

原 著

三重県における腸管出血性大腸菌感染症について Stx バリエーション解析と O157 株のクレード解析

永井佑樹, 小林隆司, 小林章人, 赤地重宏

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Mie Prefecture Stx Subtyping of EHEC and Phylogenetic Clade Analysis of O157:H7

Yuhki NAGAI, Takashi KOBAYASHI, Akihito KOBAYASHI and Shigehiro AKACHI

2014 年度に三重県内で届出のあった腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E.coli* 以下 EHEC) 感染者数は 58 名であり, 分離された 58 株の血清型は, O157 が 37 株と最も多く, O26 が 7 株, O111 が 6 株でこれら 3 血清型の占める割合は 86.2% (50/58) であった. Stx のバリエーション解析では, 焼き肉等の喫食率の高かったバリエーションは *Stx2a* (80%) および *Stx1a+Stx2a* (56.5%) であり, さらに重症者の中で *Stx2a* を保持していた人の割合は 88.5% (23/26) であった. また今回解析したなかで *Stx2f* を保有した株も 3 株確認された. クラスタ解析の結果では, 12 のクラスタが確認され, クラスタ形成率は 53.4% (31/58) となったが, そのうち 18 株では疫学的な関連性は確認されなかった. MAMA-PCR によるクレード解析では, 今回解析した株のなかではクレード 8 の株は確認されなかったが, クレード 8 系統株は HUS 発症率が高いことが報告されており, 今後も継続的な監視が必要であると思われた.

キーワード: 腸管出血性大腸菌, 分子疫学解析, Stxバリエーション, クレード解析

はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC ; Enterohemorrhagic *Escherichia coli*) 感染症は, 感染症法に基づく 3 類感染症に指定され, 診断した医師の全数届出が義務付けられている. 本感染症は無症状から腹痛, 下痢, 出血性大腸炎 (血便) さらには溶血性尿毒症症候群 (HUS ; Hemolytic Uremic Syndrome) まで様々な臨床症状を呈する重要な感染症であり, EHEC による集団食中毒も毎年のように報告されている. 感染源や感染経路の究明には, 分離菌の分子疫学解析が有用とされており, 三重県においても患者から検出された菌株は保健所の協力のもと地方衛生研究所である当所に搬入され, その後, 厚生労働省通知に基づき国立感染症研究所に送付される. 送付された菌株は multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法またはパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析が行われ,

その結果は各自治体に情報還元されている. また近年, EHEC 感染症による重症化のリスク解析として志賀毒素 (Stx) の変異型毒素 (バリエーション) 解析や, O157 株のクレード解析が注目されている. そこで今回, 2014 年度に感染症発生動向調査で報告された三重県内における EHEC 感染症の概要および分子疫学解析の結果について報告するとともに, Stx のバリエーション解析および O157 株のクレード解析の結果についてもあわせて報告する.

方 法

1. 発生状況

腸管出血性大腸菌感染症の感染者情報は, 三重県感染症発生動向調査事業に基づく届出データにより把握した. 分子疫学解析は国立感染症研究所で実施した PFGE 解析 (O157, O26, O111 以外) および MLVA 解析のデータをもとに検討

した。本研究では、2株以上の菌株において解析した遺伝子型 (MLVA 型および PFGE 型) が一致した場合、その菌株群をクラスターとして定義した。焼き肉等の喫食歴に関しては、保健所の疫学調査の結果をもとに集計した。また患者のうち血便および HUS の症状がみられた患者を重症者と定義し集計した。

2. Template DNA の抽出

アルカリ熱抽出法により DNA を抽出した。すなわち平板培地に発育した菌体の数コロニー相当をディスポーザブルの白金耳で採取し、100 μ l の 25mM NaOH に懸濁し、100°C で 5 分間加熱した。8 μ l の 1M Tris-HCl 緩衝液を加えて中和後、12,000rpm で 5 分間遠心分離し、その上清を新たなチューブに分取し template とした。

3. Stx のバリエーション解析

Scheutz らの方法に従い、Stx のサブタイプ (*Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d*, *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f*, *Stx2g*) を決定した¹⁾。 *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d*, *Stx2a*, *Stx2d* に関しては、multiplex PCR により実施し、使用したプライマーは Table 1 に示した。

4. O157:H7 株のクレード解析

2014 年度に分離された株のうち血清型が O157 と同定された株のみを対象とした。解析は Iyoda らの方法に従い MAMA (mismatch amplification mutation assay)-PCR 法により実施した²⁾。

