

201420021B

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～平成 26 年 総合研究報告書

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  
総合研究報告書

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 . . . . . 18

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 . . . . . 28

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 . . . . . 35

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 . . . . . 66

non-O157 EHEC のゲノム配列決定

林 哲也 宮崎大学 . . . . . 74

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 . . . . . 86

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 . . . . . 95

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 . . . . . 109

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 . . . . . 114

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 . . . . .	122
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 . . . . .	133
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 . . .	135
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 . . . . .	139
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 . . . . .	143
研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	156

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 24-26 年度 総括研究報告書

代表 大西 真 (国立感染症研究所・細菌第一部)

研究要旨 本研究班において、エビデンスに基づいた Minds のガイドライン作成基準を遵守した HUS 診断・治療ガイドライン (日本語版、英語版) を作成された。小児死亡例の検討、脳症に対する副腎皮質ステロイドの有効性の検討などがなされた。また、国内臨床分離株の情報を整理し、血清群 O157, O26, O111, O121, O103, O145, O165 を 7 つの主要血清群として、特にこれらの EHEC に関する検査体制を整える必要があることを示した。他の血清群における大規模集団事例の発生を想定して、血清群特異的な PCR 法を開発し、HUS 症例における血清診断による原因 EHEC の推定ならびに菌株分離の進め方を検討した。非定型な病原因子の多様性、分布を精査するとともに、SubAB 毒素に関しては機能解析を進めた。2011 年のユッケ関連集団事例 EHEC O111 株のゲノム学的解析、ファージの多様性解析を進めるとともに、多菌株のドラフトゲノム配列を取得した。EHEC O121, O145, O165, O115 に加え、大腸菌の近縁種であり、EHEC と共通の病原因子をもつ *E. arbertii* のゲノム解析を進めた。JGRID との連携で、コレラ菌のゲノム解析を開始し、国内外で問題となる下痢原性細菌(EHEC およびコレラ菌)のゲノムデータの集積を試み、現在までに計 1610 株のゲノム情報を取得した。

研究分担者	齊藤 昭彦 (新潟大学・医)
井口 純 (宮崎大学・農)	伊藤 秀一 (横浜市立大学・医)
八尋錦之助 (千葉大学・医)	幡谷 浩史 (東京都小児総合医療センター)
伊豫田 淳 (国立感染症研究所・細 1)	水口 隆 (東京大学大学院・医学系)
黒田 誠 (国立感染症研究所・病原ゲノム)	研究協力者
林 哲 (宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター)	李 謙一, 石嶋 希, 石原 朋子 (国立感染症研究所・細菌第一部)
桑原 知巳 (香川大学・医)	小西典子, 尾畑浩魅, 貞升健志 (東京都健康安全研究センター 微生物部)
綿引 正則 (戸山衛生研究所)	田口 真澄, 原田 哲也 (大阪府立公衆衛生研究所)
勢戸 和子 (大阪府公衆衛生研究所)	
甲斐 明美 (東京都健康安全研究センター)	
五十嵐 隆 (国立成育医療研究センター)	磯部 順子, 木全 恵子, 清水 美和子, 増

田 千恵子, 金谷 潤一 (富山県衛生研究所・細菌部)

関塚剛史 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)

小椋 義俊 (宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター)

大岡 唯祐 (宮崎大学・医学部)

今大路 治之 (香川大学医学部・分子微生物学・助教)

大西健児 (東京都立墨東病院感染症科)

川村尚久 (大阪労災病院小児科)

北山浩嗣 (静岡県立こども病院腎臓科)

芦田 明 (大阪医科大学小児科)

要 伸也 (杏林大学医学部第一内科)

種市尋宙 (富山大学医学部小児科)

佐古まゆみ (国立成育医療研究センター臨床試験推進室)

Julian Tang (国立成育医療研究センター研究所研究員)

篠塚 俊介 (東京都立小児総合医療センター)

原田 涼子 (東京都立小児総合医療センター)

査読委員: 服部元史 (東京女子医科大学腎臓総合医療センター腎臓小児科)

本田雅敬 (東京都立小児総合医療センター)

石倉健司 (東京都立小児総合医療センター腎臓内科)

小林信秋 (認定NPO法人難病のこども支援全国ネットワーク)

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic E. 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、大別して以下の2点である。(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。「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。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こと。

研究成果の詳細は各分担研究報告書に記載した。ここでは、それらの概要について報告する。

## B. 研究方法

各分担報告書に詳述した。

## C. 研究結果／考察

### 腸管出血性大腸菌の多様性解析

わが国における腸管出血性大腸菌感染症の93%程度は、7つの血清群(0157, 026, 0111, 0121, 0103, 0145, 0165)によるものである。血性下痢(BD)の有無にかかわらず有症状者の約95%程度はこの7つの血清群に属するEHECに依るものである。

