

腸管出血性大腸菌の現況等について

○伊豫田 淳, 李 謙一, 窪村亜希子,
石嶋 希, 泉谷 秀昌, 明田 幸宏

国立感染症研究所・細菌第一部



本日の話題

伊豫田：

1. EHECの感染状況等
2. 血清型別について
3. HUS症例における血清診断等について

泉谷：

MLVAについて

レファレンス会議 「大腸菌」

- 他の病原体レファレンス会議とは異なり、レファレンス担当の地衛研を設定していません（菌株をお送り頂いている、またはEHECの検査に関わるすべての地衛研・保健所等を対象としています）。
- 2019年までは全国衛生微生物協議会の第一日目の午前中に開催（3年に一度感染研が、それ以外は地衛研が持ち回りで主催）。
- 2020-2021年はコロナ禍によって開催せず、2022年からオンライン開催に変更。

今年度会議参加登録：71施設, 115名以上

EHEC感染症の現況・特徴

- ・ 国内で年間 3,000-4,500 名の感染者数
- ・ 感染者の約30-40%は重症例 (小児や高齢者に多い)
- ・ 分離されるO血清群の多様化が進んでいる

経口感染 (10^2 オーダーの菌数で感染が成立)



潜伏期間 (多くは 1-8 日間, ~14日)



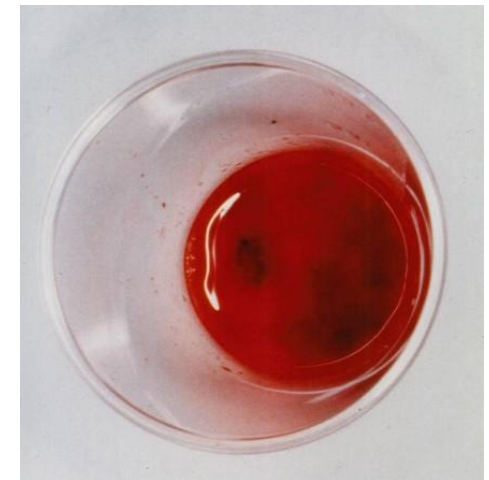
激しい腹痛, 下痢



重症例 (血便, HUS, 脳症, 死亡)

特に10才までの小児に多い (HUS発症率 : 6.1%)

患者の血便

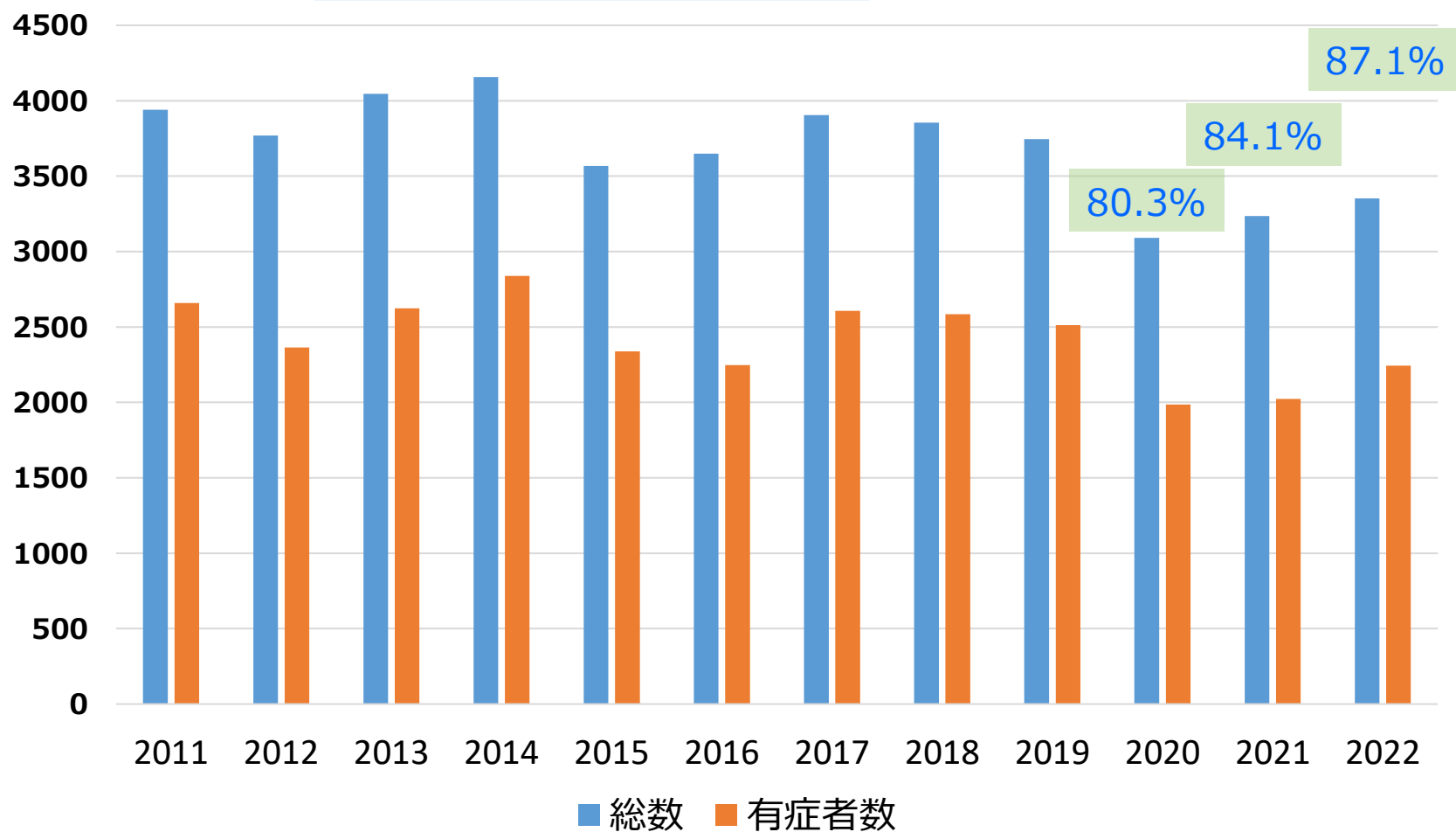


腎後遺症 : HUS患者の20-40%が慢性腎臓病へ移行

(Pediatr Nephrol. 2013; 28(11): 2097-2105)

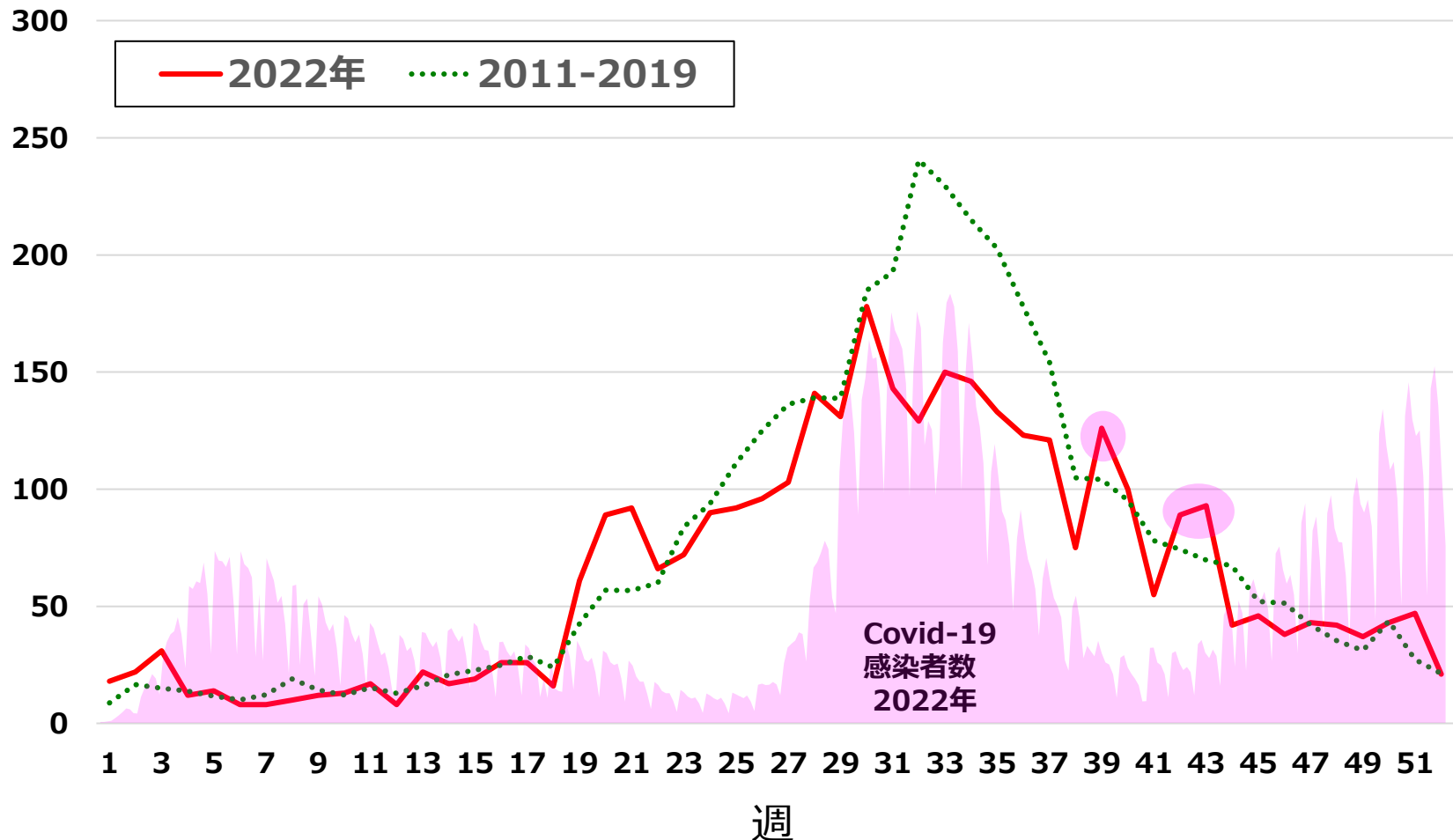
EHEC年次届出数（2011-2022）

2011-2019年平均：3,848



Covid-19パンデミックのEHEC届出総数への影響は限定的

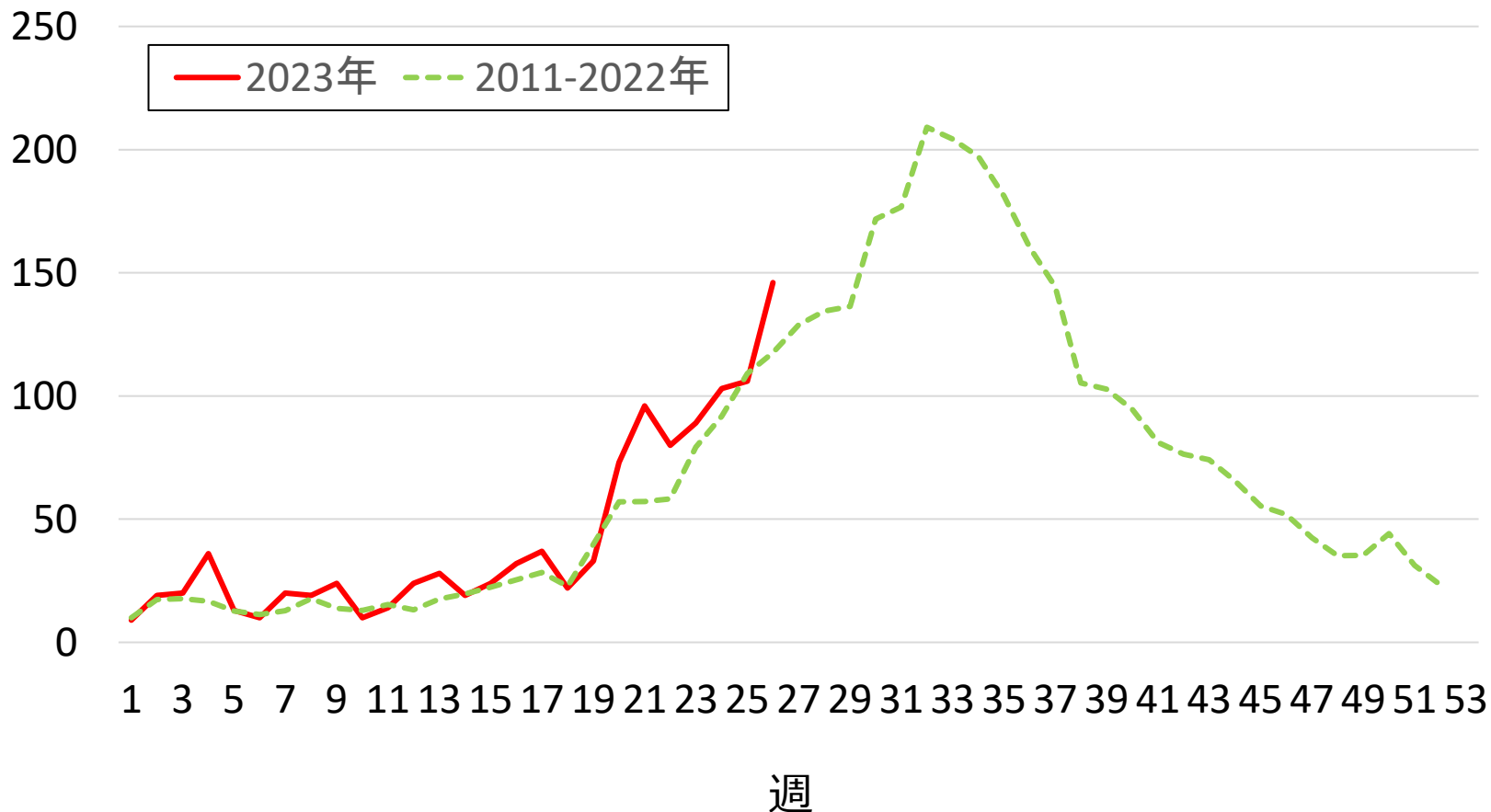
EHEC週別報告数 (2011-2019, 2022)



