

# 調査研究 終了報告書

令和3年8月17日作成

研究者（所属・氏名）：保健衛生部 細菌・ウイルス研究グループ 横山 孝治

研究課題名 (終了)	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	コードNO III B-1
共同研究者 (担当分野)	細菌・ウイルス研究グループ 山本政弘、児玉佳、岩崎理美、永田暁洋（遺伝子検査、薬剤感受性試験） 東方美保（調整全般）	
研究期間	平成 30 年度から 令和 2 年度まで（3年間）	
研究成果 の概要	<p>1. 目的</p> <p>腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、志賀毒素（Shiga toxin : Stx）遺伝子を保有する EHEC の感染によって起こる全身性疾患で、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。本感染症は、無症状から腹痛、下痢、血便さらには溶血性尿毒症症候群（HUS）まで様々な臨床症状を呈するが、特に HUS は、死亡あるいは腎機能や神経障害などの後遺症を残す可能性のある重篤な疾患である。</p> <p>EHEC が保有する Stx 遺伝子には、大きく分けて <i>stx1</i> と <i>stx2</i> があり、更に <i>stx1</i> は <i>stx1a, stx1c, stx1d</i> の3種類、<i>stx2</i> は <i>stx2a, stx2b, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, stx2g</i> 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り、病原性にも違いがあることが報告されている。</p> <p>今回、福井県において分離された EHEC 株の遺伝子検査を実施し、Stx サブタイプごとの流行動向を調査するとともに、Stx サブタイプと菌株の性状等の関連性について解析を行った。</p> <p>2. 方法</p> <p>平成24年から令和元年に福井県内で分離された EHEC 株について、MLVA（反復配列多型解析）や PFGE（パルスフィールドゲル電気泳動）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143株を対象とした。Stx サブタイピング PCR 法は、EHEC 検査・診断マニュアル（国立感染症研究所筆）に基づき実施した。抽出はアルカリ熱抽出法、PCR 条件は 95°C 5 min → (94°C 50 sec・64°C 40 sec・72°C 1 min) × 35 cycle → 72°C 3 min で行った。さらに、決定したサブタイプと菌株性状、薬剤感受性試験結果および病原遺伝子検出状況との相関を検討した。薬剤感受性試験は、各種抗菌剤への耐性を測定するため、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のディスク拡散法にて実施した。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。病原遺伝子の検索は、アルカリ熱抽出法にて抽出した DNA を用いて、下痢原性大腸菌の病原遺伝子 (<i>elt, estA1, estA2, invE, eae, afaD, aggR, astA</i>) を標的としたマルチプレックス PCR を行った。PCR 条件は 94°C 5 min → (94°C 30 sec・50°C 30 sec・72°C 1 min) × 30 cycle → 72°C 10 min で行った。</p>	

### 3. 結果・成績 (図面含む)

#### (1) EHEC の届出数

平成 24 年は 14 件と少ないものの、平成 25 年以降は毎年 30 件前後報告されていた。O157 (141 株、61.3%) が最も多く、次いで O26 (41 株、17.8%)、O103 (12 件、5.2%) の順であった (図 1)。

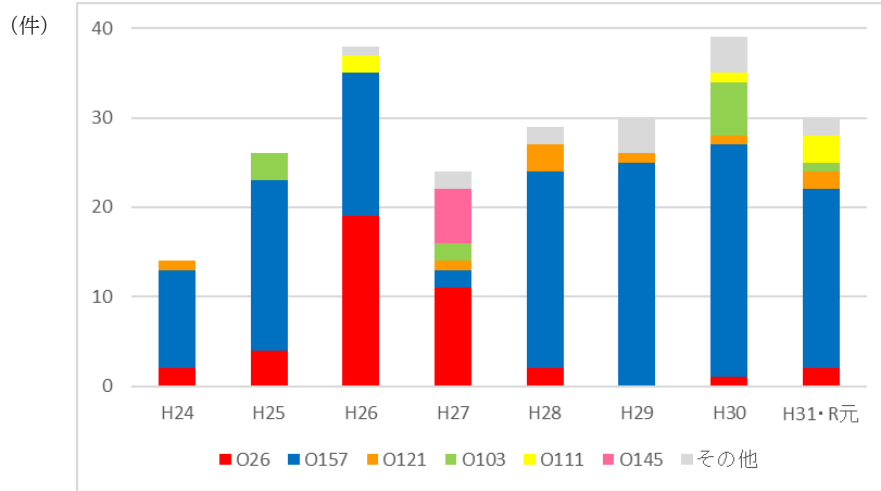


図 1 福井県の EHEC 届出数

#### (2) Stx サブタイプ

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。*stx1d*、*stx2e*、*stx2f*、*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 O157、*stx1a* では O26 が多くを占める結果となり、サブタイプごとに特徴がみられた (図 2)。

