

【調査研究】

岡山県で分離された腸管出血性大腸菌の病原性に関する研究

Pathogenicity of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Okayama Prefecture

池田和美, 梶原知博, 河合央博

IKEDA Kazumi, KAJIHARA Tomohiro, KAWAI Hisahiro

要 旨

2014年1月から2023年12月までに収集した668株の県内の腸管出血性大腸菌(以下「EHEC」という。)感染症患者由来EHEC株について、病原性遺伝子の保有状況調査、ベロ毒素(以下「Stx」という。)サブタイプ解析及びクレード解析によるO157:H7株の進化系統群分類を行い、高病原性を有するEHEC株の検出状況を調査した。その結果、下痢原性大腸菌の毒素産生遺伝子である*astA*と*estA*を併せ持つハイブリッド型EHECが2株認められた。しかし、これらの株は無症状者から分離されており、重症化との関連は不明であった。一方で、Stxサブタイプ解析では*stx2a*保有EHEC株の重症化率が、進化系統群分類ではクレード8系統O157:H7株の重症化率がそれぞれ高かった。また、当県のクレード8系統O157:H7株によるEHEC事例を集計したところ、近年増加傾向にあることが明らかとなった。そのため、今後も当該系統株の継続的な監視が必要であると考えられた。

[キーワード：腸管出血性大腸菌, ベロ毒素サブタイプ, 病原性遺伝子]

[Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Shiga Toxin Subtype, Pathogenic Genes]

1 はじめに

腸管出血性大腸菌(以下「EHEC」という。)感染症は、ベロ毒素(以下「Stx」という。)を産生する大腸菌による、激しい腹痛、水溶性下痢、血便、嘔吐、発熱を主症状とする疾病である。重症化すると血小板減少、溶血性貧血、急性腎不全等の症状を示す溶血性尿毒症症候群(以下「HUS」という。)や脳症を発症し、死亡例も認められる。

EHEC感染症の重症化は、通常、高齢者や免疫力が低下した人に生じやすいとされているが、感染したEHECの菌株の性状も大きな要因となる。例えば、Stx2型のサブタイプの一つであるStx2aを産生する菌株は、重症化を引き起こしやすいことが報告されている¹⁾。また、O157:H7株では、Manningらの提唱する系統解析によるクレード分類で、クレード8系統に分類される菌株はHUS発症率が高いとされている^{2), 3)}。さらに、2011年にドイツを中心に欧州(EU)で発生した大規模集団食中毒では、3,842人ものが患者が発生し、855症例(22.3%)でHUSを発症したが、原因となったEHEC O104株は、腸管凝縮性大腸菌(以下「EAggEC」という。)の病原性遺伝子*aggR*を保有する、EHECとEAggECのハイブリッド型であったことが判明している⁴⁾。これらの事実は、EHEC感染症の重症化には様々な病原性因子が複合的に関与することを示唆している。

そこで我々は、EHEC感染症患者から分離された

EHEC株について、下痢原性に関与する病原性遺伝子の保有状況を調査するとともに、O157:H7株については系統分類によるクレード分類(以下「クレード解析」という。)を実施し、これらの結果を患者の症状等の疫学情報と合わせて解析した。その結果、若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株

2014年1月から2023年12月までの期間に県内のEHEC感染症患者から分離されたEHEC株668株を対象とした(表1)。

2.2 患者の疫学情報

患者の症状等の疫学情報は、感染症サーベイランスシステム(NESID)から収集、又は保健所から提供を受けた。

2.3 調査方法

2.3.1 病原性遺伝子の検出

下痢原性大腸菌の病原性に関与する遺伝子のうち、4種類の毒素産生遺伝子(*elt*, *estA1*, *estA2*及び*astA*)、1種類の腸管侵入性遺伝子(*invE*)及び3種類の付着遺伝子(*eae*, *aggR*及び*afaD*)を検出対象とした。*eae*の検出はOswaldらの方法⁵⁾に準拠し、PCR法により実施した。その他の遺伝子の検出は北橋らの方法⁶⁾に準拠し、マルチプレックスPCR法により実施した。

表1 調査対象株

O血清群	Stx型	株数	計
O157	1	15	441 (うちH7株:337)
	2	133	
	1&2	293	
O26	1	91	104
	2	10	
	1&2	3	
O103	1	26	30
	1&2	4	
O174	2	22	22
O111	1	15	20
	1&2	5	
O145	1	1	6
	2	5	
O121	1	1	6
	2	5	
O91	1	2	4
	2	1	
	1&2	1	
O8	2	3	3
O81	1&2	2	2
O109	2	2	2
O115	1	2	2
O128	1&2	2	2
O130	1	1	2
	2	1	
O156	1	2	2
O5	1&2	1	1
O22	2	1	1
O28ab	2	1	1
O55	1	1	1
O63	2	1	1
O77	2	1	1
O137	1	1	1
O146	1	1	1
O148	2	1	1
O152	1	1	1
O159	2	1	1
O165	2	1	1
O179	2	1	1
OUT	1	1	7
	2	6	
	計		668