NESID 集計データ、2011-2019は9年間の平均数

Covid-19 2022年感染者数データ : <https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/open-data.html>

EHEC週別報告数（2023年第26週まで）



2023年第26週までの累積数：1,106
(2011-2022年の第26週までの累積数平均：918)

NESID 集計データをグラフ化、2011-2022年は平均数（2011-2019の平均数：928）

EHECによる食中毒事例・食品汚染事例

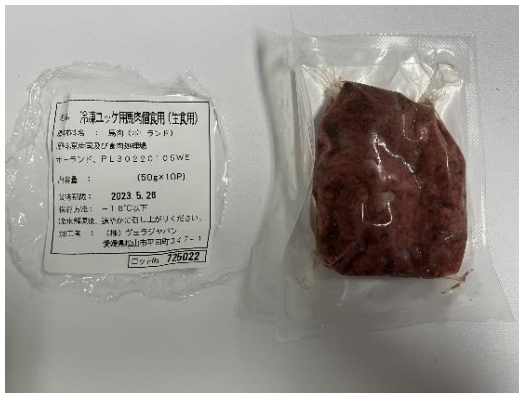
IASR 2023年5月号

<特集関連情報>

2022年8-9月に京都府で発生した**レアステーキ**等を原因とするEHEC O157
食中毒事例：患者40名（入院者6名），**死亡1名**

[厚労省HP](#)

O26（VT2産生）が検出された輸入「**馬刺し**」について
2023年2月26日



出典: 厚労省ホームページ・公開回収事案詳細
https://ifas.mhlw.go.jp/faspub/_link.do?i=IO_S020502&p=RCL202300471#

レアステーキの提供図

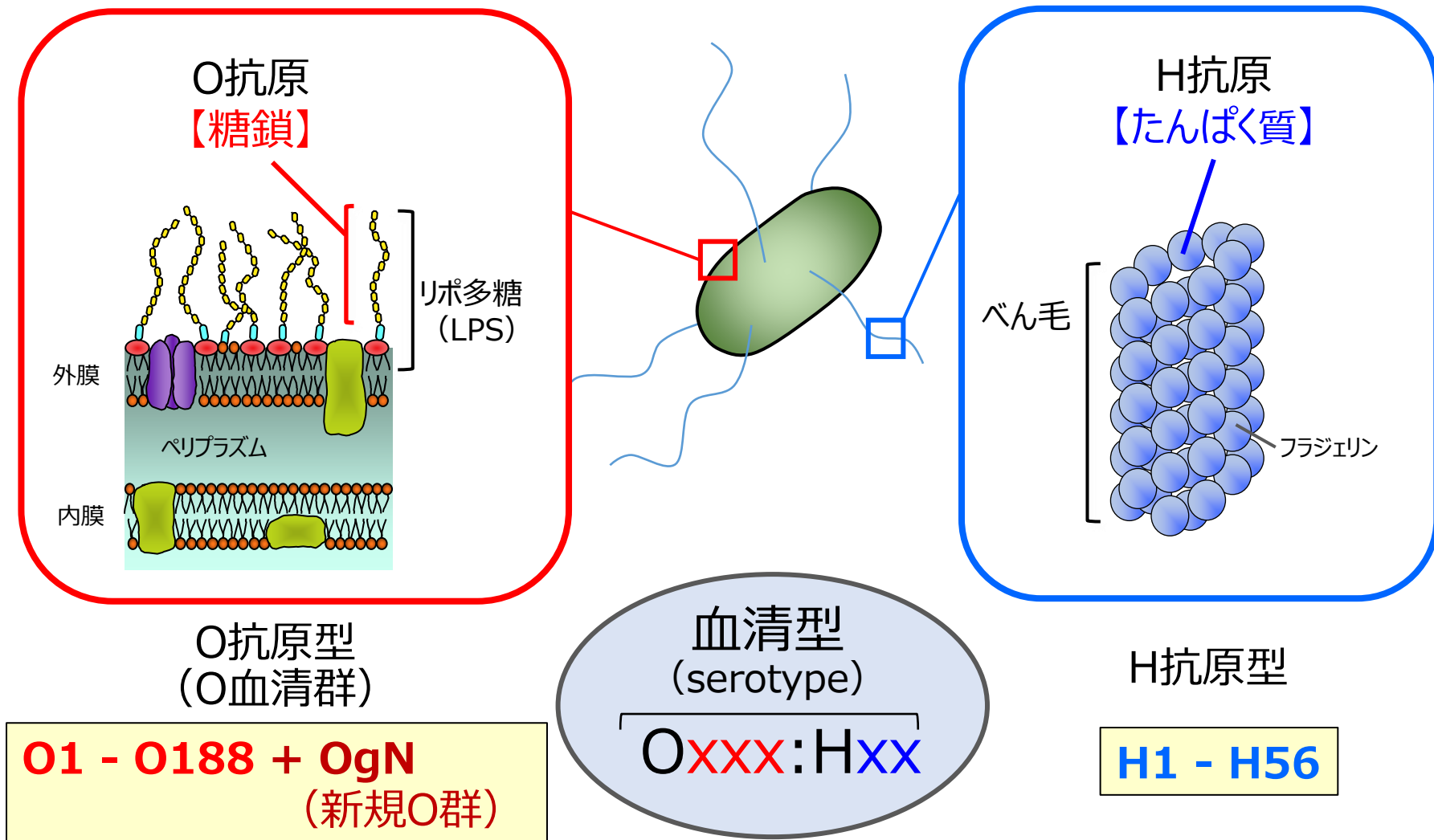


出典: 厚労省ホームページ・薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 食中毒部会資料

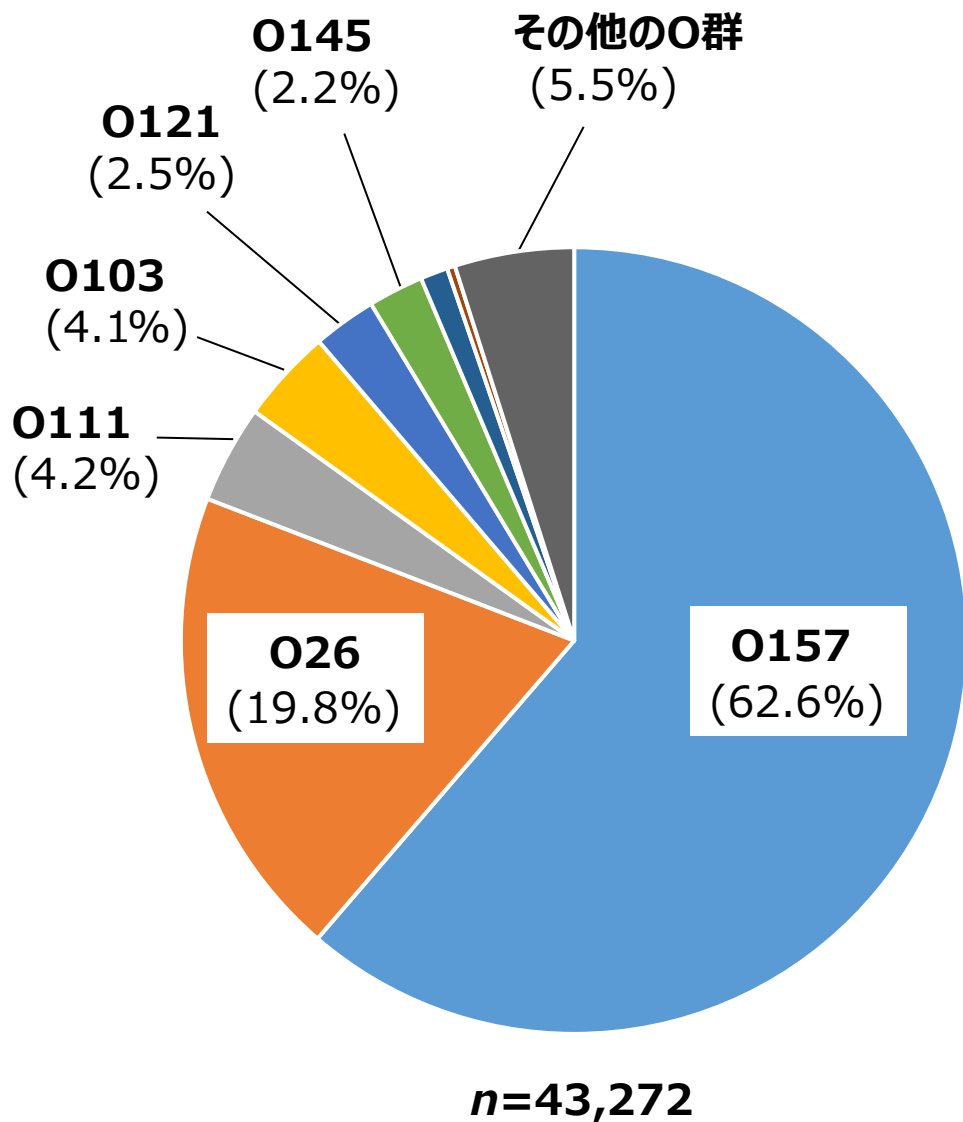
<https://www.mhlw.go.jp/content/12401000/001075569.pdf>

大腸菌の血清型

大腸菌の血清型は O:H の組み合わせで決定される（O群のみの場合は「血清群O157」などと呼ぶ）



ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2022)

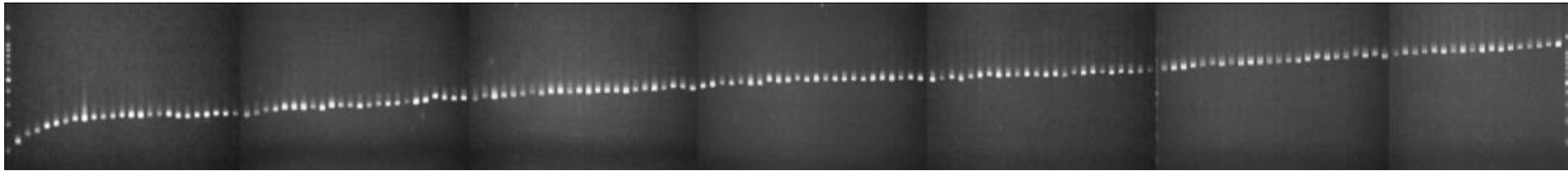


O血清群の多様化

O157, O26, O111, O103, O121, O145 以外の分離率

2007 :	2.0%	5.7%
	↓	↓
2022 :	15.4%	24.6%

E. coli O-genotyping PCR (宮崎大・井口先生)



マルチプレックスPCR法の開発 (全188種類のうち, O14とO57を除くO群を検出可能)

MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5	MP 6	MP 7	MP 8	MP 9	MP 10	MP 11	MP 12
O165	O112ac	O1	O63	O78	O91	OGp1	O9	O98	O172	O150	O40
O103	O148	O146	O6	O128	O86	OGp9	O41	O96	O88	O30	O45
O111	O158	O119	O126	O15	O152	OGp11	O33	O59	O37	O84	OGp10
O157	O114	O142	O143	O166	O8	OGp12	O108	O69	OGp8	O183	O7
O26	O144	O167	O27	O161	O115	OGp4	O174	O82	O23	O75	O182
O121	O159	O74	O168	O29	O25	OGp3	O60	O177	O163	O113	O109
O145	O169	O125	O136	O55		OGp13	O54	O71	O170	O160	O79
stx1						OGp2	O80	O95	O99	O138	O181
stx2							O92	O93	O116	O132	O171
ee											

MP 13	MP 14	MP 15	MP 16	MP 17	MP 18	MP 19	MP 20	MP 21	MP 22	MP 23
O58	O43	O102	O133	O100	O104	O184	O130	OgSB7	OgN8	OgSB9
O12	O187	O38	OGp7	O176	O53	O48	O49	OgN10	OgN6	OgSB16
O141	O180	O64	O149	O175	O155	O39	O4	OgSB17	OgN5	OgN1
O179	O173	O51	O5	O03	OGp14	O10	O52	OgSS	OgSB12	OgSB2
O11	O110	O61	O22	O76	O32	O28ab	OGp6	OgN9	OgSB18	OgN7
O140	O147	O70	O19	O85	O65	OGp5	O83	OgN31	OgN11	OgSD10
O81	O120	O35	O16	O66	O154	O36	O139	OgN12	OgN3	OgN2
O56	O185	O34	O105	O112ab	O131	O156	O24	OgSB13		
O21	OGp15	O97	O87							

MP 1-23:
整合性の評価を行い,
実用化.