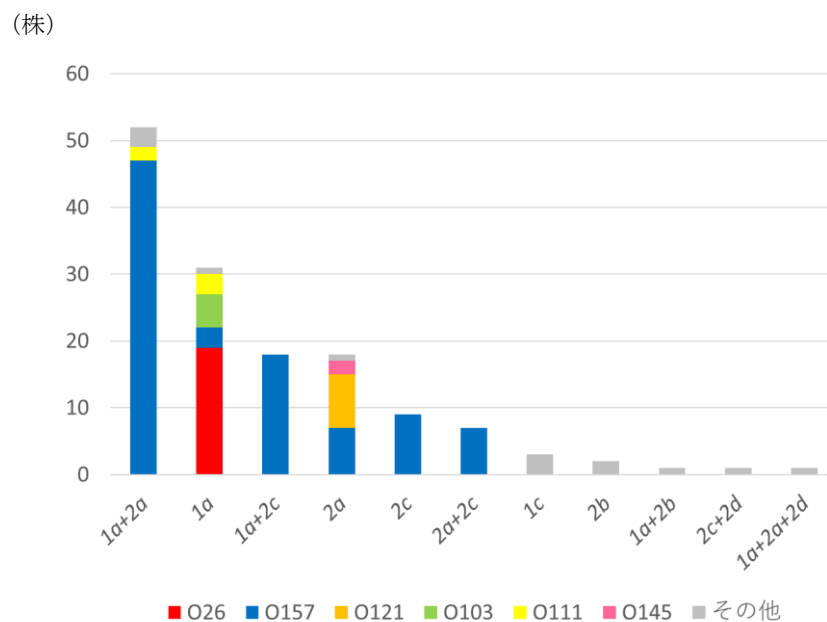


図 2 O 血清群別にみた Stx サブタイプ

(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。この78株のうち、*stx1a*を含む株が61株、*stx2a*を含む株が55株、*stx2c*を含む株が18株であった(重複有)。血便発症率が比較的高かった*stx1a*、*stx2a*および*stx2c*(表1)と、血便発症との関係について、 $\chi^2$ 検定を実施したところ、*stx2a*について有意な関係が認められた(表2)。

表1 Stx サブタイプと血便発症率

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

表2 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		
		有	無	合計
<i>stx1a</i>	含む	61	42	103
	含まない	17	23	40
合計		78	65	143

$$\chi^2(1a)=3.25$$

$$p(1a)=0.071>0.05$$

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

$$\chi^2(2a) = 17.6$$

$$p(2a) < 0.0001$$

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

$$\chi^2(2c)=0.182$$

$$p(2c)=0.670>0.05$$

#### 4) 薬剤感受性試験 (11 薬剤)

供試菌株 143 株の耐性薬剤数に関して、耐性薬剤数 0 薬剤 (95 株、66.4%)、1 薬剤 (22 株、15.4%)、2 薬剤 (12 株、8.4%)、3 薬剤 (8 株、5.6%)、4 薬剤 (3 株、2.1%)、5 薬剤 (2 株、1.4%)、6 薬剤 (1 株、0.7%) であった。多くは耐性薬剤数 0 薬剤ないし 1 薬剤で、全体の 81.8%を占める結果が得られた。

薬剤別にみた耐性株数は、テトラサイクリン (TC) 26 株、18.2%、ストレプトマイシン (SM) 22 株、15.4%、アンピシリン (ABPC) 16 株、11.2%、クロラムフェニコール (CP) 10 株、7.0%、カナマイシン (KM) 7 株、4.9%、ST 合剤 (ST) 5 株、3.5%、ナリジクス酸 (NA) 3 株、2.1%、ゲンタマイシン (GM) 2 株、1.4%、セフトキシム (CTX) 2 株、1.4%、ホスホマイシン (FOM) 1 株、0.7%、シプロフロキサシン (CPFX) 0 株、0%であった。特に TC、SM、ABPC で耐性の割合が高かった。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。Stx サブタイプ別で耐性薬剤数を確認したが、明らかな違いは認められなかった (表 3)。

表 3 Stx サブタイプと耐性薬剤数

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>	<i>stx2d</i>	1	1						
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	<i>stx2d</i>	1			1				
		合計	143	95	22	12	8	3	2	1

#### (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、*astA* (凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子) が 2 株確認された。*eae* は腸粘膜への付着に関わる遺伝子である。特に *eae* は高い陽性率 (92.3%) を示した。また、*aggR*、*elt*、*estA1*、*estA2*、*invE*、*afaD* は検出されなかった (表 4)。

表 4 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>afaD</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>stx2d</i>	1								
<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	1								
		合計	143	132	2					

4. 考察

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 *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 *stx 2a* 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。

実現した、  
または期待  
される成果

1. 県民生活や産業社会への波及効果  
福井県内における Stx サブタイプの動向が明らかとなり、把握することができた。
2. 業務遂行のレベルアップへの寄与等  
当センターでの検査手技の確立につながった。

	題名	発信媒体、方法等	発信年月
外部（県民等）への効果的な発信実績（予定可）	福井県における腸管出血性大腸菌分離株の Stx サブタイプ解析	衛生環境研究センター所報	令和 3 年 11 月
	福井県における腸管出血性大腸菌分離株の Stx サブタイプ解析	第 60 回日臨技近畿支部医学検査学会	令和 3 年 11 月
備 考			