判明している(*Clin Infect Dis.* 2013, 56:1373-1381)。

国内で分離されている 36 株の *stx2* 保有型の O26 について MLST 解析を行ったところ、17 株が ST21、19 株が ST29 に型別されることが判明し、血便または(および) HUS 患者の割合は ST21 では 3/17 (17.6%)、ST29 が 8/19 (42.1%) であった(資料 4)。

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 による重症者由来株は 2013-2014 年 4 月の間に少なくとも 2 株存在し、そのうち 1 株は接着遺伝子として *saa* を保有する株であ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。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。

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な解析を行っておくことは、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。

ドイツ等を中心としたヨーロッパでは *stx2* 型の O26 による重症例が多数報告されており、それらの系統解析から *stx2* 型の O26 には ST29 と呼ばれる系統が存在することが報告されている。日本国内で分離される主要 7 血清群のうち、O157 に次いで分離頻度の高い O 群が O26 である。国内分離 O26 の約 92% は *stx1* 型であり、*stx2* 型は全体の約 1% 程度である。本研究から、国内の O26 分離株にも ST29 が存在することが明らかとなっ

た。上記のヨーロッパ分離株の解析では、Stx2 型が重症化ファクターであり、ST21 と ST29 の系統の違いは重症化には影響しないことが明らかとなっている。一方、国内分離の *stx2* 型 O26 株は分離数こそ少ないものの、これまでのところ ST29 が ST21 よりも多くの重症例に関連していることが明らかとなっている（資料 3,4）。今後も引き続き、*stx2* 型 O26 株の分離状況について注視する必要があると考えられる。

E. 結論

- ・2013 年 12 月から 2014 年 12 月までに分離された重症者由来の EHEC 株として分離頻度の高い O 血清群は順に O157 (77.2%) , O26 (10.3%) , O121 (4.2%) , O111 (2.3%) , O103 (1.7%) , O145 (1.6%) , O165 (0.4%) 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 4 株存在した。
- ・上記の 7 大 O 血清群に次いで重症例が分離数が多かった O172, O177, O55, O5, O91 のうち、O91 以外の O 群はすべて *eae* 陽性であった。
- ・7 大 O 血清群以外の重症例由来株 4 株のうち 2 株が LEE-negative EHEC であった。このうちの 1 株は *saa* 保有型の O91:H14、もう 1 株は *saa* 非保有型の O91:H-であることが判明した。
- ・2011 年のドイツ集団発生株 (O104:H4) と同様な *agg* を保有する株は存在しなかった。
- ・国内分離の *stx2* 型 O26 (n=36) のうち、17 株が ST21、19 株が ST29 であった。
- ・上記の *stx2* 型 O26 のうち、ST29 は 42.1%、ST21 は 17.6%が重症例由来株であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

Iyoda S, Manning SD, Seto K, Kimata K, Isobe J, Etoh Y, Ichihara S, Migita Y, Ogata K, Honda M, Kubota T, Kawano K, Matsumoto K, Kudaka J, Asai N, Yabata J, Tominaga K, Terajima J, Morita-Ishihara T, Izumiya H, Ogura Y, Saitoh T, Iguchi A, Kobayashi H, Hara-Kudo Y, and Ohnishi M, EHEC Working Group in Japan: Phylogenetic clades 6 and 8 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with particular *stx* subtypes are more frequently found in isolates from hemolytic uremic syndrome patients than from asymptomatic carriers. Open Forum Infectious Diseases, 1 (2): first published online July 18, 2014.

