腸管出血性大腸菌 O2 : K1 : H7 (VT₂⁺)による 溶血性尿毒症症候群の散発事例

大田原赤十字病院小児科

小林 靖明 前山 克博 志貴 祐二

大阪府立公衆衛生研究所

塚 本 定 三

国立小児医療研究センター

永井 照美, Yuan PEINA, 中尾 浩史, 竹田 多恵

(平成 4 年 9 月 14 日受付)

(平成 4 年 11 月 10 日受理)

Key words: *E. coli* O2 : K1 : H7, hemolytic uremic syndrome,
verotoxin enterohaemorrhagic *E. coli*

要 旨

1992年2月、栃木県において溶血性尿毒症症候群(HUS)患児(1歳8カ月女児)から *Escherichia coli* O2 : K1 : H7 が分離された。本大腸菌は Vero cell に対して細胞毒性を示し、PCR 法によって VT₂のみを産生していることが確認された。本菌より LPS を抽出精製し、これに対する患者抗体を ELISA で調べた結果、抗体上昇が観察された。また、VT₁と VT₂に対する抗体も調べた結果、VT₂のみに明かな抗体上昇が観察され、本疾患の原因菌であったと思われる。これまで国内で報告された腸管出血性大腸菌(EHEC)のいずれの血清型にも属さない新しいものと思われる。患児は下痢にひきつづき第15病日より典型的 HUS の症状を呈したが、第40病日には軽快退院した。

序 文

HUS は溶血性貧血、血小板減少、急性腎不全を3主徴とする疾患で、近年、治療法の改善により死亡率も数%と低下したが、なお、小児科領域では難治性の疾患である。本疾患の原因として EHEC との関連が示されたのは1983年 Karmali らの論文¹⁾が最初であるが、その後の調査研究により^{2)~12)}、下痢血便に続発する HUS との因果関係は確実になった。予想以上に国内も本菌で汚染されていることがわかってきた¹¹⁾¹²⁾が、その検出は尚、特定の研究所、研究室レベルでしか行われ

ておらず、本菌感染症の実数はかなりの数にのぼることが予想される。本菌のもう1つの診断上の問題は、患者の便中に排出される期間が短いことである。Milford らは第0~3病日で約6割、第11~13病日では2割にしか検出できないと報告している¹⁰⁾。これを補うべく、Chart らは患者血清中の EHEC 菌体に対する抗体を測定することが有用であることを提案した¹³⁾。我々もこれを追試確認し、応用実施している¹²⁾。しかし、EHEC に属する大腸菌の O 血清型は多数あり¹¹⁾¹⁴⁾、国内で報告されただけでも O157の他に、O26, O111, O128, O143, O145がある。さらに、1991年、都内の集団事例から OUT : H19が、1992年1月には埼玉で O18 : H (-) が、2月には OUT : H (-) が広島で分離されている¹⁵⁾。血清による抗体検査を行

別刷請求先：(〒154) 東京都世田谷区太子堂 3
—35—31

国立小児病院小児医療研究センター感染
症研究部 竹田 多恵

う上でも、国内に分布する EHEC の血清型は重要な情報である。今回われわれが分離した O2:K1:H7 はヒトからの分離報告は国内で初めてであり、海外でも稀である。

材料および方法

(1) 症例

1 歳 8 カ月女児。1992 年 2 月 20 日から下痢が 7 日間持続。血便は認めなかった。3 月 3 日から眼瞼浮腫の出現。同 6 日近医にて血尿、蛋白尿も指摘され、同日大田原赤十字病院小児科に紹介入院となった。自宅は水道水を使用しているが、週に 1 日実家（那須郡小川町）で井戸水を飲用していた。入院前に抗生剤の内服はない。

