

京都府内で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 株の クレード解析に関する調査 II

浅井 紀夫 杉浦 伸明 真田 正稔 伊豫田 淳*

Surveillance of Genetic Clades of *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from People in Kyoto Prefecture (II).

Norio ASAI Nobuaki SUGIURA Masatoshi SANADA Sunao IYODA*

2006年から2011年までに京都府内で分離され、感染者の症状が把握された腸管出血性大腸菌 O157:H7 保存株のうち、発生事例ごとに1株を選択し、98株について MAMA-PCR法を用いたクレード解析を行った。感染すると溶血性尿毒症症候群 (HUS) 等の重篤症状を発症するおそれが高いと予測されているクレード8に属する株は1株であり、患者は HUS 等の重症状を呈していなかった。一方、クレード1、クレード2またはクレード3のいずれかに属する株が96株あり、HUSを発症した感染者の株3株が全てこのクレードに属していた。また、これら以外のクレードに属する株は1株であった。クレード8の株を IS-printing system 解析し、近畿府県で登録されている菌株と照合した結果、2002年大阪府、2007年和歌山県で発生した事例と同一パターンであった。これらはいずれもクレード8に属する株であったが、患者症状はそれぞれ無症状、血便程度であり、HUS等の重篤な症状を呈していなかった。

キーワード：腸管出血性大腸菌 O157、クレード解析、MAMA-PCR法、溶血性尿毒症症候群

key words：Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Genetic differentiation of clade, MAMA-PCR method, Hemolytic uremic syndrome

はじめに

前報¹⁾では1998年から2005年までに京都府内で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 菌株の解析を行い、クレード8に分類される菌株に感染した患者は、それ以外のクレードに分類される菌株に感染した場合より、重篤になりやすい傾向のあることを報告した。本報では引き続き2006年から2011年に京都府内で分離された O157:H7 株98株について MAMA-PCR²⁾法によるクレード解析を行った。2006年に米国で生食用ホウレンソウに関連した腸管出血性大腸菌 O157:H7 集団食中毒事例が発生し、溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症率が従来の集団発生事例と比較して高いことから、Manningら³⁾は96遺伝子の塩基配列に基づく DNA 型別解析を行い、過去に米国で発生したいずれの集団株とも異なる遺伝子系列クレード8に属することを見出し、クレード8に分類される株の流行について警鐘した。そこで、得られた結果を前報で報告した2005年までの解析結果と比較・検討し、クレード8に分類される株等の京都府における流行について考察した。また、IS-printing system に基づくパルスネット研究班のデータベースと照合させることにより近畿他府県における流行についても考察した。

材料と方法

1. 解析した O157 株

当所で卵培地上に冷蔵保存された腸管出血性大腸菌 O157:H7 株98株を用い、発生事例ごとに1株を選択した。選択方法および DNA の抽出方法は前報¹⁾にしたがった。

2. クレード解析

前報¹⁾にしたがって MAMA-PCR法を行った。

3. IS-printing system

前報⁴⁾にしたがって IS-printing system (version2) (TOYOBO) を用い試験を行った。

4. 感染者情報

感染者年齢および感染者症状については担当保健所から提供を受けた。

結果と考察

クレード解析の結果を事例発生年、事例発生地 (管轄拠点保健所名で表記)、感染者年齢、感染者症状および菌毒素型とともに表1に示す。クレード1、クレード2またはクレード3のいずれかに属する株 (以下「クレード1-3株」という。) は96株、クレード8に属する株 (以下「クレード8株」という。) は1株であり、その他のクレードに属する株 (以下「クレード4-7、9-12株」という。) は1株であった。

感染者症状と感染者数との関係および感染者年齢と感

(平成24年7月31日受理)