5. 病原性関連遺伝子の検出

Ramírez らの方法に従い病原性関連遺伝子の *eae*、および *astA* を PCR により検出した³⁾。

結 果

1. 発生状況

2014 年度に三重県内で届出のあった EHEC の感染者数は 58 名であり、患者が 38 名、保菌者が 20 名であった。月別の発生数としては、7 月が 18 名と最も多く、次いで 8 月が 13 名、6 月が 10 名で、6 月から 9 月までの発生数が 44 件 (75.9%) であった。感染者 58 名の平均年齢は 36.6 歳 (0~83 歳, SD=24.45) であり、年齢階級別では 20~29 歳が 10 名と最も多く、次いで 0~9 歳, 10~19 歳, 60~69 歳が各 9 名であった。性別では男性 22 名に対し女性が 36 名であった。また 58 名のうち焼き肉等 (ハンバーグ, ホルモン含む) 喫食歴のある人の割合は 44.8% (26/58) であり、患者に限ると 68.4% (26/38)

Table 1. Primers used for Stx subtyping PCR

Target	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
Stx1 subtyping		
stx1a-F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478
stx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	
stx1c-F1	CCTTTCCTGGTACAACGCGGTT	252
stx1c-R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCTCTGA	
stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203
stx1d-R2	CTCTTCCTCTGGTCTAACCCCATGATA	
Stx2 subtyping		
stx2a-F2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	349
stx2a-R3	CCGKCAACCTTCACTGTAATGTG	
stx2a-R2	GCCACCTTCACTGTGAATGTG	347
stx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251
stx2b-R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	
stx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTATATACAACGGGTA	177
stx2c-R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	
stx2d-F1	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	179
stx2d-R1	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	
stx2d-O55-R	TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG	235
stx2d-R2	GCCTGATGCACAGTACTGGAC	280
stx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411
stx2e-R2	CTTCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	
stx2f-F1	TGGGCGTCACTTCACTGGTTG	424
stx2f-R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	
stx2g-F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573
stx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	

であった。また患者 38 名のうち HUS が 2 名、血便が 24 名みられ、二つを合わせた重症者の割合は 68.4% (26/38) であった。

2. 分離菌の血清型

分離された 58 株の血清型の内訳は、O157 が 37 株、O26 が 7 株、O111 が 6 株、O119 が 3 株、O165 が 2 株、O115 が 1 株、O145 が 1 株、O121 が 1 株であった。

3. Stx の保有状況およびバリエーション解析

Stx の保有状況を Table 2 に示した。Stx1 のみを保有していたのは 9 株で、Stx2 のみ保有していたのは 20 株、Stx1 と Stx2 の両方を保有していたのは 29 株であった。また Stx のバリエーション解析の結果、最も多かったのが *Stx1a+Stx2a* で 23 株、次いで *Stx2a* 単独が 10 株、*Stx1a* 単独が 9 株、*Stx2a+Stx2c* が 6 株、*Stx1a+Stx2c* が 3 株、*Stx1a+Stx2a+Stx2c* が 3 株、*Stx2f* 単独が 2 株、*Stx2a+Stx2c+Stx2f* と *Stx2c* 単独がそれぞれ 1 株ずつであった。Stx のタイプ別で焼き肉等を喫食していた割合が最も高かったのは *Stx2a* の感染者で喫食率は 80% (8/10) 次いで *Stx1a+Stx2a* で 56.5% (13/23) であった。一方、*Stx1a+Stx2c*, *Stx2a+2c+2f*, *Stx2c* および *Stx2f* の感染者では、焼き肉等の喫食歴のある人はいなかった。また重症者 (HUS+血便) の最も多かったバリエーションは *Stx1a+Stx2a* の 13 株で 50% (13/26) と半数を占めていた。さらに重症者のなかで *Stx2a* (単独以外も含む) を保持して

Table 2. Characteristics of EHEC strains isolated from Mie Prefecture (2014)

