

称号及び氏名	博士(獣医学) 勢戸 和子
学位授与の日付	平成19年9月30日
論文名	「O157 以外の血清型による志賀毒素産生性大腸菌感染症の疫学と分離菌株の性状」
論文審査委員	主査 小崎 俊司 副査 馬場 栄一郎 副査 山崎 伸二

## 論文要旨

### 緒言

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は下痢原性大腸菌の一つで、特に先進国において重要な腸管感染症原因菌である。STEC 感染症は、少量の菌数で感染するため二次感染が容易に成立し、重症例では意識障害や溶血性尿毒症候群 (HUS) など多彩な合併症を引き起こす。わが国では、1984 年に大阪府で O157 の兄弟感染事例が確認されて以来、散発的に発生していた。1990 年に埼玉県の子園集団事例で園児が死亡したことから注目を集め、1996 年の集団事例の多発を契機に、本症の患者および無症状保菌者は届出が必要な全数把握疾患となった。届出数は、2001 年の 4,336 人をピークにやや減少傾向にあるものの、依然として毎年 3,000 人以上が報告されている。STEC の代表的な血清群である O157 については臨床症状や菌株の特徴が多数報告されているが、その他の血清群については、詳細な検討は少ない。O26 はラムノース陰性であることを利用した分離培地が普及しつつあるが、その他の血清群では O157 で行われているような効率的な検査が確立されていないのが現状である。

本研究では、大阪府における過去 11 年間の O157 以外の血清群 (non-O157) STEC 感染症の疫学と分離菌株の細菌学的特徴について詳細に検討を行い、non-O157 STEC の病原

性を考察するとともに、現行の検査方法の問題点を明らかにし、その対策を検討することを目的とした。

## 第1章 志賀毒素産生性大腸菌血清群 O26 による感染症の疫学解析と分離株の薬剤耐性— 血清群 O157 との比較

大阪府内で 1996 年 1 月から 2006 年 12 月の 11 年間に 1,083 事例のべ 1,678 人の STEC 感染症が発生した。分離菌の血清群は O157 1,493 人、non-O157 185 人で、non-O157 で最も多い O26 は、保育園での集団事例 4 例を含む 49 事例 135 人の届け出があった。O26 および O157 感染者の年齢を比較したところ、O26 では 77%が 15 歳以下で、小児科で診断されることの多い感染症であると考えられた。一方、O157 は 47.2%で、特に散发事例では 16 歳以上が 58.6%を占めていた。これは、生レバーやユッケを嗜好する年齢層や、食品従事者などの保菌者検便で O157 のみを対象として検査することが多い結果を反映していると推察された。臨床症状の明らかな O26 感染者 131 人と O157 感染者 1,273 人について、血清群による各症状の有症率は腹痛 31.3%、下痢 64.1%、血便 19.1%で、O157 の 56.8%、69.6%、41.9%に比べ有意に低率であった。また、O157 は 40 人 (3.1%) が HUS と報告されたが、O26 では合併症の発症はなかった。しかし、4 つの O26 保育園事例で、菌分離陽性者の 16.7%~33.3%は園児の家族であり、O157 の保育園事例の 16.7~50%と比較しても二次感染のリスクは同程度であると考えられた。

*Salmonella* や *Campylobacter* で問題になっている薬剤耐性について、STEC の傾向を調べるため、アンピシリン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、カナマイシン、ゲンタマイシン、ST 合剤、セフトキシム、シプロフロキサシン、オフロキサシン、ナリジクス酸、ホスホマイシン (FOM) の 12 種類の薬剤について、ディスク法で薬剤感受性試験を実施した。O26 では、FOM の阻止円内にサテライトコロニーが発育し、判定が困難であったため、ホスホマイシン MIC 測定委員会の示した平板希釈法で追試を行った。ディスク法で FOM 耐性と判定された 65 株のうち MIC 25 µg/ml 以上を示した株は 2 株のみであったが、O26 の薬剤耐性率は 36.7%と O157 に比べて高く、4 剤耐性菌も 3 株分離された。O26 は多剤耐性菌による集団感染や expanded spectrum β-lactamase (ESBL) 産生菌が報告されており、小児の STEC 感染症の治療に欠かせない FOM についても耐性菌の出現を監視する必要があると考えられた。

## 第2章 血清群 O157 および O26 以外の志賀毒素産生性大腸菌による感染症の疫学解析と 分離株の細菌学的特徴

前章の調査対象者から分離された STEC のうち O157 および O26 以外の血清群 (minor

serogroup) は、O28、O63、O65、O91、O103、O111、O119、O121、O126、O165、O177 の 11 タイプで、O 型別不能 (OUT) 4 株を併せ 50 株について細菌学的特徴を検討した。鞭毛抗原 (H 抗原) は、凝集反応と鞭毛遺伝子の PCR 制限酵素切断パターン解析 (PCR-RFLP) で型別を行った。HUS 患者 5 人の分離株は、O111:[H8]、O165:[HUT] (2 株)、O177:[HUT]、OUT:[HUT] で、下痢患者由来株を含めた O165:[HUT] (5 株)、O177:[HUT]、OUT:[HUT] は同一の PCR-RFLP パターンを示した。