O抗原型別 (感染研) :

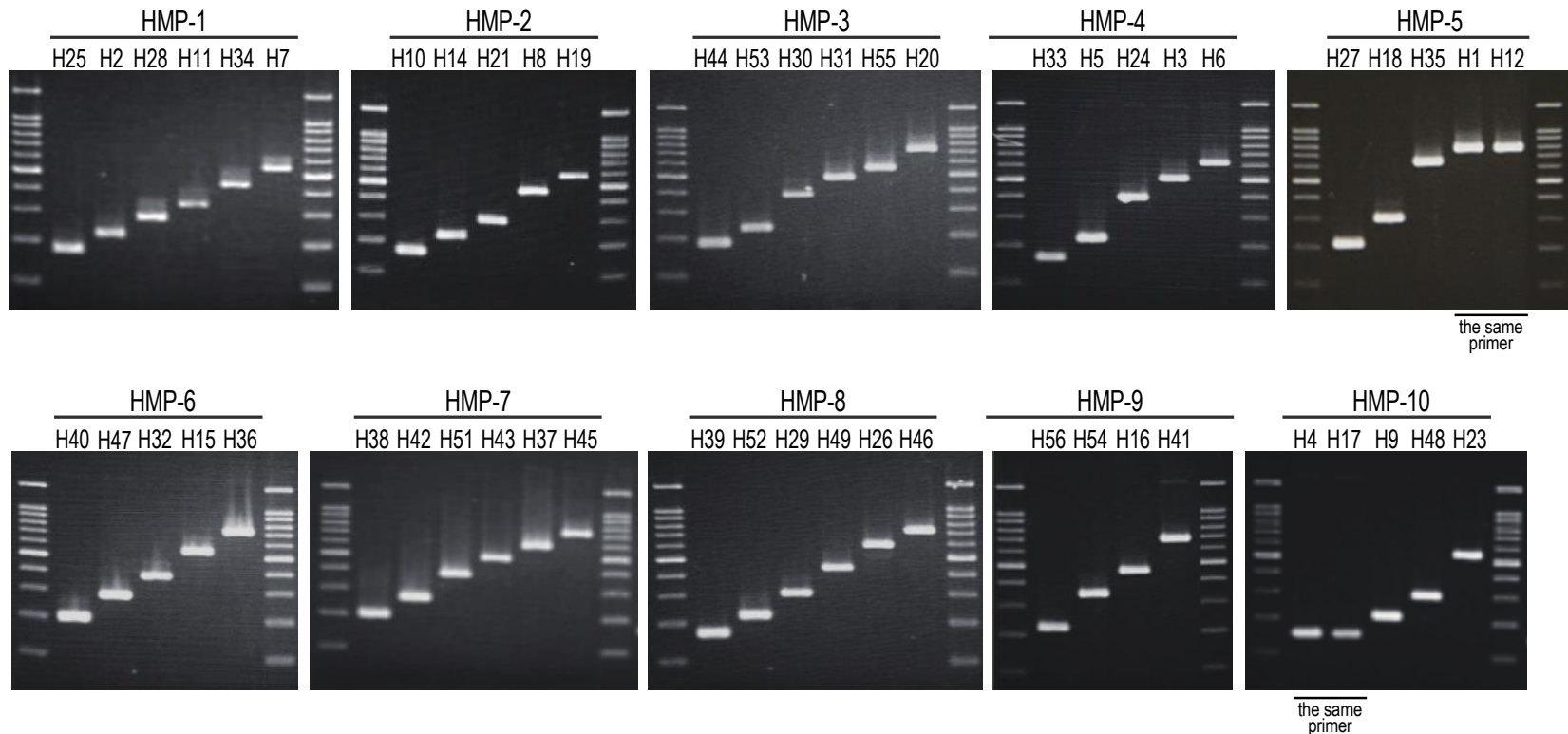
- ① O-genotyping PCR
- ② 地衛研でのO/Og型別結果と一致する場合は確定
- ③ 必要に応じてSSIの抗血清を用いた型別確認 (段階的にゲノム解析に移行)

↑MP24,MP25も使用しています!

E. coli H-genotyping PCR (宮崎大・井口先生)

マルチプレックスPCR法の開発と整合性の確認 (*J Clin Microbiol.* 56(6), 2018)

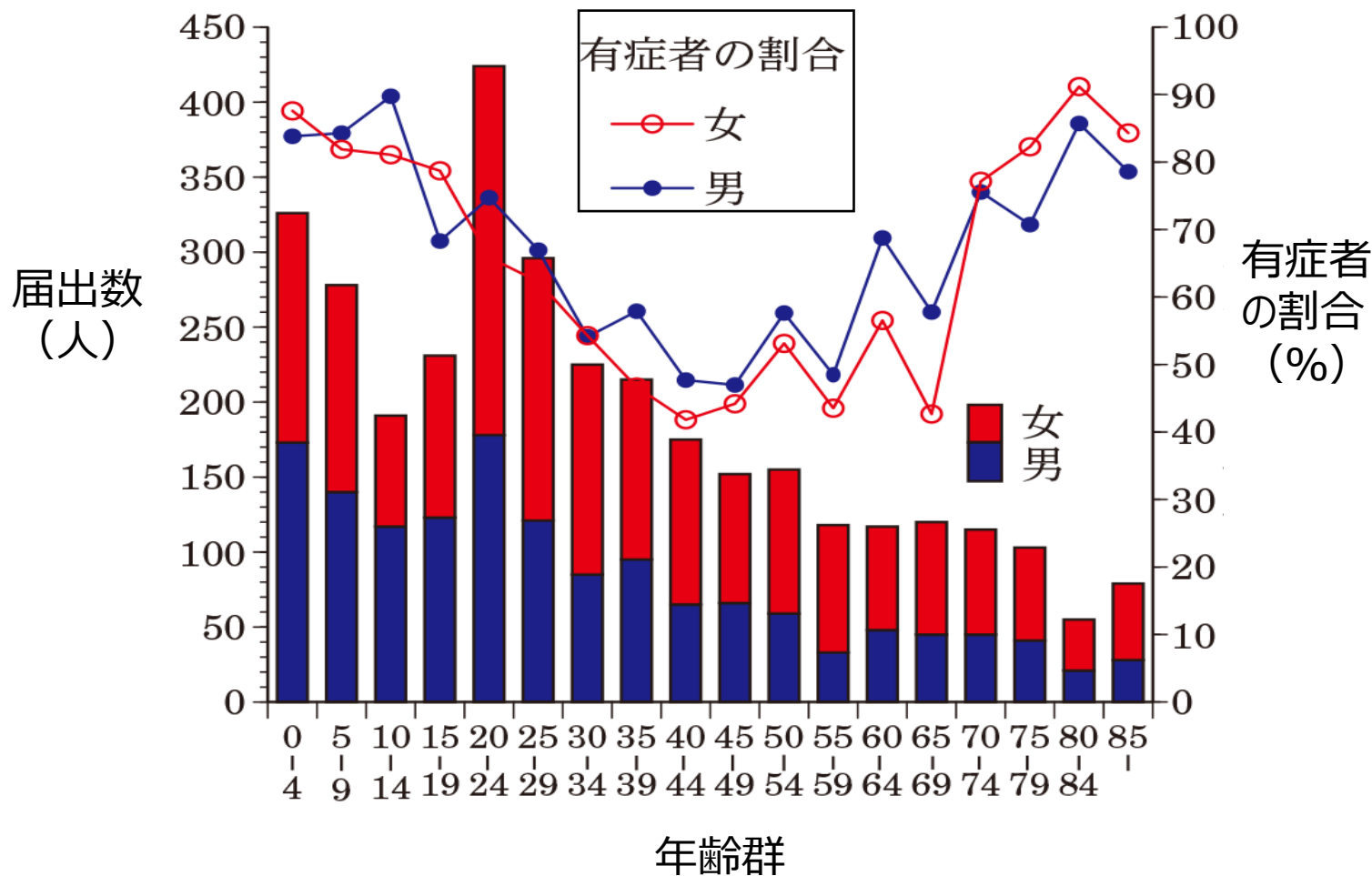
全53種類すべてのHg型を検出可能 (H1/H12, H4/H17はグループとして検出)



- H抗原型別 (感染研) : 運動性の確認およびHg-typing PCR (必要に応じて抗血清を用いた型別)
- EHEC分離株の10-20% (O群によっては100%) を占める H- (非運動性) 株のHg型が決定可能となった.



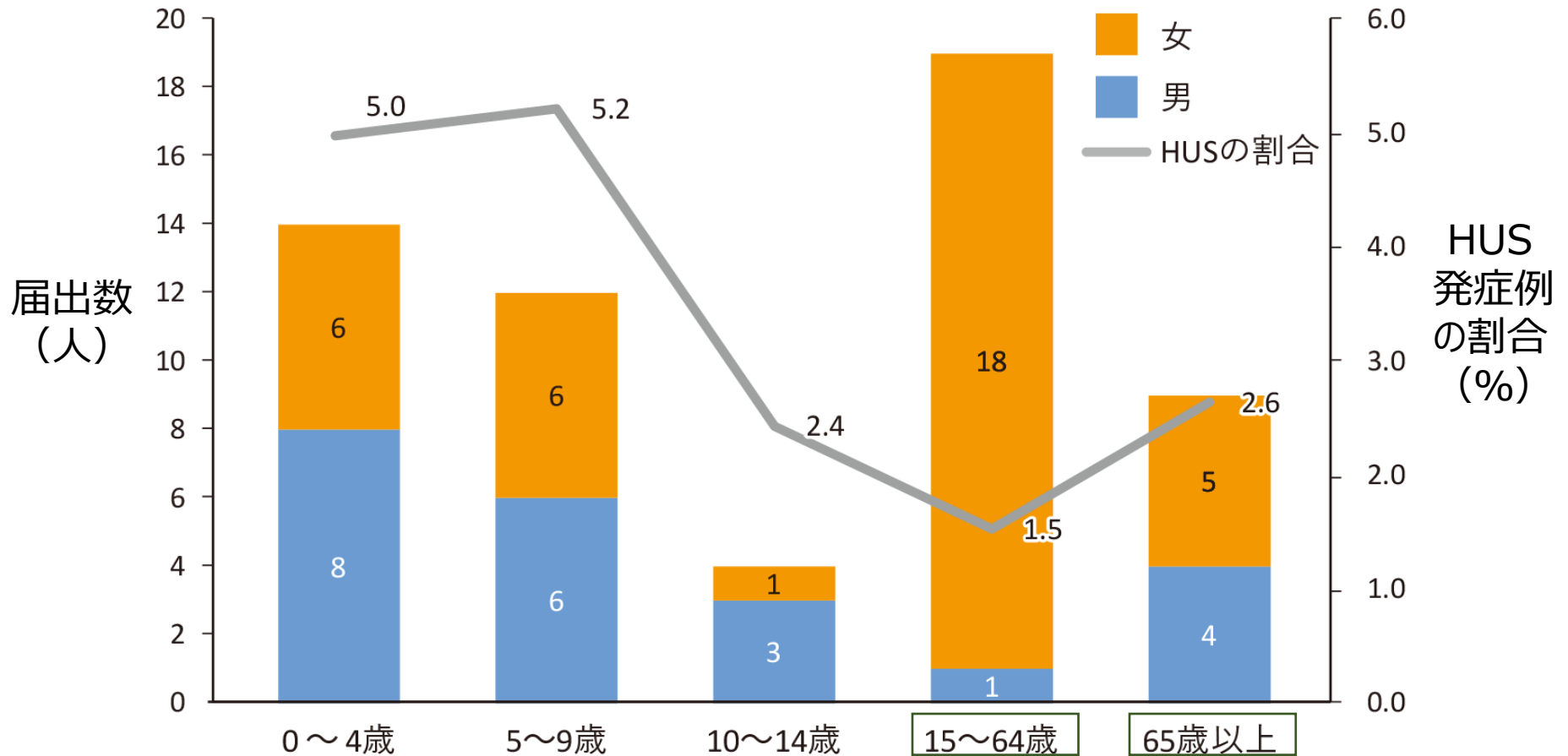
年齢別届出数と有症者の割合 2022年



病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report: IASR) 2023年5月号

年齢別HUS届出数と有症者に占める割合 2022年

IASR 2023年5月号

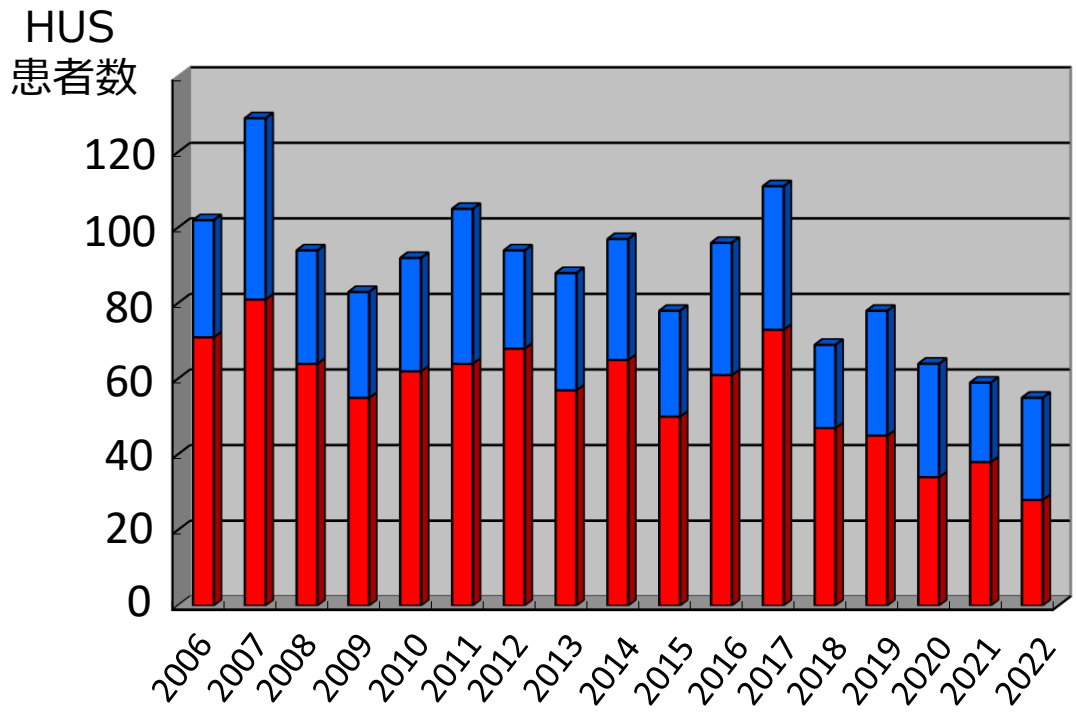


有症者におけるHUSの発症率 (2011-2022年の平均値)

0-9歳: 6.1%, ≥ 75 歳: 3.4%

HUS症例数とEHECの分離率

■ EHEC不分離のHUS症例数
■ EHEC-HUS



菌不分離のHUS症例：約35%

便中の志賀毒素または患者血清中の抗大腸菌(主要7血清群)抗体価等の測定.