Strain No	Serotype	<i>eae</i>	<i>astA</i>	Stx subtype	Patient/ Carrier	Symptom	MLVA	Month	Age	Sex	Epidemiology
2014005	O26	+	-	Stx1a	保菌者		14m2004	4	26	F	
2014010	O111	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m3003	5	9	F	焼き肉
2014011	O157	+	-	Stx2a	患者		14m0024	5	60	F	県外で焼き肉
2014012	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0028	5	35	M	焼き肉
2014013	O111	+	-	Stx1a, Stx2a	患者		14m3003	5	15	M	2014012の兄、焼き肉
2014014	O26	+	-	Stx1a	保菌者		14m2014	5	53	F	保育士、給食担当
2014024	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	HUS	14m0069	6	32	F	重篤
2014025	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	保菌者		14m0069	6	29	M	2014024の家族
2014026	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者		13m0157	6	16	M	広域事例、味付けホルモン
2014027	O157	+	-	Stx1a, Stx2c	保菌者		14m0061	6	60	F	旅行、ひつまぶし、うどん
2014028	O157	+	-	Stx1a, Stx2c	保菌者		14m0061	6	64	F	旅行、ひつまぶし、うどん
2014029	O157	+	-	Stx1a, Stx2c	保菌者		14m0061	6	65	F	旅行、ひつまぶし、うどん
2014030	O111	+	-	Stx1a, Stx2a	保菌者		14m3006	6	65	F	
2014031	O157	+	-	Stx2a	患者		14m0016	6	55	F	外食なし
2014032	O157	+	-	Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m0061	6	74	F	外食なし
2014037	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0089	7	23	F	焼き肉
2014039	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	保菌者		14m0107	7	73	M	
2014041	O111	+	-	Stx1a, Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m3010	7	82	F	外食なし
2014042	O111	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m3010	7	62	F	土日ランチ以外、外食なし
2014043	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0148	7	31	M	ホルモン含むバーベキュー
2014044	O165	+	-	Stx2a, Stx2c	患者	血便		7	8	F	週一回手作りハンバーグ
2014045	O157	+	-	Stx1a, Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m0137	7	61	M	焼き肉
2014046	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0140	7	30	F	外食なし
2014047	O157	+	-	Stx1a, Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m0089	7	19	M	複数の店で喫食
2014048	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者		14m0133	7	10	M	ホルモン喫食
2014049	O119	+	-	Stx2a, Stx2c, Stx2f	患者	血便		7	0	F	離乳食、家族も焼き肉なし
2014050	O157	+	-	Stx2a, Stx2c	保菌者		14m0143	7	26	F	
2014054	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0107	7	81	M	昼食は配食サービス
2014055	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者		14m0211	7	9	F	焼き肉
2014056	O165	+	-	Stx2a, Stx2c	保菌者			8	49	F	2014044の母
2014057	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0232	7	9	M	焼き肉
2014058	O119	+	-	Stx2f	保菌者			8	29	M	2014049の父
2014059	O119	+	-	Stx2f	保菌者			8	3	F	2014049の姉
2014060	O111	+	-	Stx1a, Stx2a	患者		14m3010	7	10	M	肉牛飼育農家
2014061	O157	+	-	Stx2a	患者		14m0016	7	2	M	ハンバーグ
2014062	O145	+	-	Stx2a	患者	血便		8	16	M	焼き肉
2014063	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0234	8	10	M	焼き肉
2014064	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	保菌者		14m0235	8	41	F	2014063の母
2014084	O157	+	-	Stx2a	保菌者		14m0016	8	62	M	2014088と焼き肉
2014085	O26	+	-	Stx2c	患者	血便	14m2085	7	17	F	外食なし
2014086	O157	+	-	Stx1a	患者		14m0301	8	26	F	バーベキュー
2014087	O157	+	-	Stx1a	保菌者		14m0321	8	57	F	焼き肉
2014088	O157	+	-	Stx2a	患者		14m0016	8	59	F	2014084の接触者、焼き肉
2014089	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0323	8	20	F	焼き肉
2014090	O26	+	-	Stx1a	保菌者		14m2086	8	44	F	2014085の家族
2014091	O26	+	-	Stx1a	保菌者		14m2085	8	69	F	2014085の家族
2014092	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0318	9	2	M	特に喫食なし
2014093	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	保菌者		14m0319	9	6	M	2914092の兄
2014114	O157	+	-	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0376	9	22	F	焼き肉
2014115	O121	+	-	Stx2a	患者	血便		10	16	F	肉はあまり食べない
2014116	O157	+	-	Stx2a	患者		14m0362	10	49	F	焼き肉
2014117	O157	+	-	Stx2a	患者	血便	14m0362	10	24	M	焼き肉
2014118	O157	+	-	Stx2a	保菌者		14m0362	10	56	F	焼き肉
2014126	O26	+	-	Stx1a	患者		14m2123	11	24	F	外食なし
2014129	O157	+	-	Stx2a, Stx2c	保菌者		14m0143	11	34	M	外食なし
2014130	O26	+	-	Stx1a	患者	血便	13m2195	11	34	F	外食なし
2014146	O157	+	-	Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m0266	12	75	M	冷凍ホルモン、カルビなど
2014021	O115	-	-	Stx1a	患者	HUS		6	83	F	HUS