2.3.2 Stx サブタイプ解析

Stx サブタイプ解析は、Scheutz らの方法⁷⁾に準拠し、

Stx 産生遺伝子(1型: *stx1*, 2型: *stx2*)のサブタイプを、*stx1* は3種類(*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*), *stx2* は7種類(*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*)に型別した。

2.2.3 O157: H7 株のクレード解析

O157:H7 株のクレード解析は、伊豫田らの方法³⁾に従い、Mismatch Amplification Mutation Assay(MAMA)-PCR法により実施し、「クレード8」と「その他のクレード」に分類した。

2.3.4 病原性の評価

患者症状のうち、「HUS又は急性腎不全(以下「HUS等」という。))を呈する場合」又は「EHEC 感染症の代表的な症状である水溶性下痢、腹痛、血便、発熱及び嘔吐のうち、4症状以上を呈する場合」(以下「4症状以上」という。)を「重症」と判定した。

2.3.5 県内の EHEC 事例発生状況調査

調査対象菌株のうち、*stx2a* 保有 EHEC 株及びクレード8系統 O157: H7 株について、菌株が分離された患者の疫学情報を基に、EHEC 事例の件数を集計した。

3 結果及び考察

3.1 病原性遺伝子の検出

病原性遺伝子の検出結果を表2に示す。全668株のうち631株から病原性遺伝子が検出され、その内訳は *eae* が612株(91.6%)と最も多く、次いで *astA* が29株(4.3%)、*estAI* が2株(0.3%)であり、他の病原性遺伝子は検出されなかった。*eae* は腸管上皮細胞への接着を媒介するタンパク質であるインチミンをコードする病原性遺伝子である。多くの EHEC が保有し、感染初期における下痢症発現に関与していることが知られているが⁸⁾、今回調査した菌株も90%以上の保有率であった。一方で、*astA* 及び *estAI* も、それぞれ2株及び29株と少数ながら検出された。これらの病原性遺伝子が検出されたO血清群の内訳と、分離された患者の症状を表3に示す。*astA* は、O174の18株、O26の6株、O109の2株、O22、O63及びO157の各1株から検出されたが、このうちO109の2株からは *estAI* も検出された。これらの菌株は、無症状の患者から分離されたものが多く、重症者からは分離されなかったことから、重症化との直接的な関与はないと考えられる。*astA* は、腸管凝集付着性大腸菌(以下「EAEC」という。)が産生するエンテロトキシン(EAEC heat stable toxin)をコードする遺伝子であり、典型的な EAEC は *aggR* と *astA* を保有しているが、*astA* のみを保有する大腸菌による集団下痢症事例が全国で報告されている⁹⁾。しかし、*astA* 保有大腸菌

表2 病原性遺伝子保有状況

O血清群	株数	病原性遺伝子							
		<i>eae</i>	<i>elt</i>	<i>estA1</i>	<i>estA2</i>	<i>invE</i>	<i>aggR</i>	<i>afaD</i>	<i>astA</i>
O157	441	441							1
O26	104	102							6
O103	30	30							
O174	22								18
O111	20	20							
O145	6	6							
O121	6	6							
O91	4								
O8	3								
O81	2								
O109	2	2		2					2
O115	2								
O128	2								
O130	2								
O156	2	2							
O5	1								
O22	1								1
O28ab	1								
O55	1								
O63	1	1							1
O77	1								
O137	1	1							
O146	1								
O148	1								
O152	1								
O159	1								
O165	1	1							
O179	1								
OUT	7								
計	668	612		2					29

表3 *astA* 保有株及び *estA1* 保有株と患者症状

O血清群	株数	病原性遺伝子		患者症状		
		<i>astA</i>	<i>estA1</i>	無症状	有症	重症
O174	18	18		16	2	
O26	6	6		2	4	
O109	2	2	2	2		
O157	1	1			1	
O22	1	1		1		
O63	1	1		1		
計	29	29	2	22	7	0

は健常者から分離されることも多く⁹⁾、下痢症への関与については未だ不明である。また、*astA* は一部の EHEC から検出されるが、これも症状への関与は不明である¹⁰⁾。一方、*estA1* は、毒素原性大腸菌 (ETEC) が産生する耐熱性エンテロトキシン (STp) をコードする遺伝子である。EHEC では、血便を呈する有症者から分離された EHEC O168 1 株から *astA* と *estA1* の両遺伝子が検出されたとする報告があるが¹⁾、重症化との関連は不明である。これらのことから、*astA* と *estA1* の症状への影響の程度を明らかにするためには、更なる情報の集積が必要と考える。