陽性であれば EHEC-HUSと確定することが可能.

重症例由来主要7血清群: O157, O26, O111, O121, O103, O145, O165

HUS症例における血清診断解析依頼

血栓性微小血管障害症
(thrombotic microangiopathy: TMA)

血小板減少・溶血性貧血・急性腎機能障害

EHEC-HUS

EHEC感染症

非典型的HUS
(atypical HUS)

補体制御系異常
not EHEC-HUS
not TTP



エクリズマブ (ソリス)
ラブリズマブ (ユルトミス) 投与対象
anti-C5 mAb

血栓性血小板減少
性紫斑病 (TTP)

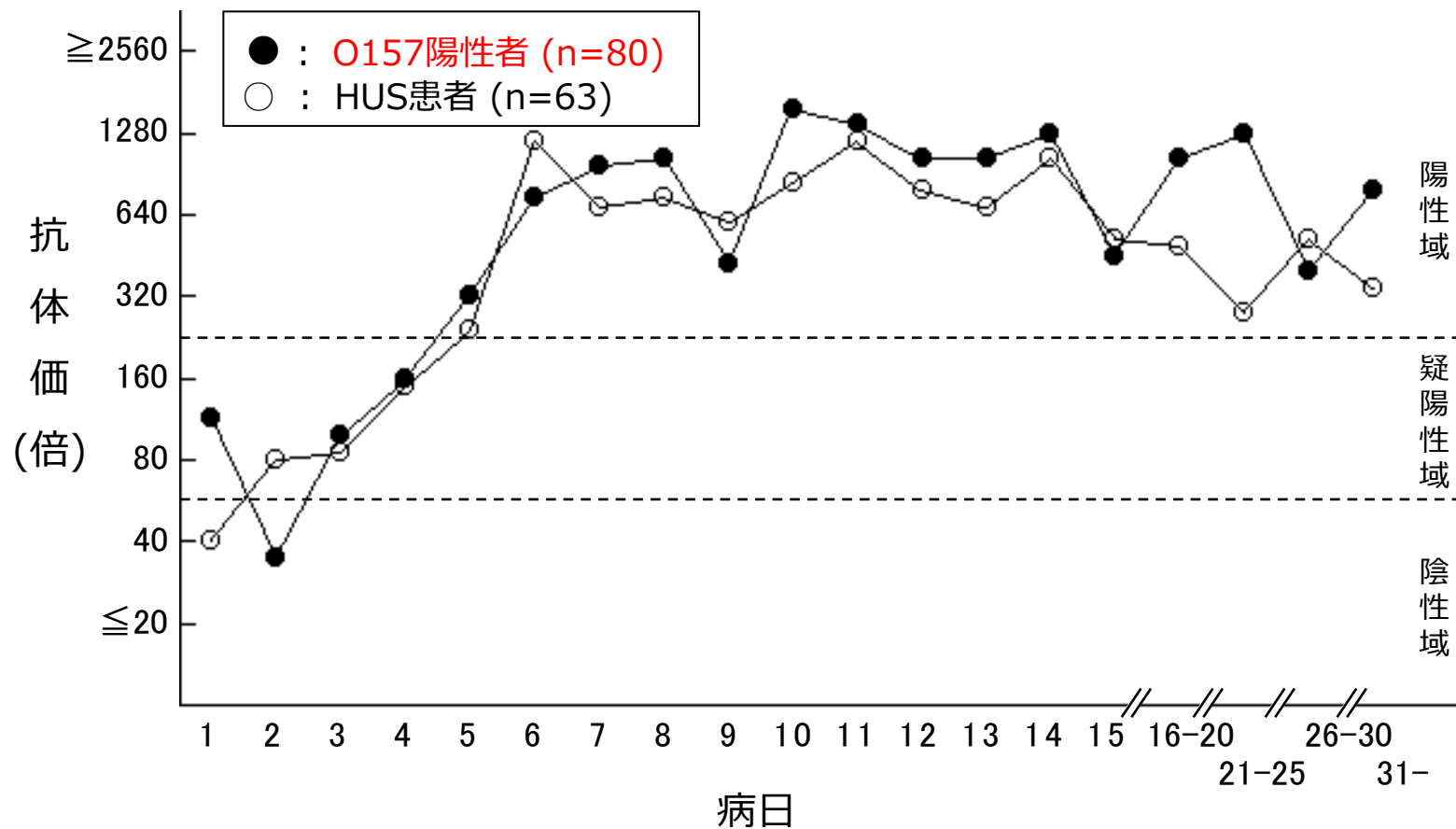
ADAMTS13活性の著減
止血因子のプロテアーゼ

二次性TMA

その他の感染症
妊娠
悪性腫瘍
自己免疫疾患
臓器移植
コバラミン代謝異常
薬剤性
悪性高血圧症
DIC

下痢発症後の病日と抗大腸菌O157凝集抗体価の推移

感染症学雑誌 第70巻 第1号: 80-86, 1996年1月 のデータを改訂



96w-plate法 (感染研) : $\times 160$ 以上で陽性判定

HUS患者血清中の抗大腸菌抗体価解析例

HUS患者（60歳男性、EHEC不分離）

発症日 5月 4日 水溶性下痢
5月 7日 血便→HUS

血清1: 5月 7日 非凝集

血清2: 11日 非凝集

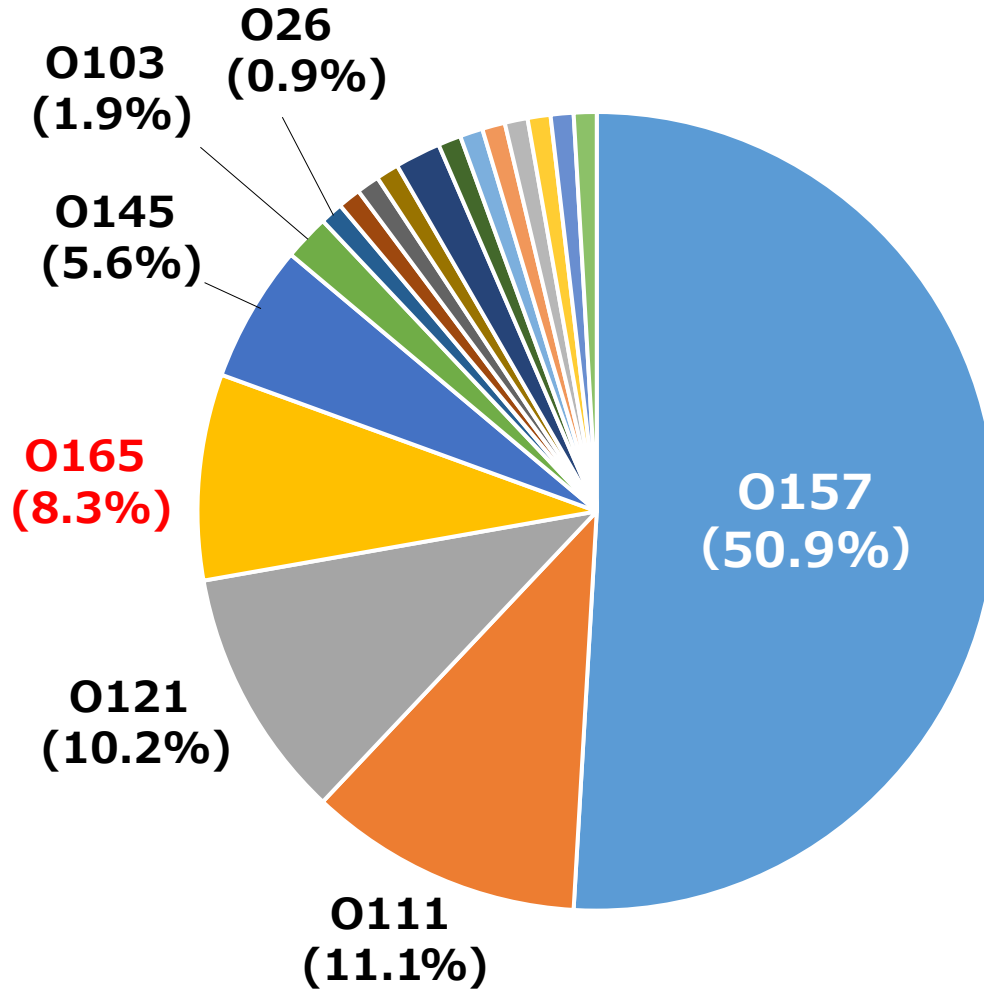
血清3: 12日 O121 (×80)

血清4: 13日 O121 (×160)

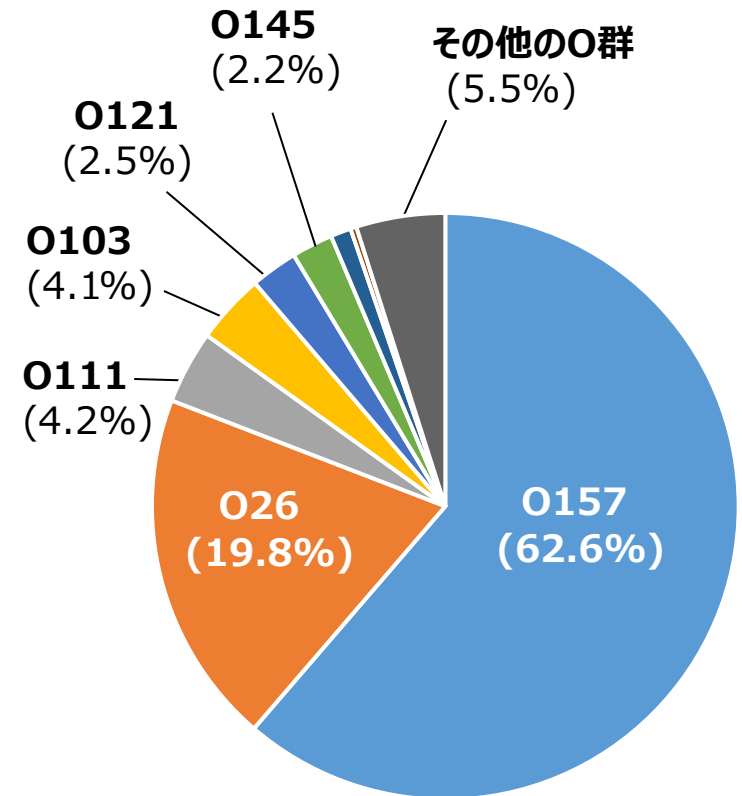
- ・ 発症日・臨床症状・血清採取日等の情報が重要.
- ・ 採取日の異なる複数の血清（出来れば発症直後と発症から7日以降の2点以上）が必要.

HUS患者の血清診断 (2009-2022)

陽性数 / 解析件数 = 93/116 (陽性率 80.2%)

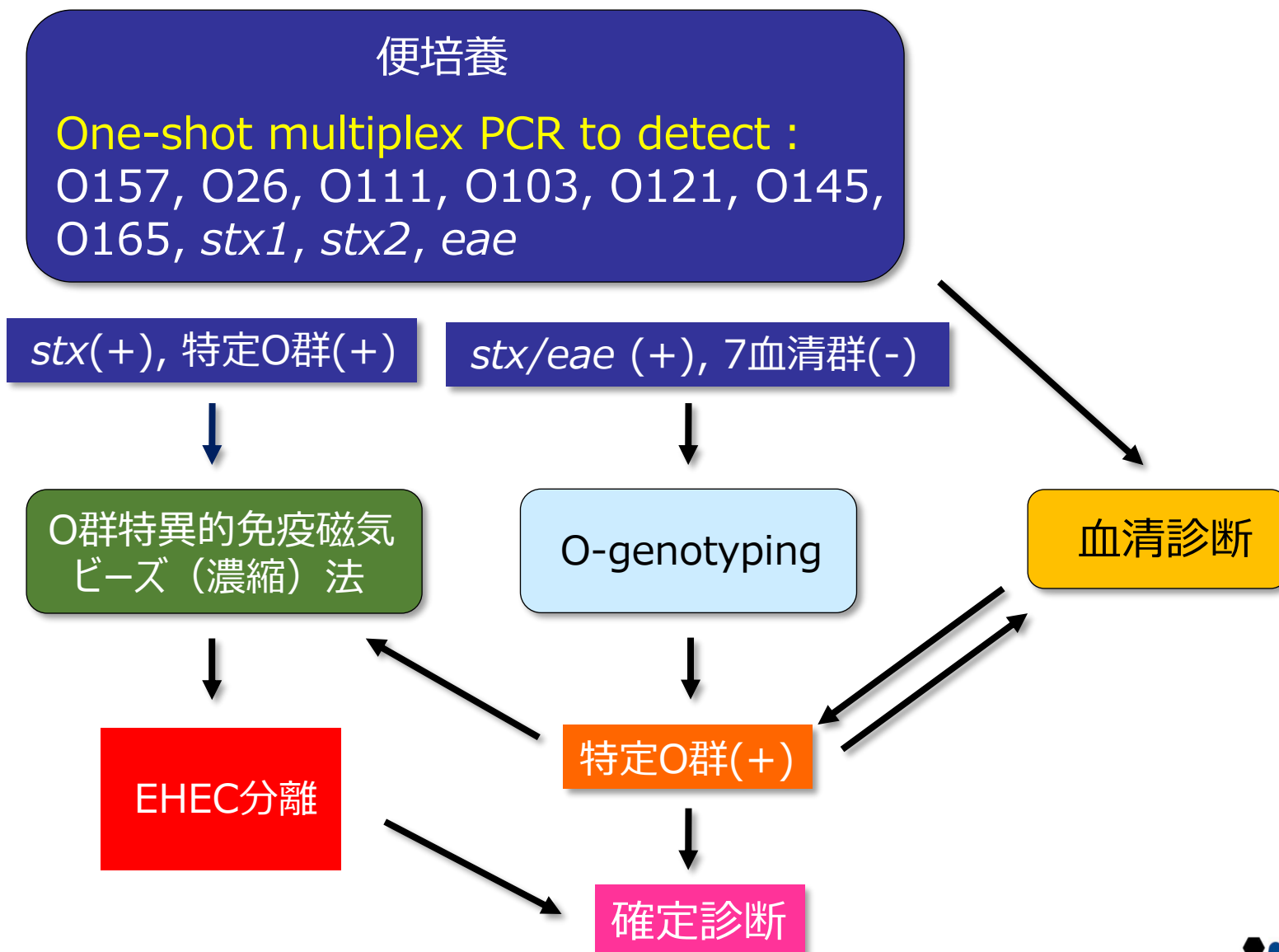


EHEC総分離数 (再掲)