いた人の割合は 88.5% (23/26) であった。

次に血清型の違いによる Stx 保有状況を調べたところ、血清型 O157 での Stx2a 保有率は 86.5% (32/37) であったのに対し、血清型 O157 以外の non-O157 EHEC での保有率は 52.3% (11/21) であ

った。また血清型 O26 に限ると、Stx2a 保有株は 0% (0/7) であった。

4. クレード解析

MAMA-PCR 法によりクレード解析を実施した

Table 3. Profiles of EHEC strains recognized as cluster type in Mie Prefecture (2014)

Cluster	Strain No	Serotype	eae	Stx variant	Patient/ Carrier	Symptom	MLVA/ PFGE	Epidemiological link
M1	2014027	O157	+	Srx1a, Stx2c	保菌者		14m0061	+
	2014028	O157	+	Stx1a, Stx2c	保菌者		14m0061	+
	2014029	O157	+	Stx1a, Stx2c	保菌者		14m0061	+
	2014032	O157	+	Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m0061	
M2	2014031	O157	+	Stx2a	患者		14m0016	
	2014061	O157	+	Stx2a	患者		14m0016	
	2014084	O157	+	Stx2a	保菌者		14m0016	+
	2014088	O157	+	Stx2a	患者		14m0016	+
M3	2014041	O111	+	Stx1a, Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m3010	
	2014042	O111	+	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m3010	
	2014060	O111	+	Stx1a, Stx2a	患者		14m3010	
M4	2014049	O119	+	Stx2a, Stx2c, Stx2f	患者	血便		+
	2014058	O119	+	Stx2f	保菌者		same as 2014049	+
	2014059	O119	+	Stx2f	保菌者		same as 2014049	+
M5	2014116	O157	+	Stx2a	患者		14m0362	
	2014117	O157	+	Stx2a	患者	血便	14m0362	+
	2014118	O157	+	Stx2a	保菌者		14m0362	+
M6	2014010	O111	+	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m3003	+
	2014013	O111	+	Stx1a, Stx2a	患者		14m3003	+
M7	2014024	O157	+	Stx1a, Stx2a	患者	HUS	14m0069	+
	2014025	O157	+	Stx1a, Stx2a	保菌者		14m0069	+
M8	2014037	O157	+	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0089	
	2014047	O157	+	Stx1a, Stx2a, Stx2c	患者	血便	14m0089	
M9	2014039	O157	+	Stx1a, Stx2a	保菌者		14m0107	
	2014054	O157	+	Stx1a, Stx2a	患者	血便	14m0107	
M10	2014044	O165	+	Stx2a, Stx2c	患者	血便		+
	2014056	O165	+	Stx2a, Stx2c	保菌者		same as 2014044	+
M11	2014050	O157	+	Stx2a, Stx2c	保菌者		14m0143	
	2014129	O157	+	Stx2a, Stx2c	保菌者		14m0143	
M12	2014085	O26	+	Stx2c	患者	血便	14m2085	+
	2014091	O26	+	Stx1a	保菌者		14m2085	+

結果、今回解析した株のなかでは、クレード8の株は確認されず全てクレード1-7の株であることが確認された。

5. クラスタ解析

MLVA 解析および PFGE 解析で遺伝子型が一致したものを同一クラスターと判定した結果、全部で12のクラスターが確認された (Table 3), クラスタ形成率は53.4% (31/58) となった。またクラスターを形成した31株のうち18株 (58.1%) で疫学的関連性は確認されなかった。最も大きいクラスターは M1 と M2 でそれぞれ4株で構成されており、次いで M3, M4, M5 が3株, M6 から M12 が2株で構成されていた。またクラスターの M4, M6, M7, M10, M12 に関しては、感染者の疫学的関連性が確認されたが、M3, M8, M9, M11 についてはクラスター内の感染者間で疫学的な関連性は認められなかった。クラスター M1, M2, M5 についてはクラスター内で疫学的に関連性のある感染者と関連性のない感染者が混在していた。

