

# 福井県における腸管出血性大腸菌分離株の Stx サブタイピング解析

横山 孝治・児玉 佳・岩崎 理美・永田 暁洋・東方 美保

Stx analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Fukui Prefecture

Koji YOKOYAMA, Kei KODAMA, Satomi IWASAKI, Akihiro NAGATA, Miho TOHO

## 1. はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症は志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) を産生、または保有する EHEC の感染によって起こる全身性疾患である。感染症法に基づく 3 類感染症に指定され、診断した医師は、全数届出することが義務付けられている。無症状の場合もあるが、主に腹痛、水様性下痢や嘔吐の症状がみられ、重症の場合には血便やけいれん、脳症、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) を引き起こす。HUS は、死亡あるいは腎機能障害や神経学的障害などの後遺症を残す可能性がある<sup>1)</sup>。

Stx 遺伝子は *stx1* と *stx2* に大別され、更に *stx1* は *stx1a*、*stx1c* および *stx1d* の 3 種類、*stx2* は *stx2a*、*stx2b*、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f* および *stx2g* の 7 種類のサブタイプがある。これらサブタイプによっては、医療機関で実施されるイムノクロマト法や RPLA 法では検出できない場合がある<sup>2)</sup>。また、*stx2* は *stx1* よりも重症化との関連性が高く、特に *stx2a* および *stx2c* はより重症化した患者から分離されるという報告がなされている<sup>3),4)</sup>。

今回、Stx サブタイプ PCR 法を導入し、福井県で検出された腸管出血性大腸菌株について Stx サブタイピング解析を行ったので報告する。

## 2. 方法

### 2. 1 検査材料

平成 24 年から令和元年までに福井県内で届出された腸管出血性大腸菌 計 143 株を用いた。内訳は、平成 24 年 11 株、平成 25 年 17 株、平成 26 年 20 株、平成 27 年 14 株、平成 28 年 19 株、平成 29 年 20 株、平成 30 年 22 株、平成 31 年および令和元年は計 20 株であった。なお、菌株は MLVA (反復配列多型解析) 法や PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動) 法の結果および疫学的情報 (家族や集団事例など) を参考に選定した株を検査対象とした。

### 2. 2 Stx 遺伝子のサブタイピング PCR

核酸抽出はアルカリ熱抽出法をもとに行った。菌株を Tryptic Soy Broth (BD) に接種し、18~20 時間培養した後、滅菌生理食塩水で 20 倍希釈し、1.5mL チューブに 100 $\mu$ L を分取した。12,000rpm で 10 分遠心分離後、上清を捨て、50mM NaOH 85 $\mu$ L を加え沈渣を溶解し、100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。1M Tris-HCl 15 $\mu$ L を加え中和した後、12,000rpm で 3 分間遠心し上清をテンプレートとして使用した。

PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C 5 分の後に、94 $^{\circ}$ C 50 秒、64 $^{\circ}$ C 40 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 35 サイクル行い、最終伸長を 72 $^{\circ}$ C 3 分とした。なお PCR 法および用いたプライマーは国立感染症研究所

より発行された EHEC 検査・診断マニュアル等<sup>2),5)</sup>を参考とし、*stx1* は、*stx1a*、*stx1c* および *stx1d* の 3 種類、*stx2* は *stx2a*、*stx2b*、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f* および *stx2g* の 7 種類のサブタイプ検出を行った (表 1)。