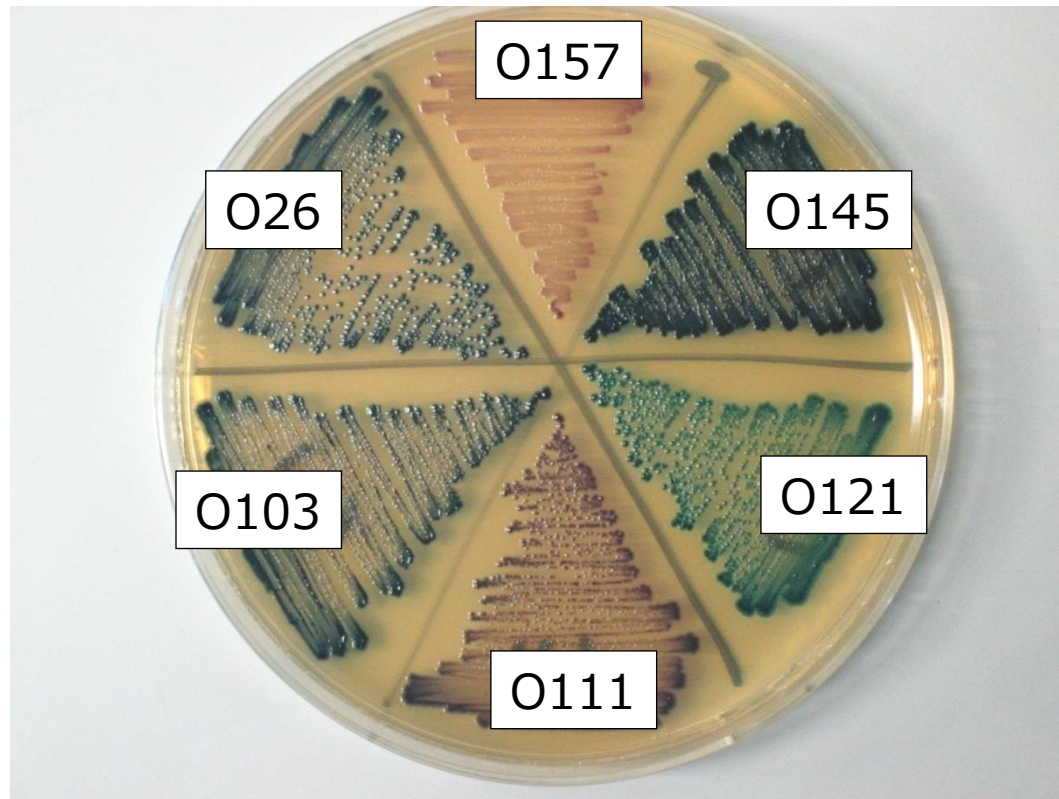


✓ 血清診断に伴って菌分離が可能となった事例: 26事例 (EHECの見逃し事例)

EHEC-HUS症例の細菌学的・血清学的確定診断法



XM-G 寒天培地「ニッスイ」

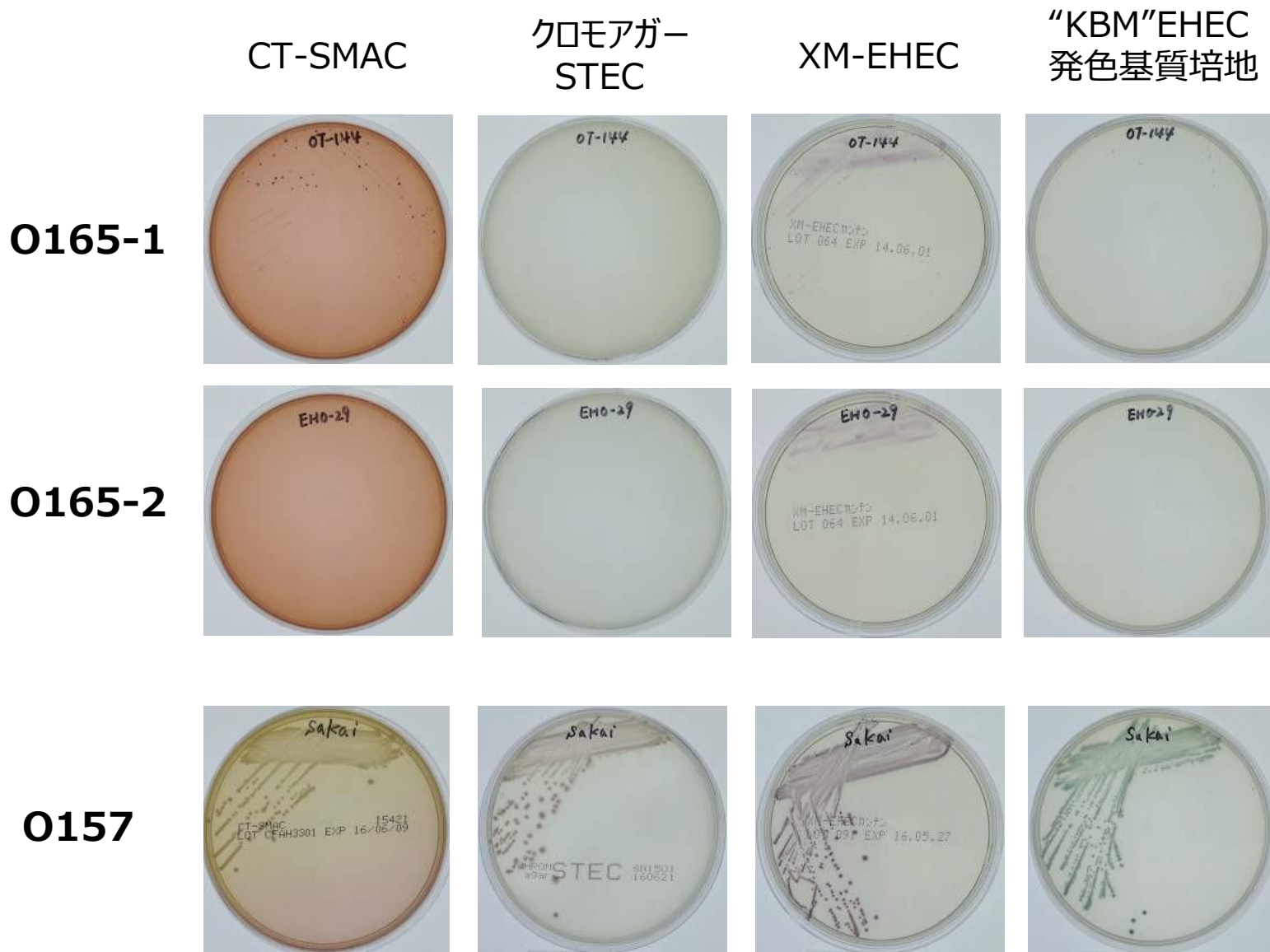


O157: Gluc (-)
O111: Gluc (+/-)
O121: Lac (-)

O165: same as O26 and O103

- 酵素基質X-GLUCは β -glucuronidase (Gluc) で分解され、青色色素を生成
- 酵素基質MAGENTA-GALは β -galactosidase (Lac) で分解され、赤色色素を生成

市販選択培地上でのO165の生育



出典：宮崎大学・農学部・井口研究室HP

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル

2022年10月改訂

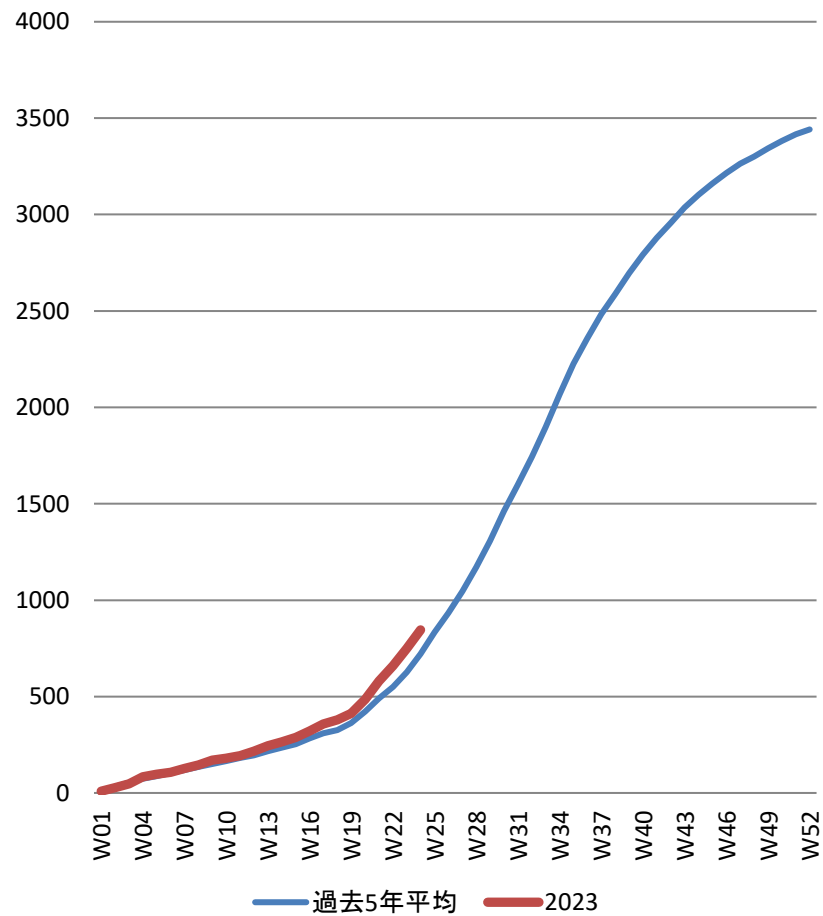
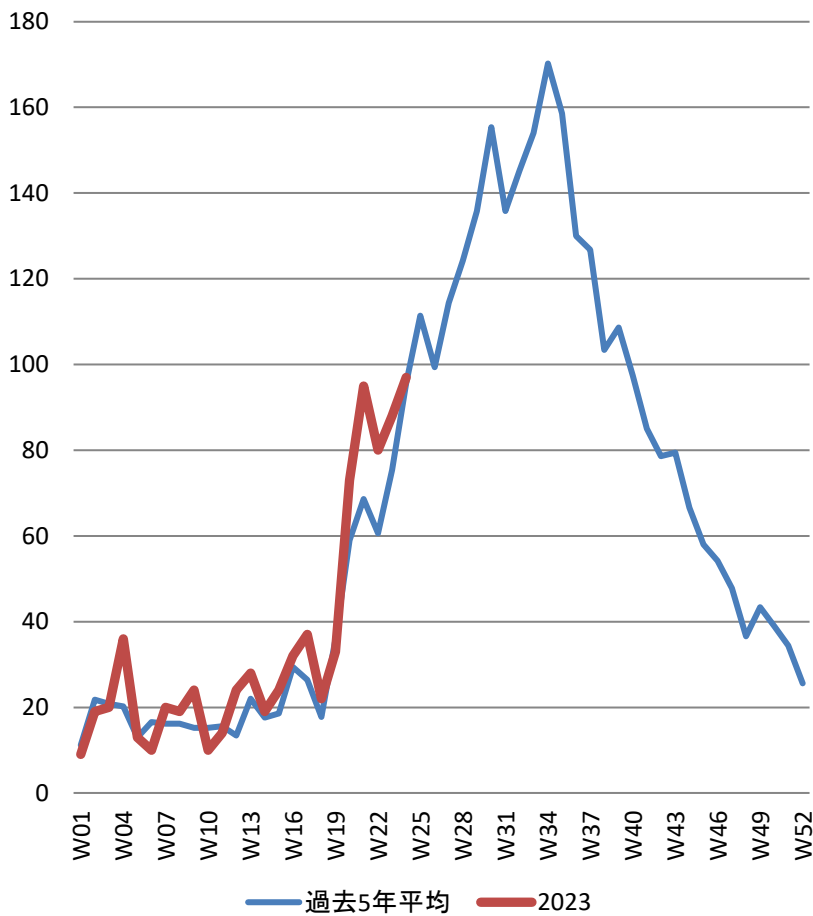
EHECの陰性確認法について追記
(厚労科研費・五十嵐班→伊藤班 R5～)