2007-2014年EHEC分離症例20,727例のうち、血性下痢およびHUSを呈する症例は7,607例(36.7%)であった。上記7つの血清群の中で

血性下痢およびHUSを呈する症例の占める割合が高いものは、EHEC 0165 (50.6%, 44/87), EHEC 0157 (46.0%, 6,289/13,680), EHEC 0121 (38.8%, 191/492)となる。EHEC 026, 0111, 0145, 0103 症例の血性下痢およびHUSを呈する症例の占める割合は、それぞれ16.7% (635/3,809), 20.7% (153/739), 27.1% (125/462), 16.4% (89/543)であった。

同一の血清群であってもEHEC 0157の中には病原性に相違があるサブグループ(clade)が存在することを示唆するデータを示した(Iyoda et al. Open Forum Infectious Diseases, 1, 2014)。また、EHEC 026の中にもStx2単独産生株はStx1単独産生株に比較して重症例(血性下痢/HUS)と関連することが示唆された。さらに、EHEC 026 Stx2単独産生株はMLST解析によって2つのST型に分類され、そのうちST29に分類されるEHEC 026 Stx2分離例のうち血性下痢/HUS陽性症例は42.1%であり、ST29に分類されるEHEC 026 Stx2分離例の17.6%よりも高率であった。EHEC 026においても、重症化と関連する菌株集団が存在することが示唆された。

### 無症状保菌者およびウシのEHEC保菌

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)の血清群別、*stx*遺伝子型別、*eae*, *saa*, *subA*, *aggR*遺伝子の有無を検討した。これらの株は472,734人、延べ2,774,824検体から分離されており、その検体の陽性率は0.014%であった。また、陽性者の割合は0.084% (398/472,734人, 2人は異なる時期に2度陽性)となった。400株中46株は0血

血清群別不能であったが、354 株から 68 種類の O 群が見いだされた。400 株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。400 株のうち 55 株 (13.8%) が LEE 保有株であった。

主要な EHEC 保菌動物であるウシについて、0157 および 026 の分離報告は多いもののそれ以外の O 抗原型について精査されているとは言いがたい。そこで、ウシ直腸便の下痢原性大腸菌保有状況を調査した結果、90 検体中 80 検体から EHEC が分離され、ウシが高率で EHEC を保有している実態が明らかになった (勢戸)。また、少なくとも 28 検体においては複数の毒素型や性状の異なる EHEC が分離された。

ヒト、ウシにおける *stx* 陽性大腸菌はこれまで考えていた以上に高率で存在する可能性が示唆された。

*stx* 遺伝子は様々な大腸菌に既に導入されており、接着因子との組合せにより病原性を発揮する可能性がある。これまでの患者由来の EHEC は LEE を保有するものが多い。しかしながら、他の接着因子を利用した新しいタイプの *stx* 遺伝子保有大腸菌が甚大な健康被害を与える可能性を視野にいれた十分なサーベイランスが必要である。

#### 非典型的な血清群に属する大腸菌の検出系開発および血清診断

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場合が起こりうる。

そこで、血清を用いた手法を補助する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、各 O 血清群またはグループを特異的に判定出来る 162 種の PCR プライマーセットをデザインし、20 種のマルチプレックス PCR キットからなる検査系の開発がなされた。妥当性および有効性も検証された。

EHEC 感染症が疑われる症例において患者便から EHEC が分離されない症例が存在する。その理由は様々であるが、非分離症例においても HUS 症例では血清中の大腸菌 O 抗原に対する抗体価を測定することが HUS 病原診断の鍵となる。

腸管症状を伴う HUS 症例においては、血清群別の国内分離頻度に基づいて 7 種 (0157, 026, 0111, 0121, 0145, 0103, 0165) の血清群については、菌体抗原液を調整し血清診断を実施することを提唱する。さらに、便検体が残されている場合は適切な培地 (選択、非選択) を用いて *stx* 遺伝子のスクリーニングと網羅的 O-genotyping 法を実施し、便中に EHEC が存在すること、その O 血清群を推定する。さらに、示唆された O 血清群の参照株を抗原として、再度血清診断を実施することで、より精度高く HUS の原因診断が可能となることを示した。

#### non-0157 EHEC のゲノム配列決定

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、原因菌が分離されなかった患者群に重症患者が含まれていたこと、血清群 0111 には安定な Stx2 プロファー

ジと不安定なプロファージが存在していたこと、そして 0111 だけでなく 0157 も分離されたことなど、これまでの EHEC 食中毒とは異なる細菌学的な特徴を示していた。この研究では、本事例の細菌学的特徴を明らかにし、重症化の原因を究明することを目的として、特に EHEC 感染症の重症化に関連するといわれている Stx2 ファージの解析を行った。本食中毒事例の検体から、Stx2 ファージの分離を試み、患者便と 0111 *stx2* 分離株から、Stx2 ファージを分離し、構造解析を行った。さらに本食中毒事例で分離された 0111 EHEC だけでなく、複数の 0157 EHEC の Stx2 プロファージの構造解析を行った。得られた Stx2 ファージ、及び Stx2 プロファージの構造を比較したところ、2 つの血清群の EHEC が混合感染し、食中毒患者の腸管内で、Stx2 ファージの交差感染が起こっていたことが強く示唆された(綿引)。