表 1 プライマー配列

プライマー名	配列	増幅サイズ
<i>stx1</i> subtyping		
<i>stx1a</i> -F1	OCT TTC CAG GTA CAA CAG CGG TT	478
<i>stx1a</i> -R2	GGA AAC TCA TCA GAT GCC ATT CTG G	
<i>stx1c</i> -F1	OCT TTC CTG GTA CAA CTG CGG TT	252
<i>stx1c</i> -R1	CAA GTG TTG TAC GAA ATC CCC TCT GA	
<i>stx1d</i> -F1	CAG TTA ATG OGA TTG CTA AGG AGT TTA CC	203
<i>stx1d</i> -R2	CTC TTC CTC TGG TTC TAA CCC CAT GAT A	
<i>stx2</i> subtyping		
<i>stx2a</i> -F2	GCG ATA CTG RGB ACT GTG GGC	349/347
<i>stx2a</i> -R3	CCG KCA ACC TTC ACT GTA AAT GTG	
<i>stx2a</i> -R2	GGC CAC OTT CAC TGT GAA TGT G	251
<i>stx2b</i> -F1	AAA TAT GAA GAA GAT ATT TGT AGC GGC	
<i>stx2b</i> -R1	CAG CAA ATC CTG AAC CTG ACG	177
<i>stx2c</i> -F1	GAA AGT CAC AGT TTT TAT ATA CAA CCG GTA	
<i>stx2c</i> -R2	CCG GCC ACY TTT ACT GTG AAT GTA	
<i>stx2d</i> -F1	AAA RTC ACA GTC TTT ATA TAC AAC GGG TG	179/280
<i>stx2d</i> -R1	TTY CCG GGC ACT TTT ACT GTG	
<i>stx2d</i> -R2	GCC TGA TGC ACA GGT ACT GGA C	235
<i>stx2d</i> -055-R	TCA ACC GAG CAC TTT GCA GTA G	
<i>stx2e</i> -F1	CGG AGT ATC GGG GAG AGG C	411
<i>stx2e</i> -R2	CTT CCT GAC ACC TTC ACA GTA AAG GT	
<i>stx2f</i> -F1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424
<i>stx2f</i> -R1	TAA TGG CCG CCC TGT CTC C	
<i>stx2g</i> -F1	CAC CGG GTA GTT ATA TTT CTG TGG ATA TC	573
<i>stx2g</i> -R1	GAT GGC AAT TCA GAA TAA CCG CT	

### 2. 3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠したディスク拡散法にて実施した<sup>6)</sup>。培地と薬剤については、ミューラーヒントン培地 (BD) およびセンシディスク (BD) を使用した。ストレプトマイシン (SM)、クロラムフェニコール (CP)、シプロフロキサシン (CPFX)、アンピシリン (ABPC)、ホスホマイシン (FOM)、ゲンタマイシン (GM)、セフォタキシム (CTX)、カナマイシン (KM)、ナリジクス酸 (NA)、ST 合剤 (ST) およびテトラサイクリン (TC) の 11 剤について検査を実施した。なお、耐性薬剤については、耐性 (R) と判定された薬剤のみとし、中間 (I) は含めないものとした。

### 2. 4 病原遺伝子の PCR

病原遺伝子の検出は、アルカリ熱抽出法にて抽出した核酸を用いて、下痢原性大腸菌の病原遺伝子 8 種 (*elt*、*estA1*、*estA2*、*invE*、*eae*、*afaD*、*aggR* および *astA*) を標的としたマルチプレックス PCR を行った<sup>7)</sup>。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C 5 分の後に、94 $^{\circ}$ C 30 秒、50 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 30 サイクル行い、最終伸長を 72 $^{\circ}$ C 10 分とした。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 EHEC 感染症の届出数と血清型別

平成 24 年 14 件、平成 25 年 26 件、平成 26 年 38 件、平成 27 年 24 件、平成 28 年 29 件、平成 29 年 30 件、平成 30 年 39 件、平成 31 年および令和元年は 30 件だった。届出数について、平成 24 年は少なかったものの、平成 25 年以降は毎年 30 件前後報告されていた。O 群別では O157 (141 株、61.3%) が最も多く、次いで O26 (41 株、17.8%)、O103 (12 件、5.2%)、O121 (9 件、3.9%) の順であった (図 1)。年次別では平成 26 年および平成 27 年で O26 の流行がみられた。