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20210907.pdf>

EHEC MLVAについて

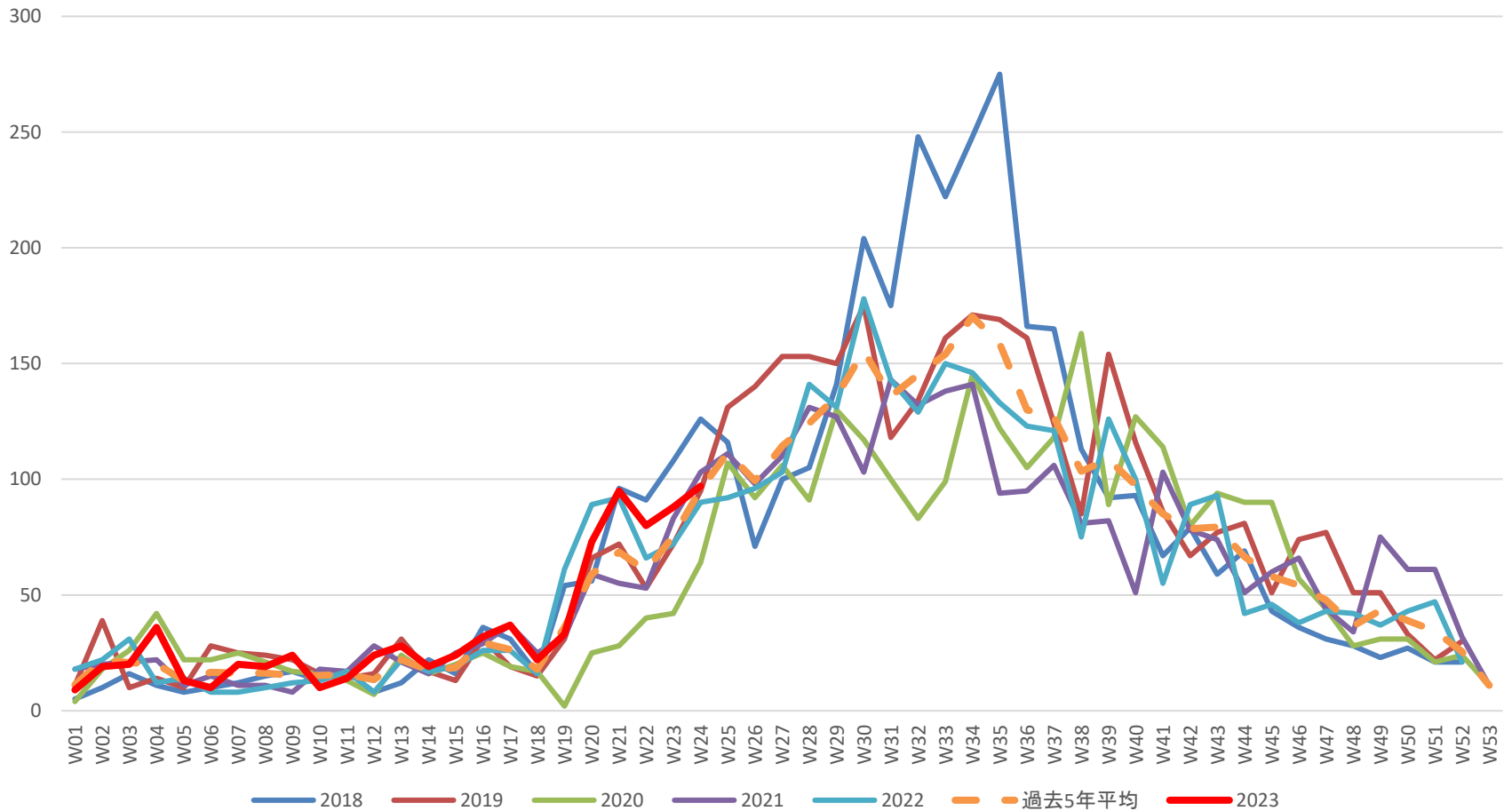
衛生微生物技術協議会
一大腸菌リファレンス会議
国立感染症研究所細菌第一部
泉谷秀昌、伊豫田 淳

EHEC感染症発生状況2023年



(NESID)

EHEC感染症発生状況 2018-2023年



(NESID)

わが国でEHECに使われてきた 分子疫学解析手法

1996

PFGE
 • la,l,l
 (RAPD)
 (ΔFLP)

2004

PFGE
 (Pulsenet
 protocol)

2012

IS-PS
 • O157
 • 32箇所の
 IS
 • +4種類の病
 原性遺伝子

2014

MLVA17

• O157
 • O26
 • O111

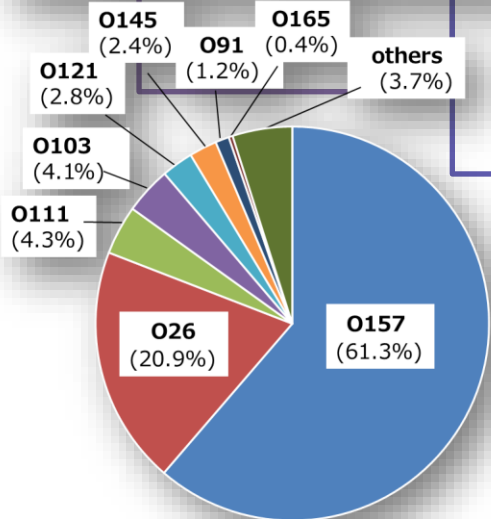
2018事務連絡

統一手法

(2017:追加5血清群)

ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2020)

n#858など



n=40,066

腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について(平成30年6月29日)

- 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒については、平成29年夏期の発生事例を踏まえ、同年11月に腸管出血性大腸菌感染症・食中毒事例の調査結果取りまとめを行い、事例の検証、今後の対応等を整理し公表しています。
- 今般、当該取りまとめを踏まえ、病因物質が腸管出血性大腸菌O157, O26, O111と疑われる場合は、下記の関係通知に加え、別紙のとおり取扱うこととしますので、実施方よろしくお願ひします。
- 別紙 1. 概要
- 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒の調査について、事案の早期探知、関係部門間の連携及び情報の共有等を目的として新たに、疫学情報に感染症サーベイランスシステムにて付与された番号(以下「NESID ID」という。)を付して管理するとともに反復配列多型解析法(Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis 以下「MLVA 法」という。)による解析結果を一覧化して共有を行うこととするため、その取り扱いについて定める。また併せて、国、都道府県等関係機関1の連携・協力体制を確保するため、腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査情報の共有手順等について定める。

腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について(再周知令和5年6月28日)

- 令和5年第1～23週までの機関において感染症発生動向調査に報告された腸管出血性大腸菌感染症の届出数は例年より多き状況で推移しており、平成26年以後で最も多くなっています。また、血清群・毒素型の内訳としてO157 VT2(ベロ毒素2型)の届出数が例年より多い状況で推移しております。
- 腸管出血性大腸菌による感染症等の調査は、平成30年6月29日付厚生労働省健康局結核感染症課・医薬・生活衛生局食品監視安全課事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」(別添)に基づいて対応いただいているところですが、引き続き、感染症部局、食品衛生部局及び検査部門が連携を図り、確実かつ可能な限り迅速な調査を行うようよろしく申し上げます。

(参考)

年別 第1～23週 腸管出血性大腸菌感染症及びO157 VT2 累積報告

年	平成26年	平成27年	平成28年	平成29年	平成30年	令和元年	令和2年	令和3年	令和4年	令和5年
腸管出血性大腸菌感染症届出数*1	485	589	472	530	664	639	477	608	665	738
O157 VT2届出数*2	47	96	63	61	86	97	63	57	64	179

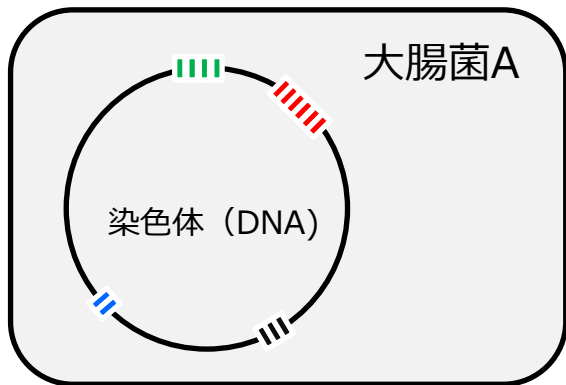
* 1 : 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) から抜粋
(各年第23週集計時暫定値)

* 2 : 感染症発生動向調査から個別に集計 (各年第23週集計時暫定値)

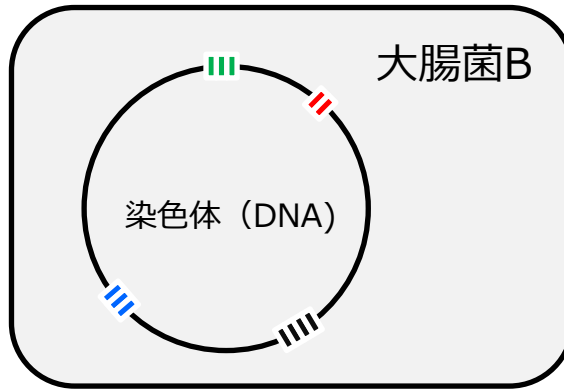
MLVAについて

原理

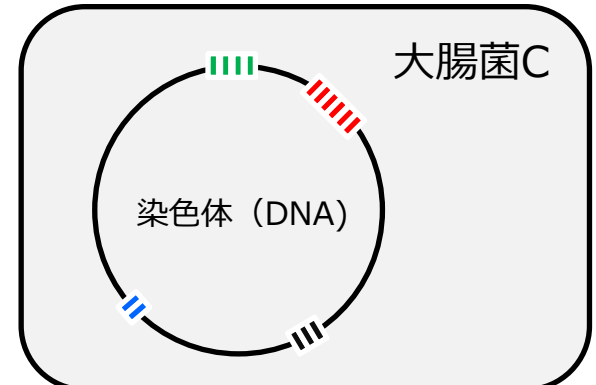
大腸菌の染色体上に存在する複数箇所（緑-赤-黒-青）の反復配列領域を解析してそれぞれの繰り返し回数を数える。