また、分離菌株の特徴を俯瞰的かつ包括的にゲノムレベルで解明するため、本事例の富山の溶血性尿毒症症候群(HUS)患者由来分離菌株(EHEC 0111 110512 株)の完全長ゲノム配列決定、大規模比較ゲノム解析および本事例糞便検体を用いたメタゲノム解析を行った。

0111 110512 株のゲノム配列解析により、7 つの完全長 plasmid、染色体上の  $\lambda$  ファージ領域 3 箇所を除く配列を決定し、本菌のゲノム配列の全容をほぼ決定した。本菌の有する plasmid の特徴と、これまで報告されていた細菌学的薬剤耐性試験およびコリシン活性試験の結果が一致した。

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。次世代シーケンサーの網羅解読配列を用いてサンプル中の大腸菌各系統群の割合を算出する方法を考案し、本事例の糞便検体を用いたメタゲノム解析も行った。

本事例の全患者検体からは 0111 と 0157 の両方が分離されているが、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、血清学的解析の結果と一致した。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明確となった。

ゲノム生物学的解析、細菌学的解析および血清学的解析結果から、本事例は主に EHEC 0111 により発生した集団食中毒事例であることが強く示唆される。本事例が何故これまでの EHEC 感染症よりも重症化するかを完全に解明するまでには至っていないが、HUS 発症患者由来 non-0157 株の Stx2 prophage の特徴的な配列構造とそれに含まれる ORF が、高病原性に少なからず寄与していることが示唆され、今回の研究で重症化に関与する遺伝子の候補が抽出できたと考えられる。

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。これらは、基本的には 0157 EHEC と同様の病原性を有すると考えられ、行政的にも 0157 と同様に扱われるが、基礎的研究や分子疫学解析などの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が遅れている。本研究では、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し、そのゲノム情報基盤を整備することを目標とした。Shiga toxin (Stx) 産生株が存在することが最近明らかになった *Escherichia albertii* も解析対象に含めた。その結果、3種類の non-0157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の完全長ゲノム配列を決定し、基本的な情報解析 (アノテーション等) も終了した。また、O115:H10/H-を含めた4血清型の国内分離株・欧州分離株を収集し (それぞれ21~61株)、そのドラフトゲノム配列を取得し、各血清型の高精度系統解析を実施した。*E. albertii* に関しては、ヒトでの集団感染を起こしうる腸管病原体であることを明らかにするとともに、4株 (1株はStx2f産生株) の全ゲノム配列決定し、25株 (Stx2f産生株を1株含む) のドラフトゲノム配列を取得した。さらに、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。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。

林、黒田、大西らによって本研究班で蓄積したゲノム情報は完全長ゲノム配列7株 (EHEC 0121, 0145, 0165, *Escherichia albertii*) と、1610株のドラフトゲノム情報となる。EHEC に関しては EHEC 0111 を中心に1159株のドラフトゲノム情報を取得した。また、*E. albertii* に関して25株、*Vibrio cholerae* 426株となる。今後これらの菌株情報を血清群・菌種毎に解析し、公表する。*Vibrio cholerae* に関しては、宮崎大 井口らによって実施された O 抗原合成遺伝子群解析と同様に解析も進めて行く予定である。

#### 動物モデル構築

この研究では、EHEC 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するとともに、菌株間でのヒト白血球活性化能の違いを調べ、さらには重症化を起こす菌株の特徴と 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。以上から、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と考えられた。そこで、マウスにおいて大腸粘膜に炎症を惹起し、大腸に定着した EHEC

に酸化ストレスを与えることにより、病原性を評価できるのではないかと考え、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を認めた。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。本研究で検討した DSS 処理 EHEC 感染モデルマウスは、重症 EHEC 感染例に対する治療法の開発等において有用な研究ツールとなることが期待される。

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ファクターであると考えられる。今後、DSS の濃度調整により、マウス死亡率、Stx2 産生誘導性をコントロールできるようになれば、O157 のみならず、マウスでは病原性の評価が困難であった O111 血清型のような O157 以外の腸管出血性大腸菌の病原性の評価のための有用な動物モデルになると考えられる。

#### SubAB 産生 EHEC の病原機構の解析

Non-O157 型の腸管出血性大腸菌感染症における、Subtilase cytotoxin (SubAB) の病態における役割を理解するため、培養細胞を用い、SubAB に対する宿主応答機構の解析を行い、SubAB の細胞致死機構、取り込み機構の一端を明らかにした (千葉大 八尋)。