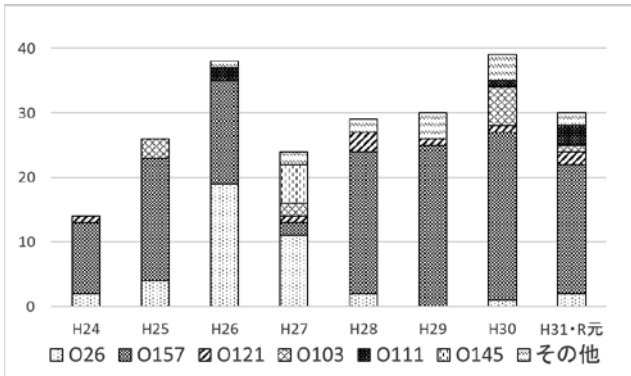


図 1 福井県の EHEC 届出数

#### 3.2 Stx サブタイプと血清型別

供試菌株 143 株の Stx サブタイプを決定したところ、内訳は多い順に *stx1a+stx2a* (52 株、36.4%)、*stx1a* (31 株、21.7%)、*stx1a+stx2c* (18 株、12.6%)、*stx2a* (18 株、12.6%)、*stx2c* (9 株、6.3%)、*stx2a+stx2c* (7 株、4.9%)、*stx1c* (3 株、2.1%)、*stx2b* (2 株、1.4%)、*stx1a+stx2b* (1 株、0.7%)、*stx2c+stx2d* (1 株、0.7%)、*stx1a+stx2a+stx2d* (1 株、0.7%) であった。サブタイプの多くは *stx1a*、*stx2a*、*stx2c* のいずれかの組み合わせで、全 143 株中 135 株 (94.4%) を占める結果となった。また僅かではあるが、*stx1c*、*stx2b* および *stx2d* が検出された。その他 *stx1d*、*stx2e*、*stx2f* および *stx2g* は検出されなかった。O 血清群をサブタイプ別に分類すると *stx1a+stx2a* では 52 株中 O157 が 47 株、90.4%、*stx1a* では 31 株中 O26 が 19 株、61.3% を占める結果となり、サブタイプごとに特徴が認められた (図 2)。

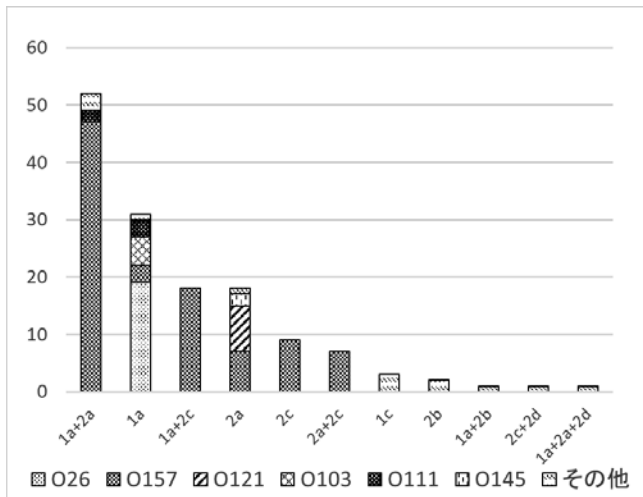


図 2 O 血清群別にみた Stx サブタイプ

#### 3.3 血便症状との関連性

重症化の目安として血便症状の有無を解析したところ、血便症状のあった株は 143 株中 78 株であった。なかでも、血便発症率が 5 割を超えるサブタイプは *stx2a+stx2c* (7 株中 6 株、85.7%)、*stx1a+stx2a* (52 株中 39 株、75.0%) および *stx1a+stx2c* (18 株中 10 株、55.6%) の 3 タイプが確認された (表 2)。なお、*stx1a+stx2a+stx2d* は 1 株のため評価の対象外とした。因子別でみると、*stx2a* が 78 株中 55 株 (70.5%)、*stx1a* が 103 株中 61 株 (59.2%)、*stx2c* が 35 株中 18 株 (51.4%) と *stx2a* 保有株でより血便発症率が高い傾向にあった。 $\chi^2$  検定を実施したところ、この *stx2a* について有意な関係が認められた (表 3)。このことから、血便の発症に *stx2a* が関与していることが示唆された。

表 2 Stx サブタイプ別にみた血便発症率

Stx サブタイプ		血便有 (株)	総数 (株)	血便発症率 (%)
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	39	52	75.0
<i>stx1a</i>		11	31	35.5
<i>stx1a</i>	<i>stx2c</i>	10	18	55.6
	<i>stx2a</i>	9	18	50.0
	<i>stx2c</i>	2	9	22.2
	<i>stx2a</i> <i>stx2c</i>	6	7	85.7
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i> <i>stx2d</i>	1	1	100.0
	<i>stx1c</i>	0	3	0.0
	<i>stx2b</i>	0	2	0.0
<i>stx1a</i>	<i>stx2b</i>	0	1	0.0
	<i>stx2c</i> <i>stx2d</i>	0	1	0.0
合計		78	143	

表 3 Stx サブタイプと血便発症との相関 ( $\chi^2$  検定)