入院時、体温 38.1℃。軽度眼瞼浮腫および眼瞼結膜貧血。頸部から腹部にかけて数個の点状出血。四肢の浮腫は明瞭ではなかった。検査結果は Table 1 に示したように、貧血、血小板数減少、破碎赤血球が認められた。網状赤血球の増加とハプトグロビンの減少から、溶血性貧血が示唆された。BUN と LDH の高値、尿蛋白、尿潜血等から腎機能障害が認められた。尿量は入院当日および翌日で各々 187ml、136ml と乏尿傾向が続き、血清

BUN は第 3 病日さらに 32.2mg/dl と悪化した。が、過度の輸液は避け、利尿剤の併用で尿量の増加がみられるようになり腎機能は漸次改善した。血小板数、ヘモグロビン値も改善され、眼瞼浮腫、点状出血も入院後 6 日までに消失した。経過中にけいれんなどの中枢神経症状は認めなかった。入院後 5 日間 AM-PC の内服を行い、他に dipyr-idamole の内服を併用した。

入院後 25 日目には、ヘモグロビン 10.8g/dl、血小板数 $27.6 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、BUN 9.8mg/dl、LDH 720 IU/l、尿タンパク（-）、尿潜血（±）と改善を認め、退院した。

(2) EHEC の検索

入院時の便培養から得られた大腸菌 10 株を用いて PCR により VT 遺伝子の検索を行った。PCR に用いた VT 用の primer および protocol は山崎らの方法¹⁸⁾に準じた。

(3) Vero 毒素の生物学的性状試験

分離した大腸菌を Tryptic Soy Broth (Difco) で 37℃ 18 時間振とう培養し、培養上清と菌体抽出液（超音波破碎により得た）を各々 2 段階希釈し、常法により¹⁷⁾Vero cell に作用させた。細胞に試料を作用させた後、5 日間観察して細胞致死効果を示す試料の最大希釈倍数を求めた。

(4) 大腸菌の血清型別および生化学的性状

大腸菌の O 型別は、市販の診断用免疫血清（デンカ生研）を用いての生菌でのスライド凝集反応、および自家調製した大腸菌抗 O 血清（O1~O170）を用いての 100℃、60 分加熱菌による試験管内定量凝集反応により実施した。K1 抗原については、抗 K1 血清による生菌でのスライド凝集反応および英国の Central Public Health Laboratory の B. Rowe 博士から分与された A~E の 5 種類 K1 特異ファージによる溶菌性の有無で調べた¹⁸⁾。H 型別は自家調製した抗 H 血清（H1~H56）により、常法に従って行った¹⁹⁾。生化学的性状は Ewing¹⁹⁾の記載に準じて実施した。

(5) 患者血清中の大腸菌 LPS 抗体および VT 抗体の検出

大腸菌 O26, O111, O128 の LPS は市販品（Difco）を用いた。O143, O145, O157 および本患

Table 1 Laboratory data on admission

Peripheral blood	BUN	26.2 mg/dl
WBC 8,700/mm ³	Creatinine	0.5 mg/dl
RBC 337×10 ⁴ /mm ³	GOT	80 IU
Hb 9.2 g/dl	GPT	28 IU
Ht 26.6 %	LDH	2,134 IU/l
Plat 1.2×10 ⁴ /mm ³	T-Bil	1.6 mg/dl
Ret 40 %	T-P	5.6 g/dl
Urine	Alb	3.9 g/dl
Protein 340 mg/dl	Al-P	779 IU
Sugar -	Ca	9.1 mg/dl
Occult blood ++	IP	5.1 mg/dl
Sediment	T-Cho	162 mg/dl
RBC 5-6/HPF	Serology	
WBC 5-6/HPF	IgA	94 mg/dl
Epithel 3-4/HPF	IgM	295 mg/dl
β ₂ MG 275 μg/l (≤230)*	IgG	825 mg/dl
NAG 15.7 u/l (≤7)	C ₃	92 mg/dl
Biochemistry	C ₄	45 mg/dl
Na 136 mEq/l	Haptoglobin	<10 mg/dl
K 4.7 mEq/l	CRP	0.0 mg/dl
Cl 103 mEq/l		