緑4 - 赤6 - 黒3 - 青2



緑3 - 赤2 - 黒4 - 青3

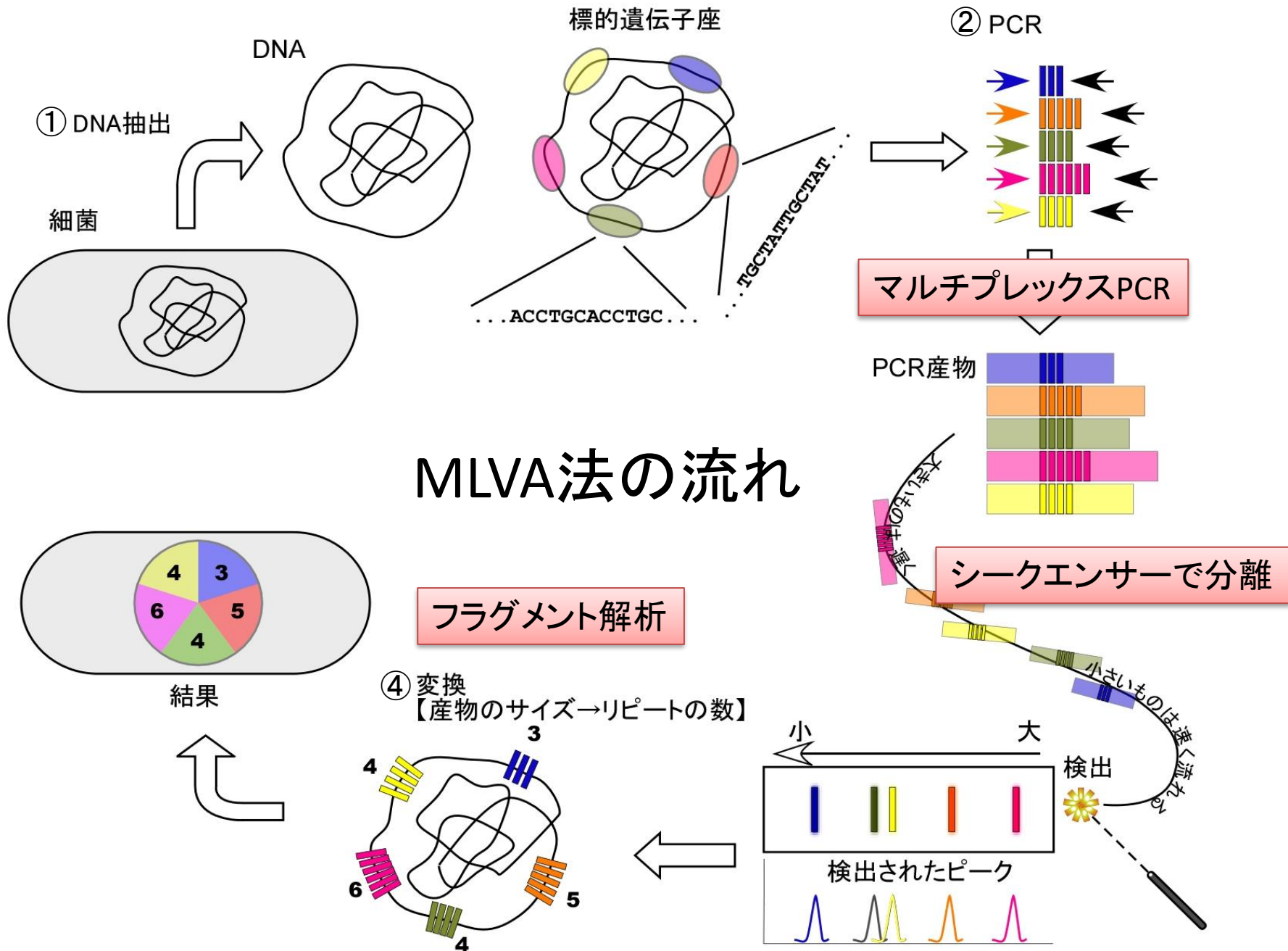


緑4 - 赤6 - 黒3 - 青2

実際のデータ

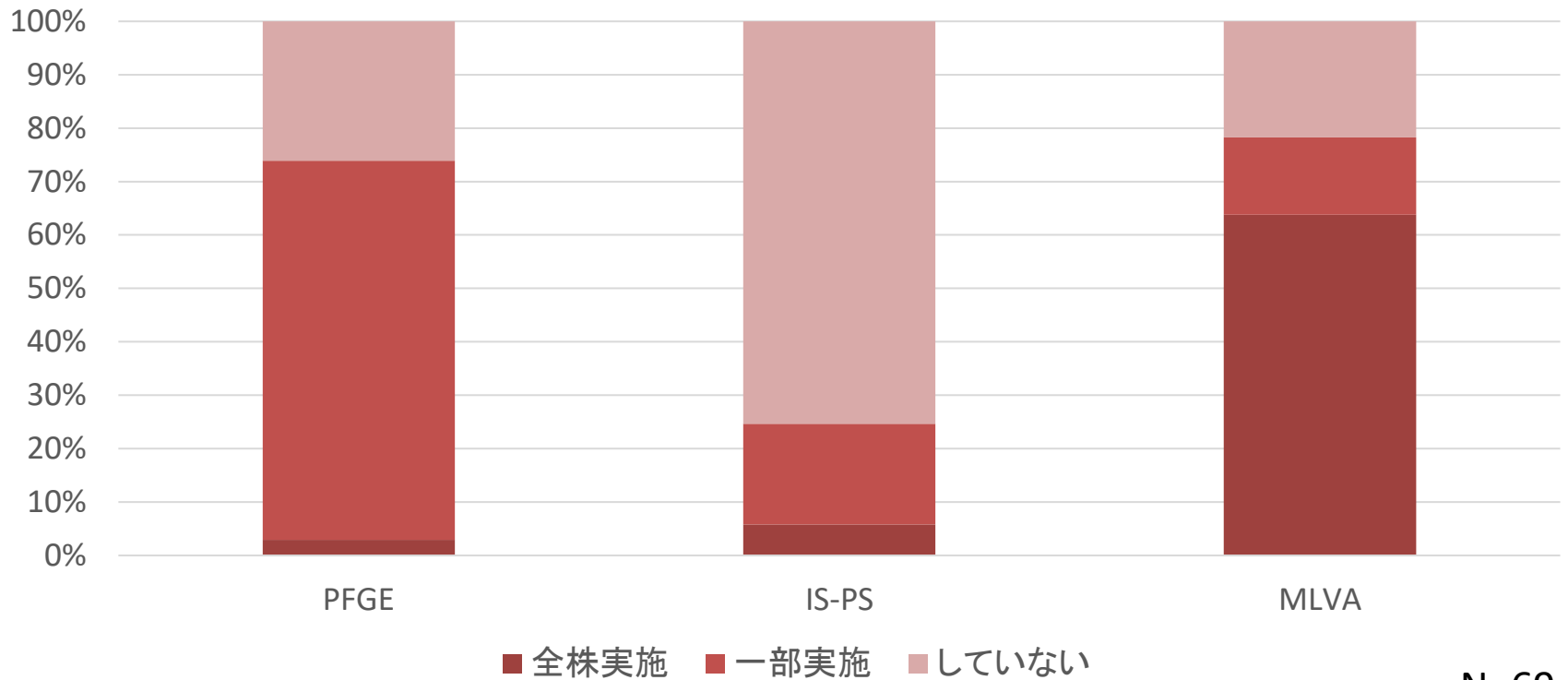
MLVA型	遺伝子座	O157-34	EHC-1	EHC-2	O157-9	EHC-5	O157-3	O157-25	EH111-8	EH157-12
	リピート数	9	8	4	11	-2	15	5	1	7
19m0487	遺伝子座	EH111-14	EH111-11	O157-17	O157-36	O157-19	EHC-6	O157-37	EH26-7	
	リピート数	-2	2	4	4	7	-2	9	-2	

(-2: 増幅産物なし)

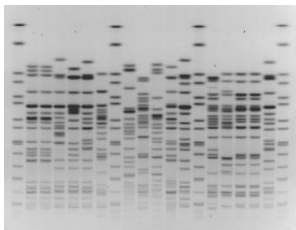


MLVA法の流れ

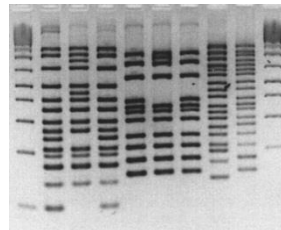
2022年アンケート 解析手法実施状況-1



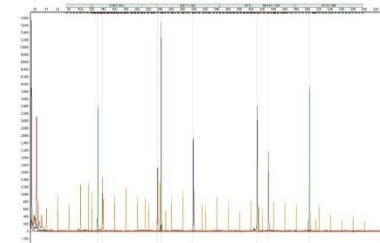
PFGE



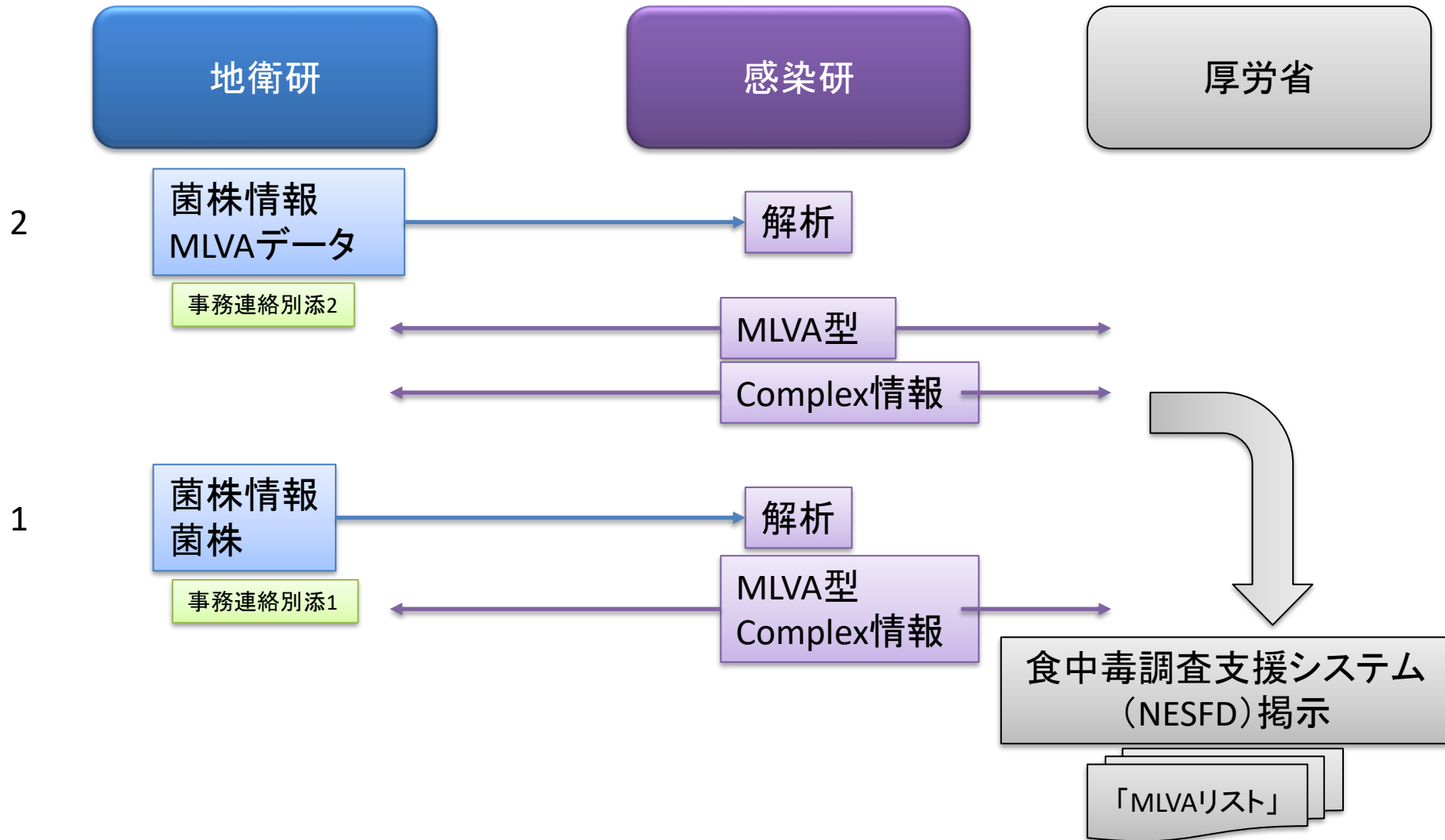
IS-PS



MLVA



送付MLVAデータに基づく MLVA型付与について(厚労省事務連絡)



別添1

別添1、2、3.xlsx - Excel

1	別添1: 地方衛生研究所等の検査実施施設から国立感染症研究所細菌第一部へ菌株を送付する際に添付																
2	発症日	分離日 (不明の場合は診断日)	地研菌株	疫学情報 (散発・集発)	症状	O:H	感染研O:H	VT1	VT2	測定法	MLVAtyp	MLVAcon	PFGE	コ	入手先	NESID#	自治体名
3	2018/4/1	2018/4/7	nnnn1			O157:H7		-	+	P,R,I					yy衛生研究所		A都
4	2018/4/1	2018/4/7	nnnn2			O157:H7		-	+	P,R,I					yy衛生研究所		B県
5	2018/4/1	2018/4/7	OS1			O157:H7		+	+	P					zz衛生研究所		C市
6	※灰色セルは、感染研入力データ																
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	
21																	

別添1 (菌株送付) | 別添2 (MLVA結果送付) | 別添3 (厚労省→NESFD)

準備完了 | アクションアイテム: 検封が必要です | 表示設定 | 160%

MLVA型付与について

導入時

- 送付済み菌株のMLVAデータ送付
- 感染研→地研

導入後

- 菌株とMLVAデータの送付（地研→感染研）
- 精度確認（答え合わせ）（感染研→地研）

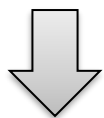
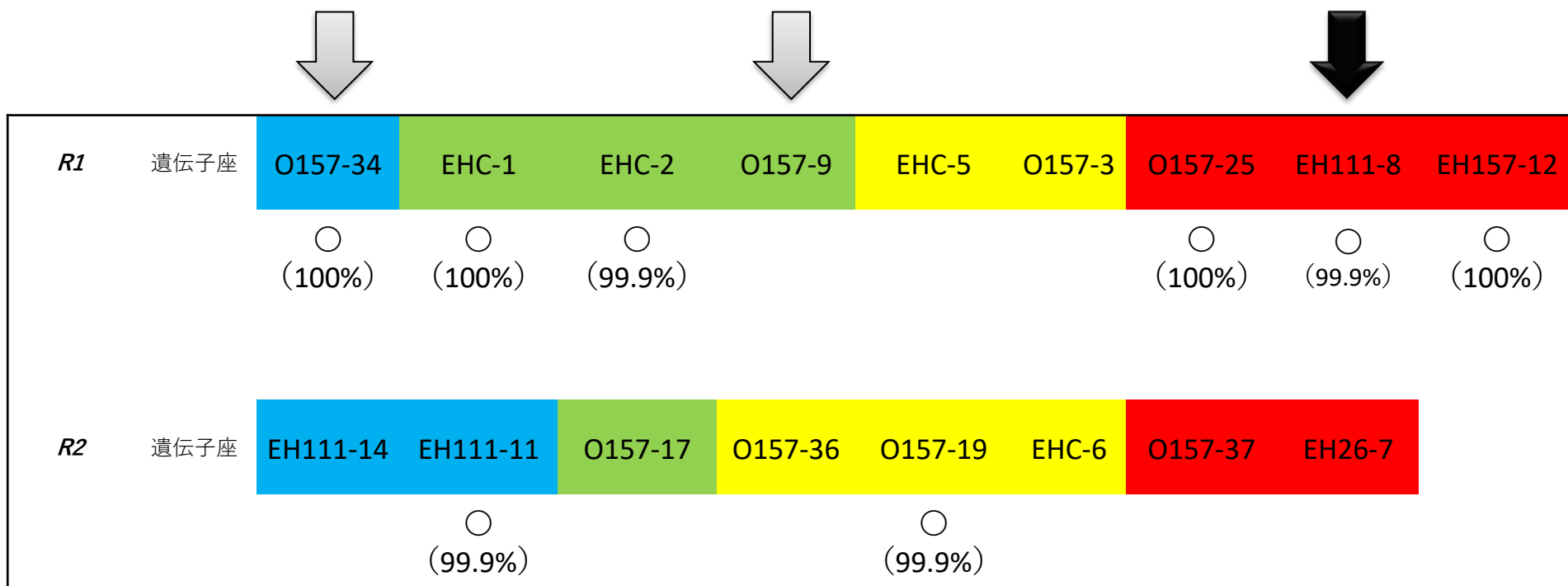
感染研側からも地研側からもデータのやり取りに問題がないと判断