菌株数 (株)		血便の発症		合計
		有	無	
<i>stx1a</i>	含む	61	42	103
	含まない	17	23	40
合計		78	65	143

$$\chi^2(1a)=3.25 \quad p(1a)=0.071>0.05$$

菌株数 (株)		血便の発症		合計
		有	無	
<i>stx2a</i>	含む	55	23	78
	含まない	23	42	65
合計		78	65	143

$$\chi^2(2a)=17.6 \quad p(2a)<0.001$$

菌株数 (株)		血便の発症		合計
		有	無	
<i>stx2c</i>	含む	18	17	35
	含まない	60	48	108
合計		78	65	143

$$\chi^2(2c)=0.182 \quad p(2c)=0.670>0.05$$

### 3. 4 薬剤感受性試験

供試菌株 143 株のうち 48 株 (33.6%) で 11 剤のいずれかに耐性を示した。内訳は、耐性薬剤数 1 剤 (22 株, 15.4%)、2 剤 (12 株, 8.4%)、3 剤 (8 株, 5.6%)、4 剤 (3 株, 2.1%)、5 剤 (2 株, 1.4%)、6 剤 (1 株, 0.7%) であった。多くは 11 剤全てに感性 (中間も含む) もしくは 1 剤耐性の株で、2 剤以上に耐性を示した菌は 26 株 (18.2%) 確認された。Stx サブタイプ別では、1 剤以上に耐性を示した割合は、*stx1a+stx2a* (19 株, 36.5%)、*stx1a* (9 株, 29.0%)、*stx1a+stx2c* (6 株, 33.3%)、*stx2a* (7 株, 38.9%)、*stx2c* (3 株, 33.3%)、*stx2a+stx2c* (2 株, 28.6%)、*stx1c* (1 株, 33.3%)、*stx2b* (0 株, 0.0%)、*stx1a+stx2b* (0 株, 0.0%)、*stx2c+stx2d* (0 株, 0.0%)、*stx1a+stx2a+stx2d* (1 株, 100.0%) と、明らかな違いは認められなかった (表 4)。なお、*stx1a+stx2a+stx2d* 株については 1 株のみのため、評価の対象外とした。

薬剤別にみた耐性株数は、TC (26 株, 18.2%)、SM (22 株, 15.4%)、ABPC (16 株, 11.2%) CP (10 株, 7.0%)、KM (7 株, 4.9%)、ST (5 株, 3.5%)、NA (3 株, 2.1%)、GM (2 株, 1.4%)、CTX (2 株, 1.4%)、FOM (1 株, 0.7%)、CPFX (0 株, 0%) であった。特に TC、SM、ABPC で耐性の割合が高く、他県の報告と同様の傾向を示した<sup>8),9)</sup>。また、EHEC 感染症の治療薬として一般的な FOM 耐性が 1 株確認された。これは平成 26 年に分離された O111、*stx1a* 株であるが、集団事例ではなかったことから、FOM 耐性菌の広がりには確認されていない。FOM が効かず重症となるケースも懸念されることから、薬剤感受性試験による的確な治療薬の選定が重要であると考えられる。

表 4 Stx サブタイプ別にみた耐性薬剤数

Stxサブタイプ		菌株数	耐性薬剤数							
			0	1	2	3	4	5	6	
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	52	33	10	4	4	1			
<i>stx1a</i>		31	22	4	3	1			1	
<i>stx1a</i>	<i>stx2c</i>	18	12	1	3		1	1		
	<i>stx2a</i>	18	11	5			1	1		
	<i>stx2c</i>	9	6		2	1				
	<i>stx2a</i>	7	5	2						
	<i>stx1c</i>	3	2		1					
	<i>stx2b</i>	2	2							
<i>stx1a</i>	<i>stx2b</i>	1	1							
	<i>stx2c</i>	1	1							
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	1			1					
		合計	143	95	22	12	8	3	2	1

### 3. 5 病原遺伝子

供試菌株 143 株について病原遺伝子を検索したところ、*eae* (インチミン遺伝子) が 132 株から、*astA* (凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子) が 2 株から確認された。一方、*aggR*、*elt*、*estA1*、*estA2*、*invE* および *afaD* は検出されなかった (表 5)。*eae* は腸粘膜への付着に関わる遺伝子であるが、EHEC の感染にも関与していることが明らかとなっている<sup>10)</sup>。当センターでも高い陽性率 (92.3%) を示した。EHEC は *eae* が無ければ腸管内に定着できず、一過性を通り過ぎるのみであると考えられている<sup>11)</sup>。しかしながら、今回 *eae* を保有していなかった 11 株の由来患者を調べたところ、有症者が 3 名おり、そのうち 1 名で血便発症が認められた。*eae* を保有しない EHEC 株でも病原性を有する例が報告されており<sup>12)</sup>、*eae* 以外の別の因子が関与している可能性が考えられる。

*astA* は EAST1 (腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロ

トキシン 1) をコードする遺伝子であり、「他の下痢原性大腸菌」の主な病原因子の一つに挙げられている。*astA* 保有 EHEC の分離例はいくつか報告がなされているが<sup>13),14)</sup>、*astA* 保有大腸菌は健康な人から分離されることも多く、不明な点も多い。さらなる事例の集積が必要とされる。