* 国立感染症研究所

* National Institute of Infectious Diseases

表 1. 事例情報、患者情報および分離された O157:H7 の毒素型別およびクレド解析結果

No	事例発生年	事例発生地 (管轄拠点保健所)	感染者年齢 (歳)	感染者症状	菌毒素型	クレド解析結果
1	2010	中丹西	31	下痢、血便	Stx2	8
2	2011	山城北	17	下痢、血便	Stx1+Stx2	4-7,9-12
3	2006	山城北	3	HUS	Stx1+Stx2	1-3
4	2006	山城北	4	HUS、麻痺、死亡	Stx1+Stx2	1-3
5	2006	山城北	2	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
6	2006	山城北	34	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
7	2006	山城北	32	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
8	2007	中丹西	58	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
9	2007	南丹	9	下痢、血便	Stx2	1-3
10	2007	南丹	58	下痢、血便	Stx2	1-3
11	2007	南丹	9	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
12	2007	南丹	4	下痢	Stx1+Stx2	1-3
13	2007	南丹	22	下痢、軽症	Stx1+Stx2	1-3
14	2007	南丹	9	下痢	Stx1+Stx2	1-3
15	2007	南丹	36	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
16	2007	南丹	7	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
17	2007	山城北	27	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
18	2007	山城北	2	下痢	Stx1+Stx2	1-3
19	2007	南丹	2	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
20	2007	山城北	66	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
21	2007	山城北	29	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
22	2007	山城北	72	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
23	2008	南丹	6	下痢	Stx1+Stx2	1-3
24	2008	南丹	6	下痢	Stx1+Stx2	1-3
25	2008	山城北	4	下痢	Stx1+Stx2	1-3
26	2008	山城北	22	無症状病原体保有者	Stx2	1-3
27	2008	山城北	18	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
28	2008	山城北	32	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
29	2008	山城北	73	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
30	2009	山城北	6	HUS	Stx1+Stx2	1-3
31	2009	山城北	28	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
32	2009	山城北	18	水様便	Stx1+Stx2	1-3
33	2009	山城北	38	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
34	2009	中丹西	10	下痢	Stx1+Stx2	1-3
35	2009	山城北	24	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
36	2009	山城北	62	水様便	Stx2	1-3
37	2009	山城北	9	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
38	2009	山城北	8	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
39	2009	南丹	3	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
40	2010	山城北	5	嘔吐	Stx2	1-3
41	2010	山城北	10	下痢	Stx1+Stx2	1-3
42	2010	南丹	28	下痢	Stx2	1-3
43	2010	山城北	67	無症状病原体保有者	Stx2	1-3
44	2010	中丹西	36	腹痛	Stx1+Stx2	1-3
45	2010	山城北	68	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
46	2010	山城北	5	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
47	2010	山城北	59	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
48	2010	南丹	4	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
49	2010	山城北	69	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
50	2010	山城北	61	下痢	Stx1+Stx2	1-3
51	2010	南丹	5	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
52	2010	中丹西	15	下痢	Stx1+Stx2	1-3
53	2010	中丹西	5	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
54	2010	山城北	22	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
55	2010	中丹西	41	下痢	Stx1+Stx2	1-3
56	2010	中丹西	26	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
57	2010	山城北	9	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
58	2010	中丹西	15	無症状病原体保有者	Stx1	1-3
59	2010	南丹	11	下痢	Stx1+Stx2	1-3
60	2010	中丹西	68	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
61	2010	山城北	2	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
62	2010	山城北	2	軟便	Stx1+Stx2	1-3
63	2010	中丹西	54	腹痛	Stx1+Stx2	1-3
64	2010	山城北	14	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
65	2010	山城北	25	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
66	2011	山城北	13	下痢、血便	Stx2	1-3
67	2011	南丹	65	下痢、血便	Stx2	1-3
68	2011	山城北	23	下痢、血便	Stx2	1-3
69	2011	山城北	39	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3

表 1. (続き)