* () : Normal value

者から分離した大腸菌 O2 からの LPS は Westphal 法²⁰⁾で調製した。これら 7 種の LPS を固相とした ELISA²¹⁾で IgM class の抗体を調べた。VT 抗体は精製した VT₁ および VT₂ を固相として IgG class の抗体を ELISA で調べた¹²⁾。

成 績

(1) EHEC の検出

入院時（第15病日）の患者便より分離した大腸菌 10 株を VT₁ と VT₂ に共通の primer を用いて PCR を行った結果、1 株のみから遺伝子増幅 (0.5 kb) が認められた (Fig. 1a)。これを VT₁ および VT₂ を各々識別する primer で再び PCR を行った結果、Fig. 1b に示すように VT₂ のみの遺伝子 (0.8 kb) が増幅された。

(2) Vero 細胞毒性

VT₂ 遺伝子が陽性であった株の培養上清と菌体抽出液を Vero cell にあて、5 日間観察した結果、両者から約 32 倍希釈まで明かな細胞致死効果が観察された。

(3) 大腸菌の血清型別と生化学的性状

分離した VT₂ 陽性大腸菌は市販の診断用血清のいずれにも凝集しなかったため、自家調製した O 型別用血清を用いて調べたところ、O2 血清に強く凝集した。また、H 型別では H7 とのみ明瞭な凝集が観察された。さらに、分離菌は抗 K1 血清に凝集し、かつ、5 種類の K1 特異ファージすべてに溶菌したため、K1 抗原を持っていることが判明し

Fig. 1 Detection of 521-bp and 805-bp amplified products by PCR with primers for VT common (a), and for VT₁ or VT₂ genes (b), respectively. M; molecular markers (*Haelll*-digested ϕ X174DNA), VT₁; *E. coli* O157: NM (VT₁+control), VT₂; *E. coli* O157: H7 (VT₂+control), VT⁻; *E. coli* O26 (VT⁻ control), lane to 5: *E. coli* strains isolated in this study.

Table 2 Biochemical characteristics of enterohaemorrhagic *E. coli* O2 : K1 : H7

Test		Test	
Indol	+	D-Glucose	+
Voges-Proskauer	-	Gas from glucose	+
Methyl red	+	Lactose	+
H ₂ S (TSI)	-	Sucrose	-
Urease	-	D-Mannitol	+
Citrate (Christensen)	-	Dulcitol	+
(Simmons)	-	D-Xylose	+
Malonate	-	Adonitol	-
D-Tartrate	+	L-Rhamnose	+
Lysine decarboxylase	+	L-Inositol	-
Ornithine decarboxylase	+	Raffinose	-
Arginine dihydrolase	+	Salicin	-
Phenylalanine deaminase	-	D-sorbitol	+
Oxidase	-	Arabinose	+
Motility	+	Maltose	+
SAA	+	Trehalose	+

た。このことから、分離菌の血清型は O2:K1:H7 と決定した。生化学的性状は Table 2 に示した。分離菌は多くの大腸菌が示す性状と一致していた。

(4) 大腸菌 LPS および VT に対する患者血清中の抗体価

7 種の LPS および VT₁, VT₂ を各々固相とした ELISA で調べた結果、7 種類の LPS のうち分離菌 O2:K1:H7 から調製した LPS に対してのみ抗体上昇がみられた。また VT 抗体は入院時(第15病日)よりすでに VT₂ に対してのみの抗体が観察され、VT₁ 抗体は44病日でも陰性であった。