3.2 Stx サブタイプ解析

EHEC 株の Stx サブタイプ別に重症化率を調査した結果を表4に示す。重症化率が高かった Stx サブタイプは、「*stx2a* + *stx2c*」が 26.0 %、次いで「*stx1a* + *stx2a*」が 17.9 %、「*stx2a*」が 16.9 % であり、これらは、その他の Stx サブタイプの重症化率 (0.0 % ~ 8.9 %) とは大きな差が認められた。また、重症化の内訳「HUS 等」及び「4 症状以上」でそれぞれの重症化率を比較した場合も同様に、「*stx2a* + *stx2c*」、「*stx1a* + *stx2a*」及び「*stx2a*」の3つが上位を占めた。これらの株はいずれも *stx2a* を保有している点で共通していた。そこで、*stx2a* 保有株と非保有株 (*stx2a* 以外を保有する株) で重症化率を比較したところ (表5)、*stx2a* 保有株は 19.0 % と、非保有株の 6.2 % と比較して約3倍高かった。これらの結果は、重症化との関連性が高いとされる既報¹⁾を裏付けるものであった。

表4 Stx サブタイプ別重症化率

Stx型	Stxサブタイプ	株数	重症化 (%)	内訳*				
				HUS等 (%)	4症状以上 (%)			
Stx1	<i>stx1a</i>	160	11	6.9%	1	0.6%	10	6.3%
	<i>stx1c</i>	1	—	—	—	—	—	—
	<i>stx2a</i>	71	12	16.9%	2	2.8%	12	16.9%
	<i>stx2a+stx2c</i>	77	20	26.0%	3	3.9%	20	26.0%
	<i>stx2b</i>	1	—	—	—	—	—	—
	<i>stx2b+stx2c</i>	1	—	—	—	—	—	—
Stx2	<i>stx2c</i>	38	1	2.6%	0	0.0%	1	2.6%
	<i>stx2d</i>	2	—	—	—	—	—	—
	<i>stx2e</i>	3	—	—	—	—	—	—
	<i>stx2f</i>	1	—	—	—	—	—	—
	<i>stx2g</i>	1	0	0.0%	0	0.0%	—	—
	不明	1	—	—	—	—	—	—
	<i>stx1a+stx2a</i>	262	47	17.9%	4	1.5%	45	17.2%
Stx1&2	<i>stx1a+stx2c</i>	45	4	8.9%	0	0.0%	4	8.9%
	<i>stx1a+stx2d</i>	1	—	—	—	—	—	—
	<i>stx1c+stx2b</i>	3	—	—	—	—	—	—
計		668	95	14.2%	10	1.5%	92	13.8%

*内訳の件数は、「HUS等」と「4症状以上」で重複あり

表5 *stx2a* 保有株と非保有株の重症化率の比較

<i>stx2a</i> 保有状況	株数	重症化 (%)	内訳*				
			HUS等 (%)	4症状以上 (%)			
<i>stx2a</i> 保有株	410	78	19.0%	9	2.2%	77	18.8%
<i>stx2a</i> 非保有株	258	16	6.2%	1	0.4%	15	5.8%
計	668	94	14.1%	10	1.5%	92	13.8%

*内訳の件数は、「HUS等」と「4症状以上」で重複あり

3.3 O157 : H7 株のクレード解析

O157 : H7 株についてクレード8系統株とその他のクレード系統株に分類し、それぞれの重症化率を調査した結果を表6に示す。重症化率は、クレード8系統株が 21.4%、その他のクレード系統株が 16.4% であり、クレード8系統株の方が高かった。重症化の内訳で比較した場

表6 クレード8系統株とその他のクレード系統株の重症化率の比較

系統分類	株数	重症状 (%)	内訳*				
			HUS等 (%)	4症状以上 (%)	HUS等 (%)	4症状以上 (%)	
クレード8	98	21	21.4%	5	5.1%	21	21.4%
その他のクレード	281	46	16.4%	4	1.4%	45	16.0%
計	379	67	17.7%	9	2.4%	66	17.4%

*内訳は、「HUS等」と「4症状以上」で重複あり

合、「HUS等」ではクレード8系統株が5.1%と、その他のクレード系統株の1.4%と比較して3倍以上高かった。伊豫田らは、クレード8系統株は無症状病原体保有者由来株よりもHUS患者由来株の方が多いと報告しているが³⁾、今回の結果でもクレード8系統株は重症化率が高かった。