大腸菌の同定に必要な性状とブドウ糖を含む 14 種類の糖分解について調べた。最も非典型的な性状を示したのは O165:[HUT] と O177:[HUT]、OUT:[HUT] で、リジン脱炭酸酵素 (LDC) 反応とブドウ糖からのガス産生が陰性を示した。その他、O111:[H8] および O119:[H25]、OUT:H25 が LDC 陰性を示し、O65:HNM はブドウ糖からのガス産生が陰性であった。鑑別性状として利用可能な糖の分解能については、4 血清型でラムノース陰性を 5 血清型でソルビット陰性を示した。O157 では陰性である  $\beta$ -グルクロニダーゼは、O111:[H8] と O65:HNM で 2 日目に陽性になったが、他の株では 1 日で陽性を示した。O157 の培養検査では、MacConkey-Sorbitol 寒天培地 (SMAC) に選択剤としてセフィキシム (最終濃度 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と亜テルル酸カリウム (PT、同 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えて使用するが、HUS 患者由来株を含む 7 血清型 11 株は PT の MIC が 1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下を示し、選択剤を加えた SMAC (CT-SMAC) では検出できないと考えられた。ラテックス凝集反応 (RPLA) 法による志賀毒素 (Stx) 型別に加え、Lin らのプライマーを用いた PCR-RFLP で Stx 遺伝子 (*stx*) の genetic variant を調べた結果、Stx2 陽性の O28:H20 (1 株) と O165:[HUT] (2 株) は *stx2* に加え *stx2c* 陽性であり、O63:H6 は *stx2f* 陽性株であることがわかった。多くの STEC は intimin を介して腸管上皮細胞へ付着するが、minor serogroup でも 44 株 (88%) は intimin 遺伝子 (*eae*) 陽性で、*eae* $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$  に型別された。最も多い型は *eae* $\epsilon$  で、O63:H6 は STEC には稀な *eae* $\alpha$  であった。STEC のスクリーニング法として洗浄羊赤血球を使ったエンテロヘモリジン寒天培地が有用であると報告されているが、HUS 患者から分離された株を含む 7 血清型 14 株で溶血活性を示さなかった。エンテロヘモリジン遺伝子の保有と重症化の関連性に否定的な報告もあり、minor serogroup STEC が疑われる症例では、本培地によるスクリーニングは適当ではないと考えられた。

O157 では菌株の異同を判断するため PFGE パターンが疫学指標として用いられることから、複数の事例が発生した血清型では PFGE を実施しデンドログラムを作成した。minor serogroup でも家族事例由来株では 96~100% と高い近似度を示すことが確認され、O65:HNM では、2 家族の共通の喫食場所である焼肉店が感染源であることが裏付けられた。

### 第3章 志賀毒素検出方法の比較

大腸菌からの Stx 検出について、従来法である RPLA 法と近年開発されたイムノクロマト (IC) 法を比較した。IC 法には、キャピリア VT (以下キャピリア) とデュオパス・ベロトキシン (以下デュオパス) を使用した。キャピリアは STEC 59 株中 57 株で、デュオパスは STEC 66 株中 61 株で、RPLA 法と一致した結果が得られた。いずれの試薬でも RPLA 法陽性で IC 法陰性を示した株は、*stx2* variant 株であり、試薬によって *stx2* variant 株の Stx 検出能が異なっていた。特に *stx2c* 陽性 O157 15 株について陽性と判定されたのは、デュオパスは 12 株、キャピリアでは 5 株であった。また、IC 法で陽性と判定されるには、毒素型にかかわらず RPLA 力価 16 倍以上が必要であった。一方、分離平板上の典型的なコロニーから調整した被検液では、IC 法で分離株と一致した成績が得られ、分離平板からのスクリーニングが可能であると考えられた。

#### 総括

大阪府内における non-O157 STEC 感染症の多くは O26 によるもので、その臨床症状は O157 に比べ軽症である傾向が見られたが、二次感染の発生は O157 と同等で、むしろ、症状が軽微な患者が、罹患していることを気づかないまま自らが感染源となっている可能性が強く示唆された。

STEC 検査法は O157 や O26 の検出を中心に開発されてきたが、minor serogroup STEC は多様な性状を示すため見逃される可能性がある。特に HUS 患者から分離された O111:[H8]、O165:[HUT]、O177:[HUT]、OUT:[HUT]は大腸菌として非典型的な性状が多く、CT-SMAC に発育できない上、エンテロヘモリジン培地で溶血活性を示さなかった。また、STEC として報告された O 血清群は 130 以上あるにも関わらず、国産の市販血清では 50 タイプしか型別できない。したがって、選択剤を加えない SMAC や一般的な大腸菌分離培地である DHL を併用し、血清型別ではなく志賀毒素 (Stx) あるいは志賀毒素遺伝子 (*stx*) でスクリーニングすることが必要である。Stx の簡便で迅速な検出法として、イムノクロマト法が有用であると考えられた。