考 察

1990年10月に埼玉県某幼稚園で発生した腸管出血性大腸菌感染症集団事例がきっかけとなって、国内でも本大腸菌に対する関心が高まり、その分離報告は増加しつつある。本大腸菌感染症の報告はカナダ、アメリカ、英国などの先進国に多く、しかも近年、HUS 症例が増加の傾向にある²²⁾²³⁾ことから、本菌感染症はこうした国で増加傾向にあると考えられる。しかし、本菌は重症化をきたした頃には検出率がきわめて低いことをわれわれも経験している。本症例は下痢の初発がみられて15日目に HUS を発症した。HUS が疑われた直後に便培養を行ったが、分離した大腸菌10株のうち、1株のみが PCR で VT 陽性であった。重症化に陥った患者からの EHEC 検出はかなりたんねんに多くのコロニーを検索する必要がある。菌が陰性でも血清学的抗体検索が診断上有用であることは Chart ら¹³⁾が報告している通りであるが、そのためにも国内に存在する EHEC の O 血清型の種類を把握しておくことは必須である。1991年の1年間に国内で分離され、予研病原微生物検出情報誌に掲載された EHEC は86件にのぼるが、その O 血清型のうちわけは O157 が約65%、次いで O111, O26, O128 がそれぞれ26%, 2%, 2% の頻度で検出されている。この4種の LPS 抗体を調べるだけでも9割以上はカバーできることになるが、尚不完全である。今回分離した EHEC も国内の分離例としては初めての O2:K1:H7 血清型であった。O2:H7 の EHEC はウシからの分離報告

はあるが¹¹⁾患者分離株としては Karmali が総説¹⁴⁾にわずかに記載しているものの、海外でも稀である。なお、今回分離した O2:K1:H7 EHEC はその VT 産生性がきわめて不安定で、2代継代培養によって7株中5株が陰性化した。Levine ら⁵⁾が HUS 患者から分離した大腸菌の中に O2:K1:H7 があったと記載しているが、EHEC 用の DNA probe では陰性であったと述べている。本大腸菌における VT 遺伝子の不安定性によるのかもしれない。

文 献

- 1) Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. and Lim, C.: Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet*, i: 619-620, 1983.
- 2) Karmali, M.A., Petric, M. & Lim, C.: The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 151: 775-782, 1985.
- 3) Neill, M.A., Agosti, J. & Rosen, H.: Hemorrhagic colitis with *Escherichia coli* 0157:H7 preceding adult hemolytic uremic syndrome. *Arch. Intern. Med.*, 145: 2215-2217, 1985.
- 4) Gransden, W.R., SusanDamm, M.A., Anderson, J.D., Carter, J.E. & Lior, H.: Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7. *J. Infect. Dis.*, 154: 522-524, 1986.
- 5) Levine, M.M., Xu, J., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H. & Wachsmuth, K.: A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of 0157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.*, 156: 175-182, 1987.
- 6) Scotland, S.M., Rowe, B., Smith, H.R., Willshaw, G.A. & Gross, R.J.: Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J. Med. Microbiol.*, 25: 237-243, 1988.
- 7) Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., et al.: Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two-year perspective study. *J. Infect. Dis.*, 157: 1054-1057, 1988.