6. 病原性関連遺伝子の検出

腸管付着に関与する遺伝子の *eae*, および *astA* をターゲットとして PCR を実施した結果 *eae* は、菌株 No.2014021 (O115) の一株で陰性となったが、それ以外の57株では全て陽性であった (Table 2)。また *astA* は全ての検体で陰性であった。

考 察

腸管出血性大腸菌は、現在でも年間3000例以上の感染者が国内で報告されている。分離頻度の多い O 血清群は順に O157, O26, O111 となっており、これら三大 O 血清群は全体の約97%を占めるとされている⁴⁾。今回解析した58株では O157 が37株と最も多く、次いで O26 が7株, O111 が6株となり、これら3血清型の占める割合は86.2% (50/58) であった。近年、血清型 O157 以外の non-O157 EHEC が増加していることが報告されており⁵⁾、三重県でも1996年から2001年に実施した調査で EHEC における O157 の占める割合が81.3% (170/209) であったのに対し⁶⁾、今回の調査では63.8% (37/58) まで減少していた。一般的に腸管出血性大腸菌=O157 というイメージが定

着しているが、富山県での O111 による焼き肉チェーン店での集団食中毒事例や、欧州で多くの死者を出した O104 による集団食中毒事例など、国内だけでなく世界的にも non-O157 による感染事例の増加が問題視されていることから、今後も継続的に監視していくことが重要である。

また今回、腸管付着に関与する遺伝子をターゲットとして PCR を実施した結果、菌株 No.2014021 (O115) の一株で *eae* が陰性となった。*eae* は EHEC や EPEC (腸管病原性大腸菌) の付着にかかわる因子であるインチミンをコードする遺伝子であり、ほとんどの EHEC では *eae* を保有していることが知られている。しかしながら欧州の食中毒事例の原因となった O104 の株のように *eae* を保有しない株でも強い病原性を有する例も報告されている⁷⁾。今回分離された一株も HUS を起こしていたことから、*eae* 以外の何らかの病原因子を保持している可能性が考えられ、今後詳細な解析が必要である。

EHEC が産生する Stx には Stx1 と Stx2 の 2 種類が存在し、特に Stx2 にはアミノ酸配列の異なる多くのバリエーションの存在が報告されている。また近年の研究では Stx のバリエーションの種類によって病原性に違いがあることが報告されているが^{8,9)}、その詳細については不明なところも多い。今回分離された 58 株で Stx のバリエーション解析を実施したところ、焼き肉等の喫食率の高かったバリエーションは Stx2a (80%) および Stx1a+Stx2a (56.5%) であった。さらに重症者の中で Stx2a (単独以外も含む) を保持していた人の割合は 88.5% (23/26) であった。一方で重症化率が低いとされる血清型 O26 では Stx2a を保有した株は確認されなかった。以上のことから Stx2a 保有株は食肉を介した感染が多く、さらに他のバリエーション保有株に比べ病原性が高い可能性が示唆された。しかしながら本研究では、特定の地域で分離された少数の菌株を対象としているので、今後より広範な地域の株を対象とした研究が必要である。また今回解析したなかで Stx2f を保有した株も 3 株確認された。Stx2f 型の分離は非常に稀であり、国内の報告では主に小児の下痢症患者より分離されているが、これらの感染源は明らかになっていない。今回の 3 株の事例は患者とその家族の保菌者 2 名から分離されており (クラスター M4)、患者は 11 か月の女児であった。ただ家族全員に直近の焼き肉等の喫食歴はなく、疑わしい感染源は不明であった。海外の研究では、野鳥、とくに鳩の糞便から多くの Stx2f 型志賀毒素産生大腸菌の分離例が報告されているが¹⁰⁻¹³⁾、現時点では人への感染は証明されておらず、今後さらなる研究が期待される。いずれにせよ、

Stx のバリエーション型別は、患者の重症度や予後を推察する一つの指標となる可能性があることから、分離株のバリエーション型別を実施する意義は大きいと思われる。

Stx のバリエーション解析と同様、重症化のリスク解析で注目されているのがクレード解析である。近年、Manning らの研究グループによって、96 の遺伝子座の塩基置換をもとにした MLST (multi locus sequence typing) 法が開発され¹⁴⁾、O157:H7 株は 9 つの系統 (クレード 1~9) に分類されることが明らかとなった。そのなかでクレード 8 に属する株は他のクレードと比べ HUS 発症率が有意に高いことが報告された^{2,14)}。今回解析した検体では、クレード 8 の株は確認されなかったが、クレード 8 の株を特異的に検出できる MAMA-PCR 法は簡便な方法であり、感染者の予後の早期診断に応用できる可能性もあることから、期待が大きい有用な手法と思われる。