型名付与

- MLVAデータの送付（地研→感染研）

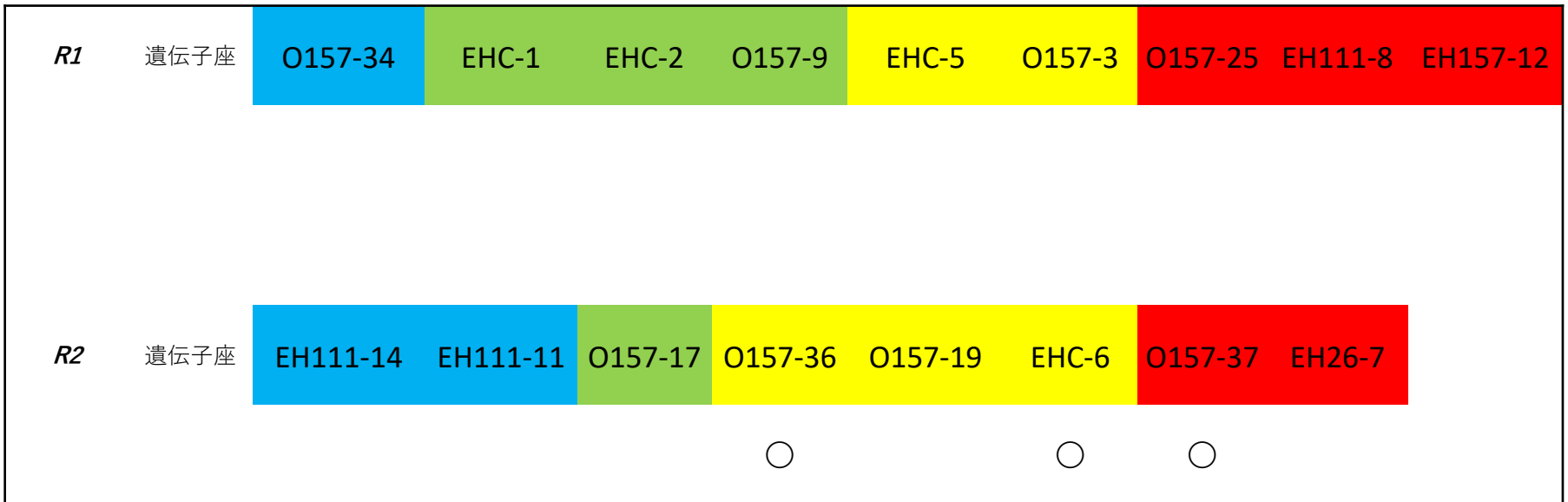
定期的に菌株を送付（地研→感染研）して精度確認（感染研→地研）

O157、O26、O111においてピークの出現頻度が99%以上(2017-2020年株)の遺伝子座

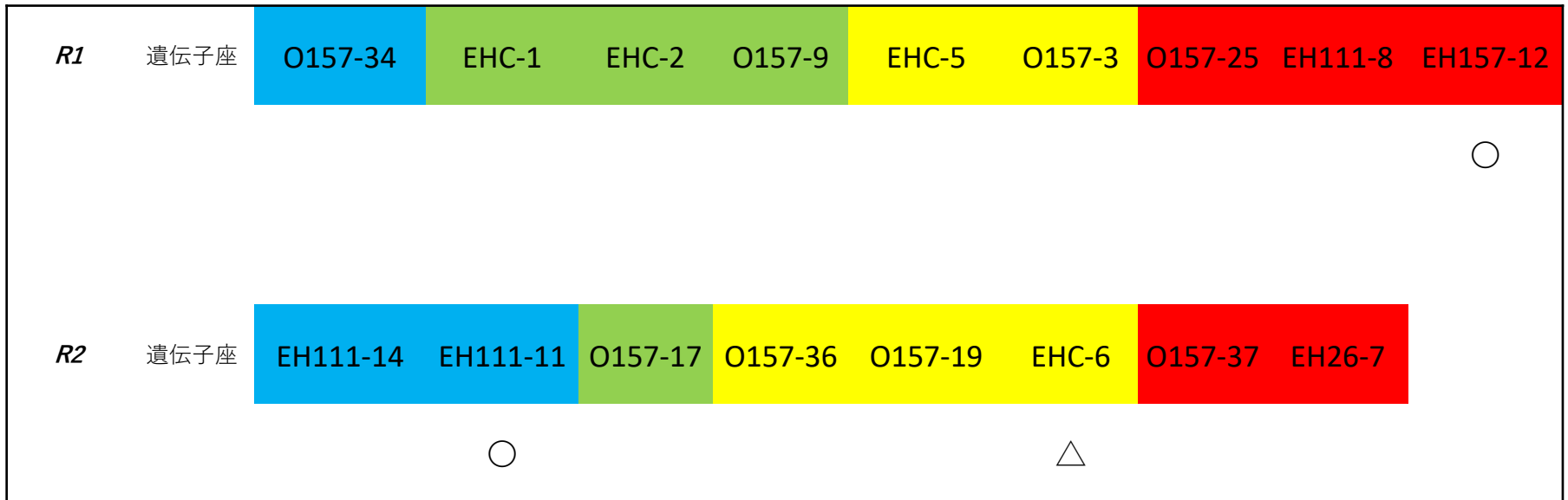


増幅効率が悪い傾向がある⇒試験の条件が良いかどうかの指標にする
(特にO157-34)

プラスミド(にあると考えられている)遺伝子座



Binからずれやすい遺伝子座



日によって泳動度が変わりやすい

MLVA型付与について

導入時

- 送付済み菌株のMLVAデータ送付
- 感染研→地研

導入後

- 菌株とMLVAデータの送付（地研→感染研）
- 精度確認（答え合わせ）（感染研→地研）

感染研側からも地研側からもデータのやり取りに問題がないと判断

型名付与

- MLVAデータの送付（地研→感染研）

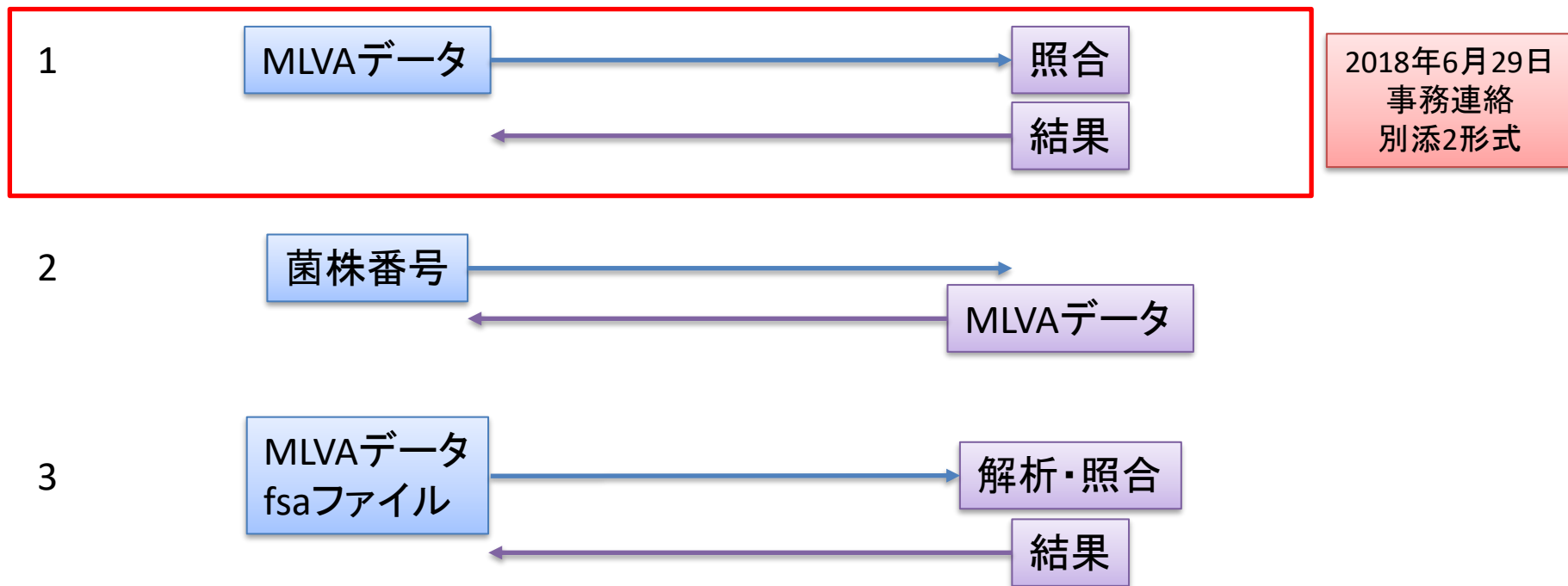
定期的に菌株を送付（地研→感染研）して精度確認（感染研→地研）

MLVAデータ精度確認について

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

地衛研

感染研



型名付与開始までの流れ

地衛研

感染研

送付済み菌株

データ送付

データ送付1

- 別添2形式

データ確認1

- 返信

データ送付2

- 別添2形式

データ確認2

- 返信

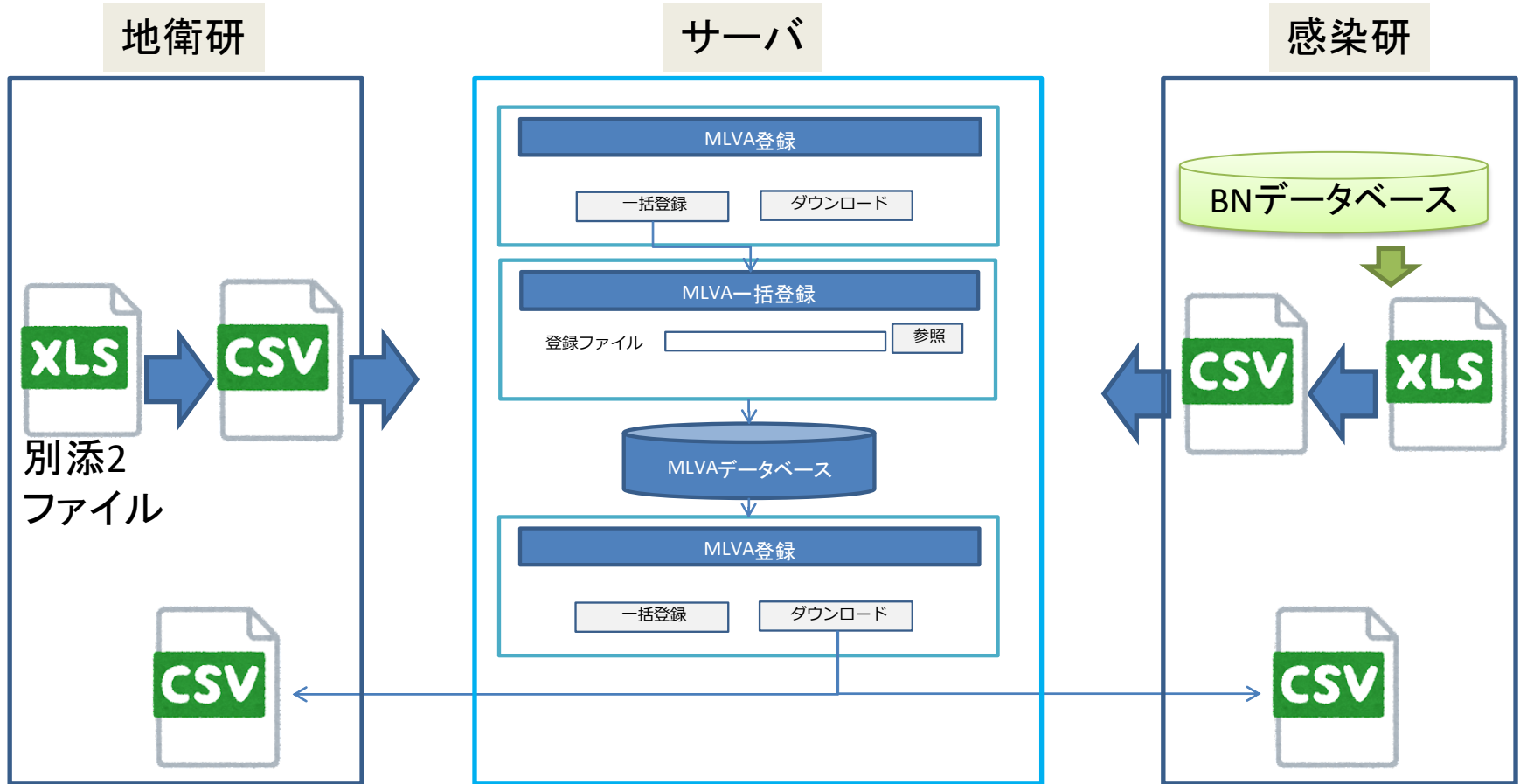
送付済み菌株に関して、複数回感染研にてデータ確認(答え合わせ)を実施し、特に問題がなければ型名付与をお受けします。

型名付与開始後の注意点

- 特段の問題がないかぎり、fsaファイルは不要です。
 - 非定型な株の場合、Binにあたらない、などの問題があった場合には菌株もお送りください。
- 型名付与を行っていても、定期的に(最低年1回)、一部もしくはすべての株を送付して、データの確認を実施してください。
 - メールベースでの型名付与
 - MLVAシステムによる型名付与
 - いずれの場合も定期的な精度確認をお願いします。

MLVAシステム

型名付与が可能
になった後の段階

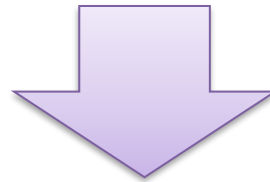


オンラインでMLVA型が取得できます

MLVAシステム

メールアドレスの型名付与の処理において、

- 送付データに明らかな問題がないこと
- ほぼリアルタイムにMLVA検査を実施してデータを送っていただいていること
- 精度確認において特段の問題が見られないこと



現在22機関に
IDを配布

MLVAシステムが利用可能となります。

MLVAデータ処理数

年	データ数
2018年	391
2019年	675
2020年	590
2021年	691
2022年	880
総計	3227

精度確認 (答え合わせ)

- メールベース、システム経由にかかわらず、定期的に菌株を送付し、精度確認を実施してください。
 - シーズンオフ中
 - 担当が変わった際

お知らせ

- 7月以後は2023年株のみと比較を行っております。
- 引き続き、菌株(ならびに情報・データ)送付のほどよろしくお願いいたします。