資料1. ヒト由来EHECのO群と重症者(血便および/またはHUS発症者)由来株数(2013年12月-2014年12月)

O group	Total number	BD and/or HUS
O157	1,610	764
O26	638	102
O121	80	42
O111	77	23
O103	112	17
O145	130	16
O165	8	4
O55	9	3
O177	3	3
O172	3	3
O91	21	2
OUT	14	3
others	68	7
total	2,773	989

BD:
bloody
diarrhea

HUS:
hemolytic
uremic
syndrome

資料2. LEE-negative EHEC from HUS/TTP patient in Japan

Serotype	Year	<i>stx</i> type, adhesin gene
O86:H-*	1999	<i>stx2+</i> , <i>agg+</i>
O170:H16	2003	<i>stx2+</i>
O183:H18**	2012	<i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O113:H- [H21]	2012	<i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O174:H8	2012	<i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O113:H- [H21]	2013	<i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O115:H10**	2014	<i>stx1+</i>

* : EAggEC-EHEC hybrid type like German O104:H4 strain.

** : isolates from blood/urine culture

Since 1996, we have isolated only 7 LEE-negative EHEC strains from HUS/TTP patients in Japan.

資料3. *stx* type of human-derived EHEC O26:H11/H-
(2007-2013年)

<i>stx</i> type	# of isolates	# of BD/HUS	% (BD/HUS)
<i>stx1</i>	3,113	462 / 1	14.9
<i>stx2</i>	36	10 / 1	30.6
<i>stx1 stx2</i>	212	59 / 2	28.8
unknown	5	0 / 0	---
total	3,366	534	15.9

資料4. MLST of EHEC O26:H11/H- *stx2* (n=36: 資料3参照)

ST	# of isolates	# of BD/HUS	%
21	17	3 / 0	17.6
29	19	7 / 1	42.1

平成 26 年度分担研究報告書
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）
	尾畑 浩魅	（東京都健康安全研究センター・微生物部）
	貞升 健志	（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。

2014 年に東京都内で分離された 358 株のうち、血清群 0157, 026 および 0111 以外の株は 44 株（12.3%）で、2012 年と比較してその割合は高くなっていた。44 株の血清群は、0103（13 株，3.6%），0121（11 株，3.1%），091 および 0145 が各 3 株（0.8%），OUT が 8 株（2.2%）であったが、これらが検出された患者に HUS 発症などの重症事例はなかった。

付着因子等の病原遺伝子保有状況について調べた結果、有症者からの分離が多い血清群 0103, 0121, 0145 は全ての株で *eae*, *hlyA* を保有していたが、食品由来株 4 株（VT2 産生）はこれらの病原遺伝子を保有していなかった。

非典型的 EHEC による食中毒・感染症の発生時に、迅速・効率的に検査を行うためには、菌株に関する情報が重要である。検査に有用となる情報、非典型的 EHEC 検査のポイントについてまとめた。

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、全国で毎年 3,000～4,000 例報告されており、減少傾向にはない。その原因菌の血清型は血清群 0157 が最も多く、全体の 60% 程度である。0157 以外の non-0157 EHEC による感染例も増加しており、以前と比較して EHEC の中に占める割合も高くなってきている。non-0157 EHEC による食中毒・感染事例の原因血清型としては、血清群 026, 0111, 0121 等が比較的多く報告されている。しかし、2011 年にドイツを中心に発生した大規模食中毒では 0104:H4（VT2 産生）というこれまでほとんど報告されて来なかった血清型菌が原因となった。今後、日本でもこのようなマイナーな血清型菌による大規模集団食中毒・下痢症が発生する可能性も否定できない。そこで非典型的 EHEC 感染症に対応するた

めの基礎データを把握することを目的として、2014 年に東京都で分離された non-0157 EHEC を対象に分離状況および病原因子の保有状況を調べた。また非典型的 EHEC 食中毒・感染症が発生した際に対応可能な検査系を確立することを目的として、必要な情報収集項目等のリストアップを行った。

B. 研究方法

1. EHEC の病原因子保有状況

1) 供試菌株

2014 年に東京都内で分離された EHEC 358 株のうち、血清群 0157, 026, 0111 以外の血清群菌 44 株を対象とした。また食中毒の原因菌調査のために当センターに搬入された食品および環境材料由来の non-0157 EHEC 4 株を供試した。