## 審査結果の要旨

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は下痢原性大腸菌の一つで、特に先進国において重要な腸管感染症原因菌である。STEC 感染症は、少量の菌数で感染するため二次感染が容易に成立し、重症例では意識障害や溶血性尿毒症症候群 (HUS) など多彩な合併症を引き起こす。

わが国では、1984年に大阪府で感染事例が確認されて以来、散発的に発生していた。1990年に埼玉県の子園園集団事例で園児が死亡したことから注目を集め、1996年の集団事例の多発を契機に、本症の患者および無症状保菌者は届出が必要な全数把握疾患となった。届出数は、最近やや減少傾向にあるものの、毎年3,000名以上が報告されている。STECの代表的な血清群であるO157については臨床症状や菌株の特徴が多数報告されているが、その他の血清群については、詳細な検討は少ない。O26は糖分解性を利用した分離培地が普及しているが、その他の血清群では効率的な検査が確立されていないのが現状である。本研究では、大阪府における過去11年間のO157以外の血清群(non-O157) STEC感染症の疫学と分離菌株の細菌学的特徴について詳細に検討を行い、non-O157 STECの病原性を考察するとともに、現行の検査方法の問題点を明らかにし、その対策を検討することを目的としている。

第1章では、志賀毒素産生性大腸菌血清群O26による感染症の疫学解析と分離株の薬剤耐性について血清群O157との比較をおこなった。大阪府内で1996年1月から2006年12月の11年間に分離された菌の血清群はO157 1,493人、non-O157 185人で、non-O157で最も多いO26は、保育園での集団事例4例を含む49事例135人の届け出があった。O26では77%が15歳以下で、小児科で診断されることの多い感染症であることを明らかにした。一方、O157は47.2%で、特に散発事例では16歳以上が58.6%を占めていた。これは、生レバーやユッケを嗜好する年齢層や、食品従事者などの保菌者検便でO157のみを対象として検査することが多い結果を反映していると推察された。O26保育園事例で、菌分離陽性者の16.7%~33.3%は園児の家族であり、O157の16.7~50%と比較しても二次感染のリスクは同程度であると考えられた。薬剤耐性については、12種類の薬剤について、ディスク法で薬剤感受性試験を実施し、O26の薬剤耐性率は36.7%とO157に比べて高く、4剤耐性菌も3株分離された。O26は多剤耐性菌による集団感染やexpanded spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生菌が報告されており、小児のSTEC感染症の治療に欠かせない抗生剤に対する耐性菌出現の監視対策の必要性を示した。

第2章では、調査対象者から分離されたSTECのうちO157およびO26以外の血清群(minor serogroup)は、O28、O63、O65、O91、O103、O111、O119、O121、O126、O165、O177の11タイプで、O型別不能(OUT)3株を併せ50株について細菌学的特徴を明らかにした。鞭毛抗原(H抗原)は、凝集反応と鞭毛遺伝子のPCR制限酵素切断パターン解析(PCR-RFLP)で型別を行った。HUS患者5人の分離株は、O111:[H8]、O165:[HUT](2株)、O177:[HUT]、OUT:[HUT]で、下痢患者由来株を含めたO165:[HUT](5株)、

O177:[HUT]、OUT:[HUT]は同一のPCR-RFLPパターンを示した。多くのSTECはintiminを介して腸管上皮細胞へ付着するが、minor serogroupでも44株(88%)はintimin遺伝子陽性で、intimin  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ に型別された。最も多い型はintimin  $\epsilon$ であることを明らかにした。

第3章では、志賀毒素検出方法としてRPLA法と近年開発されたイムノクロマト(IC)法を比較した。IC法には、キャピリアVT(以下キャピリア)とデュオパス・ベロトキシン(以下デュオパス)を使用した。キャピリアはSTEC 59株中57株で、デュオパスはSTEC 66株中61株で、RPLA法と一致した結果が得られた。いずれの試薬でもRPLA法陽性でIC法陰性を示した株は、*stx2* variant株であり、試薬によって*stx2* variant株のStx検出能が異なっていた。特に*stx2c*陽性O157 15株について陽性と判定されたのは、デュオパスは12株、キャピリアでは5株であった。また、IC法で陽性と判定されるには、毒素型にかかわらずRPLA力価16倍以上が必要であった。一方、分離平板上の典型的なコロニーから調整した被検液では、IC法で分離株と一致した成績が得られ、分離平板から直接スクリーニングが可能であることを示した。

以上の結果は、non-O157 STEC感染症に関与する志賀毒素産生性大腸菌の性状を詳細に調べた初めての知見であり、今後の防疫対策を実施する上で有益な情報を提供していることから、感染症制御学領域に寄与することが大きい。したがって、本論文の審査および最終試験の結果とあわせて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。