No	事例発生年	事例発生地 (管轄拠点保健所)	感染者年齢 (歳)	感染者症状	菌毒素型	クレード解析結果
70	2011	山城北	28	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
71	2011	山城北	62	下痢	Stx1+Stx2	1-3
72	2011	山城北	62	下痢	Stx1+Stx2	1-3
73	2011	南丹	3	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
74	2011	南丹	9	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
75	2011	南丹	7	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
76	2011	南丹	0	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
77	2011	南丹	35	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
78	2011	中丹西	2	軟便	Stx1	1-3
79	2011	中丹西	4	下痢	Stx1	1-3
80	2011	中丹西	4	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
81	2011	中丹西	4	下痢	Stx1	1-3
82	2011	中丹西	5	下痢	Stx1+Stx2	1-3
83	2011	中丹西	4	下痢	Stx1+Stx2	1-3
84	2011	中丹西	7	下痢	Stx1	1-3
85	2011	山城北	43	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
86	2011	山城北	3	下痢、血便	Stx1	1-3
87	2011	山城北	3	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
88	2011	山城北	3	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3
89	2011	山城北	16	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
90	2011	山城北	11	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
91	2011	中丹西	1	下痢	Stx1	1-3
92	2011	中丹西	28	無症状病原体保有者	Stx1	1-3
93	2011	中丹西	25	無症状病原体保有者	Stx1	1-3
94	2011	中丹西	1	下痢	Stx1	1-3
95	2011	中丹西	3	無症状病原体保有者	Stx1	1-3
96	2011	南丹	7	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
97	2011	南丹	7	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
98	2011	南丹	42	無症状病原体保有者	Stx1+Stx2	1-3

感染者数との関係をクレード 1-3 株について図 1 に示す。感染者症状は無症状、下痢、血便および HUS の 4 段階に区分した。下痢は軟便、水様便、嘔吐等を含む。感染者年齢は病原微生物検出情報⁵⁾を参考に、0-4 歳、5-9 歳、10-14 歳、15-59 歳および 60 歳以上に区分した。

無症状 16 株および下痢が 30 株であり、無症状あるいは比較的軽症者と予想される感染者はクレード 1-3 株全体の 48 % を占めた。血便が 47 株で全体の 49 % となり HUS は 3 株であり 3 % であった。2005 年までは¹⁾無症状あるいは比較的軽症者と予想される感染者が 66 %、血便が 31 %、HUS は 3 % であり、HUS 等の重篤な症状の割合は同様であったが、血便の割合が増え若干患者の症状は重くなった傾向が見られた。また、HUS 発症者は 3 歳、4 歳、6 歳であり、古宮ら⁶⁾の報告と同じく幼児により重

篤な症状が見られた。

一方、クレード 8 株の患者は HUS を呈しておらず、一緒に焼き肉を喫食した 20 名のうち、他に症状のあった患者の 2 名はいずれも軟便のため医療機関の受診もなかった。

毒素産生性についてはクレード 8 株については Stx2 単独産生株、クレード 4,7,9,12 株については Stx1 + Stx2 産生株であった。

クレード 1-3 株では Stx1 + Stx2 産生株が 75 株 (79%)、Stx2 単独産生株が 10 株 (10%) また、Stx1 単独産生株は 11 株 (11%) であった。2005 年までの株ではそれぞれ 78%、22%、0% であった。Boerlin ら⁷⁾は感染者の重症化には Stx2 が大きな要素の一つであることを報告している。Stx2 単独株では 10 株中 5 株が血便であった。2005 年までの Stx2 単独株では血便は 16 株中 4 株であり 2006 年以降の方が重い症状の割合が高かった。また、Stx1 + Stx2 株については 2005 年までは下痢あるいは無症状が 63%、血便が 35%、HUS が 2% であるのに対し 2006 年以降は下痢あるいは無症状が 41%、血便が 55%、HUS が 4% と 2006 年以降の方が若干重い症状であった。これらから、Stx2 の毒性が変化した可能性も含めて、今後さらに検討することが必要である。