2) 病原遺伝子の確認

既知の付着因子あるいは病原因子である

eae, *saa*, *hlyA*, *aggR*, 新しい毒素として報告されている SubAB に関する *subA* 遺伝子について PCR 法で保有状況を調べた。

2. 非典型的 EHEC を原因とした食中毒・感染症のための検査法の確立

非典型的な EHEC 食中毒・感染症が発生した場合に対応するための検査法を確立することを目指し、検査工程ごとに考えるべきポイントをまとめた。

C. 研究結果

1. EHEC の病原因子保有状況

1) ヒト由来株の分離状況

2014 年に東京都内で分離されたヒト由来 EHEC 株は 358 株であった (表 1)。そのうち 0157 が 268 株 (74.9%) で最も多く、次いで 026 が 37 株 (10.3%) であった。この上位血清群で全体の 85.2% を占めており、2 血清以外の血清群菌は 53 株 (14.8%) であった。

血清群 0157, 026 および 0111 以外の血清群菌は 44 株 (12.3%) であった。これらを対象に血清型別試験を実施したところ、10 種類の血清群に分類された。最も多く分離されたのは 0103 で 13 株 (3.6%)、次いで 0121 (11 株, 3.1%)、091 および 0145 は各 3 株 (1.2%)、05, 08, 0109, 0128, 0146, 0153 は各 1 株 (0.3%)、血清型別不能 (OUT) が 8 株 (2.2%) であった。

2) 分離菌と症状

分離された EHEC について、その由来を症状の有無によって比較した (表 2)。その結果、有症者から高率に検出された血清群は 0103 (有症: 10, 不明 3), 0121 (有症: 7, 不明: 4), であった。HUS を発症した事例は 10 名認められたが、いずれも 0157 を原因とするものであった。

3) 遺伝子保有状況

病原因子関連遺伝子である *eae*, *saa*, *hlyA*, *aggR*, *subA* 遺伝子の保有状況を表 3 に示した。

(1) インチミン遺伝子 (*eae*)

供試した 43 株中 35 株 (81.4%) が陽性で

あった。血清群 05, 0103, 0109, 0121, 0145 および 0153 では分離された全ての株が *eae* 陽性であった。その他、OUT 株 8 株中 6 株で *eae* を保有していた。

(2) STEC アドヘシン遺伝子 (*saa*)

供試した 43 株全て陰性であった。

(3) ヘモリシン遺伝子 (*hlyA*)

hlyA の保有率は血清型によって異なっており、05, 0103, 0121, 0128, 0145, 0153 は 100% 陽性であった。091 は 3 株中 2 株で陽性となった。

(4) SubAB 毒素関連遺伝子 (*subA*)

新しい毒素として報告されている SubAB 保有状況について泉谷らのプライマーを用いて調べた結果、0128 および 0146 の各 1 株が陽性であった。

(5) 凝集接着性遺伝子 (*aggR*)

aggR を保有している株は認められなかった。

2. 食品・環境由来株の病原因子保有状況

食中毒の原因究明および感染経路の調査のために当センターに搬入された食品および環境材料から分離された 4 株の血清群は 074 (豚ハツ由来), 0119 (牛ツラミ刺し由来), 0142 (豚タン由来), OUT (牛小腸由来) であった。これらの株はいずれも VT2 産生株であったが、*eae* 等の病原因子関連遺伝子は、全て陰性であった (表 4)。

3. 非典型的 EHEC を検査することを目的とした検査法の確立

1) 菌株および患者情報

患者からすでに菌が検出されている場合は、菌株に関する情報を知っておくことで検査が迅速・容易となる。検査に有用となる情報をまとめた (表 5)。血清型や毒素型が分からない場合でも、CT に対する感受性やソルビトールなどの糖の分解性が分かれば菌の分離が容易になる。糞便検体の場合は糞便提出者の情報があるとよい。発症の有無や抗菌薬投与の有無は特に重要である。

2) 糞便を対象とした検査法

検査をする時に、それぞれの検査過程で