SubAB が宿主の自然免疫系において重要な役割を果たす NO の産生抑制能を有しているおり、菌の増殖充進に寄与していることを明らかにした。

本研究において、SubAB が宿主防御機構の攪乱を引き起こすことが明らかとなった。マクロファージから産生される NO は宿主の自然免疫系において強力な殺菌剤となることが知られている。SubAB 処理により NO の産生が転写レベルから抑制されることから、STEC の宿主免疫系からの回避、生存に重要な役割を果たしていると考えられる。

SubAB の取り込み機構の解析から SubAB はマクロピノサイトーシス様の、即ち、アクチン、lipid raft、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> membrane exchanger を介して細胞内に侵入し、細胞障害を引き起こすことが明らかとなった。この機構が、STEC 感染において障害を引き起こす組織 (腸管、腎臓) においても使用されているか不明で有ることから、今後、これらの組織に由来する細胞を用いて確認する必要があると考えられる。また、本取り込み機構が、Shiga toxin の取り込み機構とどのような関係にあるのか今後明らかにする必要があると考えられる。

#### 溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドラインの作成

五十嵐らにより、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し、EHEC や HUS に造詣の深い臨床家・研究者と、臨床治験の専門家からなる 14 名からなる研究班を組織された。さ

らに、学識研究者や患者さんの代表4名に外部評価委員（査読委員）として参画戴いた。

PubMed と医中誌をデータベースとして用い、1998年1月から2012年8月までに刊行された論文を、クリニカルクエスチョンに関連するキーワードを設定して検索した。HUS に関するエビデンスレベルの高い文献は少ないため、検索対象期間以外の文献やエビデンスレベルの低い論文でも、臨床上重要と考える文献を選択することとした。エビデンスレベル(レベル1-6)を基準とし、ステートメントとその推奨レベル(グレードA-D)を作成した。推奨グレードは、エビデンスレベルだけでなく、国内における診療状況も鑑みて決定した。

本ガイドラインでは、各章の冒頭にステートメントとその推奨グレードとを記載し、その後に解説の中で背景にあるエビデンスを記載するスタイルとした。なお、易学や診断の分野で治療分野の推奨グレードになじまないものや治療分野でも現時点で評価の定まっていないものについては、推奨グレードを該当せずとした。

班員によって作成された本ガイドライン(案)を外部評価委員(査読委員)4名から評価を戴いた。その後、日本小児科学会、日本腎臓学会、日本小児腎臓病学会のホームページ上で公開し、各学会員からパブリックコメントを戴いた。これらのコメントをガイドライン作成班員で協議し、適切に対応し、ガイドラインに盛り込んだ。

エビデンスに基づき、Minds のガイドライン作成基準を遵守した HUS 診断・治療

ガイドライン(日本語版、英語版)を作成した。日本語版は単行本(東京医学社)として刊行した。英語版は日本腎臓学会の機関誌である英文誌 Clinical Experimental Nephrology の2014年第4号に掲載した。

同ガイドライン作成にあたっては、日本小児科学会、日本腎臓学会、日本小児腎臓病学会のホームページに案を提示し、パブリックコメントを募り、各学会員の御意見を反映した。

作成した同ガイドラインは上記3学会の会委員向けホームページ(日本小児科学会 : [https://www.jpeds.or.jp/modules/members/index.php?content\\_id=36](https://www.jpeds.or.jp/modules/members/index.php?content_id=36)、日本腎臓学会 : [http://www.jsn.or.jp/topics/news/\\_2622.php](http://www.jsn.or.jp/topics/news/_2622.php)、日本小児腎臓病学会 : [http://www.jspn.jp/file/pdf/20140618\\_guideline.pdf](http://www.jspn.jp/file/pdf/20140618_guideline.pdf))に掲載すると共に、Minds のホームページ(Minds ガイドラインセンター : [http://minds.jcqhc.or.jp/n/medical\\_user\\_main.php](http://minds.jcqhc.or.jp/n/medical_user_main.php))にも掲載した。

さらに平成27年度には、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ため、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。その結果、2000年以降のSETC-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 ( $p=0.047$ )。

#### E.結論

エビデンスに基づいた Minds のガイドライン作成基準を遵守した HUS 診断・治療ガイドライン (日本語版、英語版) を作成した。今後、エビデンスの蓄積に従って、再評価を実施していくことが重要である。

腸管出血性大腸菌は多様な菌株集団であり、その病原性についても予想以上に多様であることが示唆された。情報の整理を実施するとともに、本研究で進めてきた検査法について、より簡便・迅速な試験法の改善開発、また、病原性評価のモデルシステムの開発が求められる。

#### 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, Tomioka 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 pub

lished online July 18, 2014.

2) 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.