厚生労働科学研究費補助金事業、新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業において勢戸らの近畿ブロック研究班 (パルスネット研究班)⁸⁾では、腸管出血性大腸菌 O157 の疫学調査のため、近年の株を中心に IS-printing system による解析を行い、データの蓄積を行っ

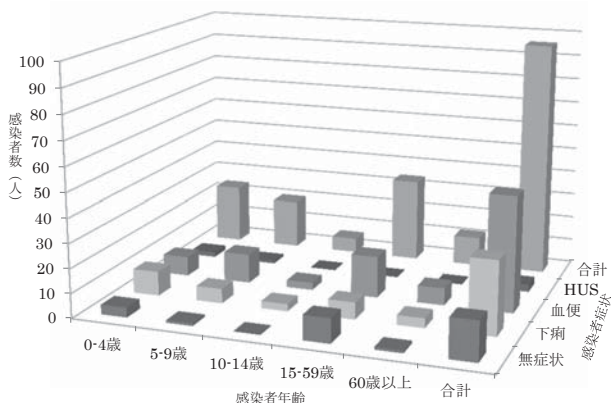


図 1. クレード 1-3 株における感染者症状と感染者数との関係および感染者年齢と感染者数との関係

ているデータベース(以下「近畿ISデータベース」という。)と照合することにより、近畿各府県での流行株等の調査が可能である。そこで、クレード8に属したNo.1の株についてIS-printing systemによる解析を行い近畿ISデータベースと照合した。IS-printing system結果は1st setが110000101001101111であり、2nd setが011100100010001010であった。同じパターンを示した株による事例は2002年に大阪で発生したもの、および2007年に和歌山で発生したものが検索され、いずれもクレード8に属する株であった。しかし、大阪府の例では感染者は無症状病原体保有者であり偶然見つかったものであった。和歌山市の例も血便は呈していたもののHUS等の症状はなかった。20名程度で焼き肉を喫食したが菌検出は当該患者1名だけであった。いずれの事例にせよ関連した重篤患者はなかった。さらに、IS-printing systemにおいて36か所の挿入因子うち1か所、2か所、3か所、4か所および5か所が異なったパターンを示す事例を照合した。それぞれ、26例、16例、16例、3例および55例が検索された。挿入因子が4か所異なったパターンの株までは全てクレード8に属する株であった。IS-printing systemにおいては完全にパターンが一致するもの以外は議論されておらず⁷⁾、関連性については不明な点も多いが、これらの菌株間では遺伝学的に近い可能性も予想される。

同様の手法で、前報¹⁾においてクレード8に属することのわかった菌株のIS-printing system解析を行い、これを近畿ISデータベースと照合した。前報での菌株No.、IS-printing system結果および検索した事例数を表2に示す。検索した事例数はIS-printing systemの挿入因子が完全に一致するものから最大5か所異なるものまでの累積総計としたが全ての株において全く検索されなかった。近畿ISデータベースには1984年から2012年まで1590例が登録されているが、2006年までの登録は126例に留まり、大半が2007年以降の株である(2012年6月15日現在)。変異等の影響もあり、年代の大きく異なる菌株間の照合については有用でないと推測される。一方、リアルタイムでの流行株の情報については把握しやすく、IS-printing system およびMAMA-PCR法は通常のサーマルサイクラーによる実施が可能で、PCR反応時間もそれぞれ約1.5時間であることから、IS-printing system解析とクレード解析を行うことにより、迅速な感染拡大防止対策に利用できると期待される。