3.4 県内のEHEC事例発生状況

県内の *stx2a* 保有 EHEC 株及びクレード8系統 O157:H7 株による EHEC 事例の発生件数の推移を図1に示す。2014年～2023年で年別に発生件数を比較すると、*stx2a* 保有 EHEC 株による事例は、2020年が51件と突出して件数が多い年が見られたが、その他は20件から30件とおおむね同程度であった。一方、クレード8系統 O157:H7 株による事例数は、*stx2a* 保有 EHEC 株と比較して少なく、年によってばらついているものの、2021～2023年は10件以上と他の年よりも明らかに多く発生していた。このことから、クレード8系統 O157:H7 株の継続的な監視が必要であると考えられる。

謝 辞

本調査の実施に際して、菌株の分与に御協力いただきました関係機関の先生方に深謝いたします。

I *stx2a* 保有 EHEC 株

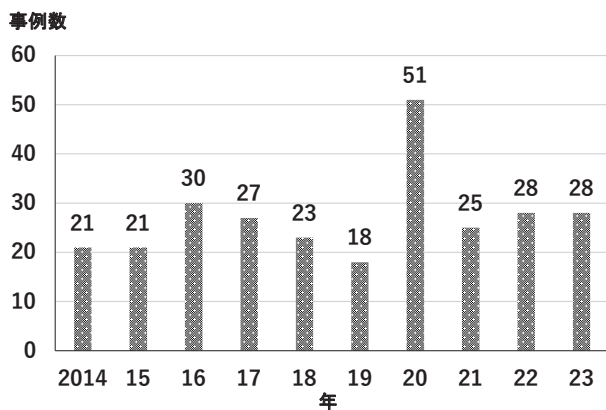
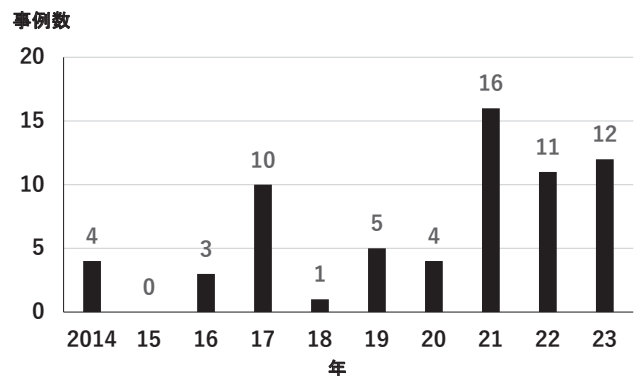


図1 *stx2a* 保有 EHEC 株、クレード8系統 O157:H7 株による EHEC 事例発生件数の推移

文 献

- 1) 齋藤悦子, 秋山由美, 荻田堅一, 坂野 桂, 二井洋子ら: 2012～2015年度に搬入された腸管出血性大腸菌のベロトキシンサブタイプと病原遺伝子及び細胞附着因子の保有状況について, 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 8, 1-6, 2017
- 2) Manning S D, Motiwala A S, Springman A C, Qi W, Lacher D W, Ouellette L M et al.: Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105 (12), 4868-4873, 2008
- 3) Iyoda S, Shannon D M, Seto K, Kimata K, Isobe J et al.: 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 Infect. Dis., 1 (2), 1-8, 2014
- 4) 大西 真, 伊豫田淳, 三戸部治郎, 寺嶋 淳: ドイツを中心とした EAgg-EHEC O104:H4 による大規模集団事例, IASR, 33, 131-132, 2012
- 5) Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O et al.: Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant, Infect. Immun., 68, 64-71, 2000
- 6) 北橋智子, 奥島祥美, 吉原純子, 木原顕子, 都竹豊

II クレード8系統O157:H7株



茂ら：保育所関係者を対象とした腸管出血性大腸菌 O128 のスクリーニングと分離－リアルタイム PCR と免疫ビーズを用いた EHEC O128 の検出法－，千葉市環境保健研究所年報，20，43-48，2013

- 7) Scheutz F, Teel L D, Beutin L, Piérard D, Buvens G et al. : Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature, J. Clin. Microbiol., 50(9), 2951-2963, 2012
- 8) 磯崎将博, 小林 治, 星子文香, 津嶋かおり, 金子優ら：下痢症患者から分離された下痢原性大腸菌の各種病原因子の保有状況について，日本臨床微生物学雑誌，26(1)，24-29，2016.
- 9) 東京都保健医療局：食品安全アーカイブズ 令和4年度 東京都の食中毒概要 *astA* 保有大腸菌について，https://www.hokeniryol.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/foods_archives/publications/summary/pdf/summary_r5/summary_r4-04.pdf (2025.6.27 アクセス)
- 10) 倉本早苗, 黒崎直子, 芹川俊彦：健常者から分離された腸管出血性大腸菌の菌学的特性，石川県保健環境センター研究報告書，39，1-7，2002