3) Osawa K, Shigemura K, Iguchi A, Shirai H, Imayama T, Seto K, Raharjo D, Fujisawa M, Osawa R, Shirakawa T. Modulation of O-antigen chain length modulated by the *wzz* gene in *Escherichia coli* O157 influenced its sensitivities to serum complement. Microbiology and Immunology. 57: 616-623, 2013.

4) 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)

5) 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* (ETEC) clades with long-term global distribution. Nature Genetics 46:1321-1326 (2014)

6) 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-0157 from beef cattle in Japan. *Journal of Food Protection* 77:1269-1274 (2014)
- 7) Takami H, Taniguchi T, Moriya Y, Kuwahara T, Kanehisa M, Goto S. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. *BMC Genomics*, 13, 699, 2012
- 8) Wakimoto S, Nakayama-Imahiji H, Ichimura M, Morita H, Hirakawa H, Hayashi T, Yasutomo K, Kuwahara T. PhoB regulates the survival of *Bacteroides fragilis* in peritoneal abscesses. *PLoS One*, 8, e53829, 2013.
- 9) Md. R. Islam, Y. Ogura, Md. Asdulghani, T. Ooka, K. Murase, Y. Gotoh, T. Hayashi: A sensitive and simple plaque formation method for the Stx2 phage of *Escherichia coli* O157:H7, which does not form plaques in the standard plating procedure. *Plasmid* 67(3):227-235, 2012.
- 10) K. Murase, T. Ooka, A. Iguchi, Y. Ogura, K. Nakayama, Md. Asadulghani, Md. R. Islam, H. Hiyoshi, T. Kodama, L. Beutin, T. Hayashi: Hemolysin E- and enterohemolysin-derived hemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. *Microbiology* 158:746-758, 2012.
- 11) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, A. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A.T. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, T. Hayashi: Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.* 18(3):488-492, 2012.
- 12) 林哲也: 同じ病原菌種内での菌株の違いをゲノムからみる: 病原性大腸菌を例として. *Neuroinfection* 17(1):26-34, 2012.
- 13) 小椋義俊, 林哲也: 腸管出血性大腸菌における病原性のゲノム進化. *感染・炎症・免疫*. 42:182-195, 2012.
- 14) 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O111 の進化と病原性. *神経内科* 76(2):155-163, 2012.
- 15) T. Ooka, E. Tokuoka, M. Fukuhara, T. Nagamura, Y. Ogura, K. Aisawa, S. Harada, T. Hayashi: A human outbreak case associated with *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.* 19(1):144-146, 2013.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) A. Hinenoya, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Ooka, T. Hayashi, T. Ramamurthy, S. Faruque and S. Yasumasa: Molecular characterization of cytotoxic distending toxin gene-positive *Es*

- cherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. BMC Microbiology, 14: 97, 2014.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 勢戸和子: 0157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性. FFI ジャーナル, 2012, 217:67-75.
- 22) 勢戸和子, 伊豫田淳, 寺嶋淳: 腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断. 小児科臨床, 2012, 65: 2583-2587.
- 23) 五十嵐 隆: 小児腎疾患診療のポイント、腎臓内科レジデントマニュアル 改訂第6版、pp 449-471、診断と治療社、東京、2012
- 24) 五十嵐隆: 小中高生への感染症予防教育を充実して戴きたい. 学校保健研究 55: 91, 2013
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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)
- 28) Ohnishi K, Nakamura-Uchiyama F: Does levofloxacin induce hemolytic uremic syndrome in patients infected with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection? Jap J Infect Dis 65: 442-443, 2012
- 29) 大西健児: 腸管出血性大腸菌. pp 295-298. 最新・感染症治療指針 後藤元(監修), 医薬ジャーナル社 2012
- 30) 大西健児: 感染性胃腸炎, 食中毒. pp 1767-1769. 内科学 (門脇 孝, 永井良三), 西村書店 2012
- 31) 大西健児: 腸管出血性大腸菌起因性溶血性尿毒症症候群. 内科 109 (増大号): 1435-1436, 2012
- 32) 大西健児: 人畜共通感染症、小野寺昭一編、感染症内科学、pp89-93、丸善出版、東京、2014