本報において解析されたクレード8株は1株であり全

株数の1%であった。一方、2005年までは9%であり¹⁾、2001年からほぼ毎年クレード8株が分離されていた。したがって、2006年以降、京都府ではクレード8株の流行がなくなった可能性も予想できる。しかし、勢戸ら⁷⁾によると近畿ISデータベースへ登録されているクレード8株の割合は8%でありほぼ平均して近畿各府県に流行している(2012年2月3日現在)。経済圏を同じくする京都府だけが異なった流行を見せたとは考えがたい。厚生労働省の運営する感染症サーベイランスシステム(NESID)に登録され菌分離された2006年以降の京都府内の腸管出血性大腸菌O157株212株中、当所に搬入されたのは130株であった。HUS等の重症は6例あり、当所には3株の搬入であった。2008年は42株中7株しか回収できなかった。2004年以降京都府は拠点保健所において食中毒・感染症事例に係る検査を実施する体制を確立してきた。そのため、検体搬入や情報伝達の経路が複雑となり検体収集の点では問題が見られた。そこで、2011年は積極的な検体回収を心がけたところ44株中34株回収できた。今後、これらの点も踏まえて解析方法の検討を行いたい。

謝辞

本研究にあたり感染者情報を提供していただいた大阪府立公衆衛生研究所勢戸和子氏、和歌山市衛生研究所金澤祐子氏はじめパルスネット研究班の皆様、および丹後保健所中村清康氏はじめ京都府保健所関係者皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 浅井紀夫, 中嶋智子, 杉浦伸明, 柳瀬杉夫, 伊豫田淳. 2011. 京都府内で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 株のクレード解析に関する調査. 京都府保健環境研究所年報, 56, 18-21.
- 2) 伊豫田淳, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 渡邊治雄. 2009. 日本国内における腸管出血性大腸菌感染症の現況と分離株の性状. 獣医畜産新報, 62, 801-806.
- 3) Manning D.S., Motiwala S.A., Springman C.A., Qi W., Lacher W. D., Ouellette M.L., Mladonicky M.J., Somsel P., Rudrik T. J., Dietrich E.S., Zhang W., Swaminathan B., Alland D., and Whittam S.T. 2008. Variation in virulence among clades of Escherichia coli O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 4868-4873.
- 4) 浅井紀夫, 中嶋智子, 柳瀬杉夫, 三谷亜里子, 河村絵美, 小嶋新也. 2010. 京都府内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例のIS-printing system およびパルスフィールドゲル電気泳

表2. 1998～2005年までのクレード8株のIS-printing system解析結果と近畿ISデータベースからの照合結果

前報 ¹⁾ でのNo	IS-printing system 1st set	IS-printing system 2nd set	挿入因子1～5か所異なったパターンでの検索事例数
69	010101100101000011	010100010001001110	0
70	010101100001100011	010101110000001011	0
71	010101100101100111	010101100001001010	0
72	010101100101100111	010101100001001010	0
73	010101100101000011	010100010001001111	0
74	000111001111001001	111101111001000110	0
75	000111101111001111	011101110001001110	0

- 動法を用いた疫学解析分布. 京都府保健環境研究所年報, 55, 18-21.
- 5) 寺嶋淳, 伊豫田淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎, 石原朋子, 大西真. 2011. <特集>腸管出血性大腸菌感染症 2011年4月現在. 病原微生物検出情報(月報) 32, 125-126.
- 6) 古宮伸洋, 古宮伸洋, 富岡鉄平, 齊藤剛仁, 島田智恵, 砂川富正, 多田有希. 2010. 感染症発生動向調査からみた腸管出血性大腸菌感染症における溶血性尿毒症症候群、2009年. 病原微生物検出情報(月報) 31, 170-172.
- 7) Boerlin P., McEwen A.S., Boerlin-Petzold F., Wilson B. J., Johnson P. R., and Gyles L. C. 1999. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 37,497-503.
- 8) 勢戸和子, 河野智美, 福島敬介, 浅井紀夫, 杉浦伸明, 木澤正人, 小笠原準, 中村寛海, 下迫純子, 齋藤悦子, 濱夏樹, 宮本園子, 川西伸也, 田辺純子, 金澤祐子, 田口真澄, 河原隆二, 原田哲也, 神吉政史. 2012. 近畿ブロックにおける腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学手法に関する研究. 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究, 平成23年度総括・分担研究報告書及び平成21~23年度総合研究報告書(厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業). pp67-86.