MLVA および PFGE によるクラスター解析の結果では、全部で 12 のクラスターが確認されたが、クラスターを形成した 31 株のうち 18 株 (58.1%) で疫学的な関連性は認められなかった。ただ今回確認された 12 のクラスターのうち 4 つのクラスターでは他府県でも同一の遺伝子型の株が確認されている (未公表) ことから、広域的な散発事例の可能性も考えられた。近年、食品流通の国際化、大規模化、広域化に伴い広域散発性食中毒と思われる事例が発生している。広域におよぶ事例を早期に探知してその拡大を防ぐとともに、原因究明に向けた対策を行うことが重要であるが、迅速性に優れた MLVA 法は、よりリアルタイムに近いサーベイランスが可能となることから非常に有用な解析手法であると考えられる。今後も継続して MLVA 解析等の分子疫学解析を実施していくことが重要であるが、それとともに広域事例の調査では自治体間の連携、すなわち行政管轄を超えた協力体制を確立していくことも重要であると考えられた。

謝 辞

EHEC 菌株の提供、運搬にご協力いただきました各医療機関、各保健所、津保健所総合検査室ならびに関係各位に深謝致します。また PFGE 解析および MLVA 解析を実施いただきました国立感染症研究所細菌第一部の先生方に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, et al., (2012): Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* **50**:2951-2963.
- 2) Iyoda S, Manning SD, Seto K, et al., (2014): 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.* **12**:1 ofu061.
- 3) Ramírez Castillo FY, Avelar González FJ, Garneau P (2013): Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Front Microbiol.* **17**:147.
- 4) 伊豫田淳, 寺嶋 淳, 泉谷秀昌 他 (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. *JVM 獣医畜産新報.* **62** : 801-806.
- 5) Gould LH, Mody RK, Ong KL, et al.,(2013): Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis.***10**:453-460.
- 6) 大熊和行, 寺本佳宏, 福田美和 他 (2001) : 三重県における腸管出血性大腸菌感染症の発生動向. *三重保環研年報.* **3**:105-108.
- 7) Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, et al., (2012): Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**:3065-3070.
- 8) Eklund M, Leino K, Siitonen A (2002): Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx positive virulence profiles. *J Clin Microbiol.* **40**:458 5-4593.
- 9) Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, et al., (2002): *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* **185**: 74-84.
- 10) Schmidt H, Scheef J, Morabito S, et al., (2000): A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol.* **66**:1205-1208.
- 11) Morabito S, Dell'Omo G, Agrimi U, et al., (2001): Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol.* **82**:275-283.
- 12) Farooq S, Hussain I, Mir MA, et al., (2009): Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *LettAppl Microbiol.* **48**:692-697.
- 13) Sonntag AK, Zenner E, Karch H, et al., (2005): Pigeons as a possible reservoir of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* pathogenic to humans. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **118**:464-470.
- 14) Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, et al., (2008): Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A.***105**:4868-4873.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Mie Prefecture Stx Subtyping of EHEC and Phylogenetic Clade Analysis of O157:H7

Yuhki NAGAI, Takashi KOBAYASHI, Akihito KOBAYASHI and Shigehiro AKACHI

Keywords: EHEC, Molecular epidemiology, Stx subtype, Phylogenetic clade analysis

In fiscal year 2014, 58 patients were reported to have become infected with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in Mie Prefecture. The most common serogroups were O157 (37 isolates), followed by O26 (7 isolates) and O111 (6 isolates), and these three major serogroups accounted for 88.5% (50/58). In Stx subtyping, *Stx2a* (80%) and *Stx1a+Stx2a* (56.5%) have a high proportion of eating meat, and 88.5% (23/26) of severe cases carried *Stx2a*. Additionally, 3 isolates carried *stx2f*. In this study, the use of PFGE and MLVA analysis generated 12 VNTR clusters, with a clustering rate of 53.4% (31/58). In addition, 18 isolates out of clustered strain (n=31) had no epidemiological link. We also performed MAMA-PCR assay, which allowed detection of phylogenetic clade 8 strains. As a result, of the 58 isolates used in this study, none was found to belong to clade 8. Since recent studies have documented that clade 8 strains have a predisposition for HUS, it is necessary to monitor emergence of these potentially highly virulent clade 8 strains from a public health perspective.