- 33) 大西健児 : 腸管出血性大腸菌、後藤元編、最新・感染症治療指針、pp295-298、医薬ジャーナル、東京、2013
- 34) 大西健児 : 感染性腸炎. 感染症道場 2: 4-8, 2013 細田智弘、大西健児 : 腸管感染症・食中毒. 日本臨床新領域別症候群シリーズ 25: 311-316, 2013
- 35) 北山浩嗣、和田尚弘、山田昌由、鶴野裕一、深山雄大、上原正嗣 : 新生児、小児で行った PMX-DHP と CRRT 施行症例の %FO に関わる臨床的検討、エンドトキシン血症救命治療研究会誌 16 : 111-114、2012
- 36) 北山浩嗣、和田尚弘、山田昌由、鶴野裕一、深山雄大、坂本喜三郎、小野安生、大崎真樹 : ECMO 症例に対する急性血液浄化療法、日本小児腎不全学会雑誌 32 : 236、2012
- 37) 鶴野裕一、和田尚弘、北山浩嗣、山田昌由、深山雄大 : 多彩な経過をたどった atypical HUS の 1 例、日本小児腎不全学会雑誌 32: 286-288、2012
- 38) 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)
- 39) 芦田明、玉井浩 : 溶血性尿毒症症候群 (ベロ毒素関連) 腎と透析 72 増刊号 腎疾患治療マニュアル 2012-2013, pp315-318, 東京医学社、東京、2012
- 40) 芦田明、玉井浩 : 非典型的溶血性尿毒症症候群 (Atypical HUS). 腎臓 35: 39-44、2012
- 41) 芦田明、玉井浩 : HUS, TTP 非典型 HUS, TTP の治療 腎疾患治療のエビデンス第 2 版, pp168-171, 小林正貴、南学正臣、吉村吾志夫編、文光堂、東京、2012
- 42) 芦田明、玉井浩 : 溶血性尿毒症症候群. 日児誌 117: 1-10, 2013
- 43) Fan X, Yoshida Y, Honda S, Matsumoto M, Sawada Y, Hattori M, Hisanaga S, Hiwa R, Nakamura F, Tomomori M, Miyagawa S, Fujimaru R, Yamada H, Sawai T, Ikeda Y, Iwata N, Uemura O, Matsukura E, Aizawa Y, Harada H, Wada H, Ishikawa E, Ashida A, Nangaku M, Miyata T, Fujimura Y. Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. Mol Immunol 54: 238-246, 2013
- 44) 芦田明、玉井浩 : 溶血性尿毒症症候群. 日本小児科学会雑誌 117: 1-10, 2013
- 45) 芦田明、玉井浩 : 非定型的溶血性尿毒症症候群. 小児内科 45: 1075-1076, 2013
- 46) 芦田明、玉井浩 : 補体制御異常症と HUS. 腎と透析 74: 1098-1102, 2013
- 47) 芦田明、余田篤、白数明彦、井上敬介、中倉兵庫、松村英樹、玉井浩 : 腹部超音波検査にて EHEC 0157 感染症を疑い経過観察中に溶血性尿毒症症候群を発症した 1 男児例. 日本小児腎不全学会雑誌 33:193-195, 2013
- 48) 芦田明、吉田瑤子、範新萍、松本雅則、服部元史、宮田敏行、藤村吉博 : Atypical HUS における補体制御異常症診断システムの構築と腎移植. 日本臨床腎移植学会雑誌 1: 39-44, 2013
- 49) 芦田明、玉井浩 : エクリズマブ : aHUS. 腎と透析 76: 77-81, 2013 非典型溶血性尿毒症症候群診断基準作成委員会 (香美祥二、岡田浩一、要伸也、佐藤和一、南学正臣、安田隆、服部元史、芦田明、幡谷浩史、日高義彦、澤

- 井俊宏、藤丸季可、藤村吉博、吉田瑤子) : 非典型溶血性尿毒症症候群 診断基準、日本腎臓学会誌 55:91-93, 2013
- 50) 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
- 51) 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
- 52) 芦田 明、玉井 浩: エクリズマブ:aHUS. 腎と透析 76: 77-80, 2014
- 53) 芦田 明、玉井 浩: 典型的 HUS. 日本血栓止血学会雑誌 25: 706-712, 2014
- 54) 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
- 55) 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
- 56) 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, 2013
- 57) 香美祥二, 岡田浩一, 要 伸也, 佐藤和一, 南学 正臣, 安田 隆, 服部元史, 芦田 明, 幡谷浩史, 日高義彦, 澤井俊宏, 藤丸季可, 藤村吉博, 吉田瑤子: 非典型溶血性尿毒症症候群 診断基準、日本腎臓学会誌 55: 91-93, 2013
- 58) 要 伸也: 血液関連非典型的 HUS、腎と透析 74: 1131-1135, 2013
- 59) 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
- 60) 種市尋宙: 富山 EHEC/O111 アウトブレイクからみたりコンビナントトロンボモジュリン製剤における可能性 Tromb Med 2: 412-416, 2012
- 61) 種市尋宙: 血栓性微小血管症 (TMA:TTP/HUS)の最新知見:TMA と脳症の問題. 腎と透析 74: 1063-8, 2013
- 62) 種市尋宙: 血栓性微小血管症 (TMA:TTP/HUS)の最新知見: 国内事例. 腎と透析 74: 1087-90, 2013
- 63) 種市尋宙, 小西道雄, 五十嵐登, 金田 尚, 松倉裕喜, 小倉一将, 黒田文人, 谷内江昭宏, 宮脇利男: 富山を中心とした腸管出血性大腸菌 O111 集団感染. 日本小児科学会雑誌 117: 1409-15, 2013
- 64) 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
- 65) 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