表 5 Stx サブタイプと病原遺伝子保有数

Stxサブタイプ		菌株数	病原遺伝子保有数						
			<i>eae</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>	<i>elt</i>	<i>estA1</i>	<i>estA2</i>	<i>invE</i>
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	52	51						
<i>stx1a</i>		31	30	2					
<i>stx1a</i>	<i>stx2c</i>	18	18						
	<i>stx2a</i>	18	17						
	<i>stx2c</i>	9	9						
	<i>stx2a</i>	7	7						
<i>stx1c</i>		3							
	<i>stx2b</i>	2							
<i>stx1a</i>	<i>stx2b</i>	1							
	<i>stx2c</i>	1							
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	1							
		合計	143	132	2				

## 4. まとめ

143 株のうち *stx1a+stx2a* が 52 株 (36.4%) と最も多く、次に *stx1a* が 31 株 (21.7%) 検出された。僅かであったが *stx1c*、*stx2b*、*stx2d* といったサブタイプも確認された。薬剤感受性試験では、FOM 耐性株が 1 株確認された。FOM は腸管出血性大腸菌感染症の治療薬とされるため、今後も耐性動向に注視したい。病原遺伝子である *eae* は EHEC の腸管への付着に関わる因子とされており、*eae* 保有株は 132 株 (92.3%) とほとんどの株で検出された。

Stx サブタイプと血便発症との関係について、 $\chi^2$  検定の結果より *stx2a* について有意な関係が認められた。このことから、血便の発症に *stx2a* が関与していることが示唆された。*stx2a* 保有患者の臨床症状には注意を払う必要があると考えられる。

## 参考文献

- 1) (注目すべき感染症) 腸管出血性大腸菌. 感染症発生動向調査速報 (IDWR), **34**, (2019)
- 2) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル 2021 年 9 月改訂. 国立感染症研究所
- 3) Eklund, M., Leino, K., Siitonen, A.: Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4585-4593 (2002)
- 4) 斎藤悦子, 秋山由美, 荻田堅一, 坂野桂, 二井洋子, 辻英高: 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付着因子の保有状況について. 兵庫県立健康生活科学研究センター健康科学研究センター研究報告, **8**, 1-6 (2017)
- 5) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD: Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*, **50**, 2951-2963, (2012)
- 6) Performance Standards for Antimicrobial Susce-

- ptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) , M100-S21 (2011)
- 7) 床井由紀,片岡俊輔,若月章,谷澤輝,中田友理,関哲,石岡真緒,荒井恒潤,大籠裕子,金子淳子,長谷充啓,木原晴子:宇都宮市で発生した *Escherichia albertii* による食中毒事例について. *Jpn.J.Food Microbiol*, **35**(3), 159-162, (2018)
  - 8) 今野貴之,八柳潤,齊藤志保子:腸管出血性大腸菌の薬剤耐性について. *秋田県健康環境センター年報*, **2**, 72-75 (2006)
  - 9) 黒澤肇,安中秀幸,坂野智恵子,横田陽子,小畑敏:群馬県において分離された腸管出血性大腸菌. *群馬県衛生環境研究所年報*, **42**, 62-65 (2010)
  - 10) Boerlin P, McEwen S, Boerlin-Petzold F, Wilson J, Johnson R, Gyles C: Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. **37**(3), 497-503,(1999)
  - 11) 熊谷奈々子,須釜久美子,平澤恭子,長沢正秋,渡部啓司:腸管出血性大腸菌 O121 感染事例からの考察. *福島県衛生研究所年報*, **23**, 39-42 (2005)
  - 12) Feng, P, Weagant, SD, Monday, SR: Genetic Analysis for Virulence Factors in *Escherichia coli* O104:H21 That Was Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Colitis. *J Clin Microbiol*, **39**, 24-28, (2001)
  - 13) 木全恵子,三井千恵子,金谷潤一,磯部順子,範本志保,綿引正則:富山県内の腸管出血性大腸菌感染症発生状況(2015). *富山県衛生研究所年報*, **39**, 97-100, (2016)
  - 14) 徳岡英亮,古川真斗,永村哲也,原田誠也,浴永圭吾,徳永晴樹,東竜生:非典型的病原血清型大腸菌 (OUT:HNM) が主因と推定された食中毒事例-熊本県. *病原微生物検出情報 (IASR)*, **33**, 8-9, (2012)