66) 伊藤秀一、佐古まゆみ、斉藤真梨、佐藤 舞、藤丸拓也、小椋雅夫、亀井宏一：わが国の小児急性血液浄化療法の実態調査 日本小児腎不全学会雑誌 32: 231-232, 2012

67) 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

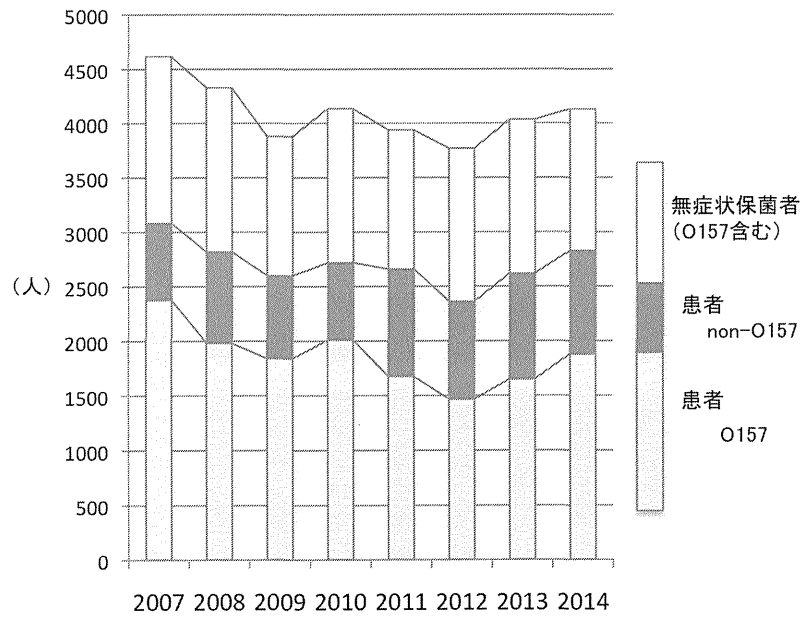
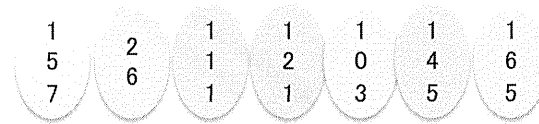
68) 伊藤秀一. 志賀毒産生性大腸菌によるHUSの治療; 日本腎臓病学会TTP/HUS/aHUS ; 56 (7) : 1075-81 日本腎臓病学会雑誌 2014

69) 伊藤秀一: 分子標的療法がもたらす腎臓疾患治療の未来. 日本小児腎臓病学会雑誌 2013 : 26 : 43-51

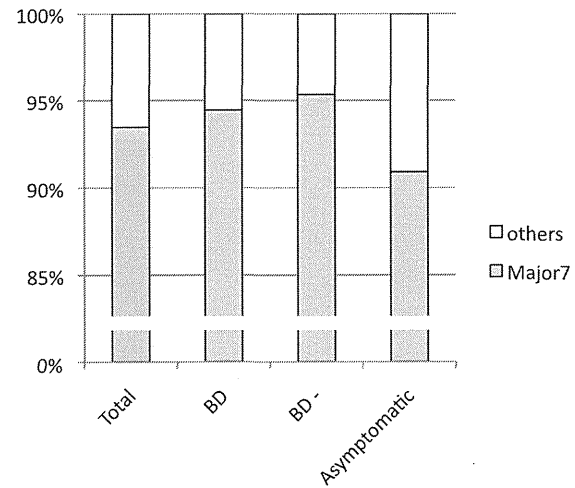
70) 齋藤昭彦 EHEC感染症の治療. 五十嵐隆 (総括) 溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドライン, 東京医学社, 東京, 2014, pp. 7-8.

—情報の整理— 主要血清群

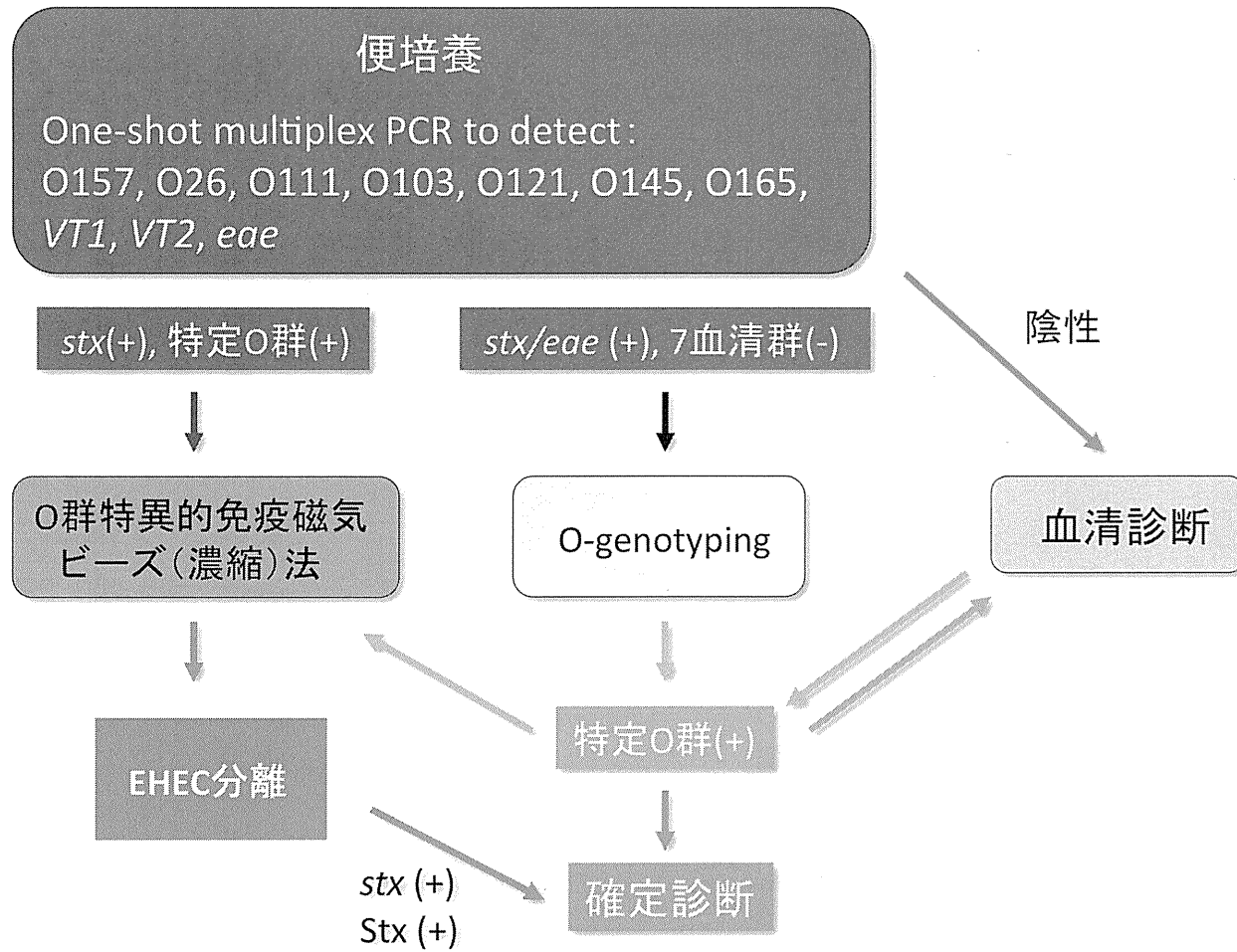
国内におけるEHEC主要血清群



2013 発生動向調査に基づいた主要血清群の占める割合

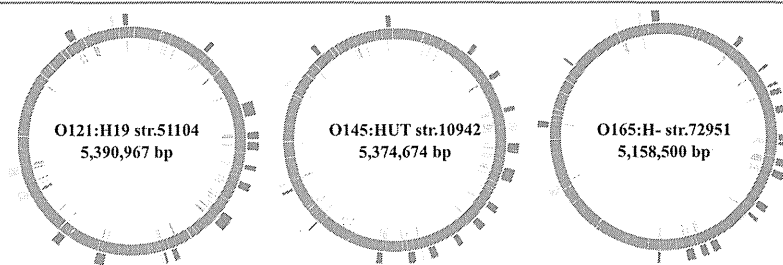


# EHEC分離されないHUS症例の解析



## ゲノム情報基盤の構築 (林、綿引、黒田、大西ら)

	O111	O121	O145	O165
完全長ゲノム配列決定	3 gaps <sup>2</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>	○ <sup>1</sup>
ゲノム多様性解析	978 <sup>3</sup>	61株 <sup>1</sup>	55株 <sup>1</sup>	41株 <sup>1</sup>



ドラフトゲノム取得済み。

CDs
  Prophages
  Integrative elements
  IS elements
 宮崎大 林ら

	完全長ゲノム配列決定	ゲノム多様性解析(ドラフトゲノム配列)
EHEC O115:H-/H10	-	2 1株 <sup>1</sup>
<i>Escherichia arbertii</i>	4 <sup>1</sup>	2 5株 <sup>1</sup>
<i>Vibrio cholerae</i>	-	4 2 6株 <sup>4</sup>

1; 宮崎大 林ら、2; 感染研 黒田ら、3; 感染研 大西、伊豫田、李、黒田ら、4; 感染研 大西、森田ら (JGRIDとの連携)