- 8) Ostroff, S.M., Kobayashi, J.M. & Lewis, J.H.: Infections with *Escherichia coli* 0157:H7 in Washington state. J.A.M.A., 262: 355—359, 1989.
- 9) Kleanthous, H., Smith, H.R., Scotland, S.M., Gross, B.R., Taylor, C.M. & Milford, D.V.: Haemolytic uraemic syndromes in British Isles, 1985—1988: Association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological aspects. Arch. Dis. Child., 65: 722—727, 1990.
- 10) Milford, D.V., Taylor, C.M., Guttridge, B., Hall, S.M., Rowe, B. & Kleanthous, H.: Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles 1985—8: Association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 1: Clinical and epidemiological aspects. Arch. Dis. Child., 65: 716—721, 1990.
- 11) 伊藤 武, 甲斐明美: Vero 細胞毒素産生性大腸菌の細菌学的特徴と感染症. メディヤサークル, 36: 149—161, 1991.
- 12) 竹田多恵, 他: 溶血性尿毒症症候群 (HUS) と腸管出血性大腸菌 (EHEC) の関連性に関する血清学的検討. 小児感染免疫, 4: 11—14, 1992.
- 13) Chart, H., Smith, H.R., Scotland, S.M., et al.: Serological identification of *Escherichia coli* 0157:H7 infection in haemolytic uraemic syndrome. Lancet, i: 138—140, 1991.
- 14) Karmali, M.A.: Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 2: 15—38, 1989.
- 15) 病原微生物検出情報月報. 国立予研発行
- 16) 山崎伸二, 白井宏政, 西沢光昭, 竹田美文: Vero 毒素産生性大腸菌の PCR (DNA 増幅) 法による迅速診断. 日本細菌学誌, 46: 280, 1991.
- 17) Yutsudo, T., Nakabayashi, N., Hirayama, T. & Takeda, Y.: Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* 0157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. Microb. Pathog., 2: 21—30, 1987.
- 18) Gross, R.J., Cheasty, T. & Rowe, B.: Isolation of bacteriophages specific for the K1 polysaccharide antigen of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 6: 548—550, 1977.
- 19) Ewing, W.H.: Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th Ed., Elsevier Science Publishing Co., New York, 1986.
- 20) Westphal, O. & Jann, K.: Bacterial lipopolysaccharide: Extraction with phenol, water and further applications of the procedure. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 83—91, 1965.
- 21) 中尾浩史, 永井照美, 竹田多恵, 五十嵐隆, 山中龍宏, 小林 登: LPS-ELISA による *E. coli* 0157 感染症の血清診断の試み. 日本細菌学誌, 47: 276, 1992.
- 22) Tarr, P.I. & Hickman, R.O.: Hemolytic uraemic syndrome epidemiology: A population-based study in Kingcounty, Washington, 1971 to 1980. Pediatr., 80: 41—45, 1987.
- 23) Martin, D.L., MacDonald, K.L., White, K.E., Soler, J.T. & Osterholm, M.T.: The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uraemic syndrome in Minnesota. N. Engl. J. Med., 323: 1161—1167, 1990.

Sporadic Case of Hemolytic Uremic Syndrome Associated with Verotoxin
Producing *Escherichia coli* O2:K1:H7

Yasuaki KOBAYASHI, Katsuhiro MAEYAMA & Yuji SHIKI

Department of Pediatrics, Ootawara Red Cross Hospital

Teizo TSUKAMOTO

Osaka Prefectural Institute of Public Health

Terumi NAGAI, Yuan PEINA, Hiroshi NAKAO & Tae TAKEDA

Department of Infectious Diseases Research, National Children's Medical Research Center

Cases of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are being increasingly reported in Japan. Bacteriological isolation of EHEC has been a constant problem because the organism is shed for a short duration after onset on illness and generally during the prodromal stages. In order to ease the diagnosis of EHEC infections in this country, we have developed a LPS-based solid phase enzyme linked immunosorbent assay for serological diagnosis of the infection. Adequate knowledge on the prevalence of EHEC serogroups in Japan is mandatory for the success of such a diagnostic test. O157 is currently the prominent serogroup associated with EHEC infections in Japan followed by O111, O26 and O128 in that order of prevalence.

In February 1992, a 1 year-old infant developed hemolytic uremic syndrome (HUS) 15 days later the prodrome of watery diarrhoea. Stool sample obtained on day 15 was cultured for detection of EHEC. Ten colonies of *E. coli* picked from MacConkey agar plate were examined by the polymerase chain reaction (PCR) using primers specific for both verotoxins (VT1 and VT2). Of the 10 colonies, only one was positive for the VT2 gene. The strain was confirmed to be cytotoxic on cultured Vero cells. The strain agglutinated with antisera of *E. coli* O2, K1 and with H7 serogroups. As of date, none of such strains of O2:K1:H7 EHEC has been reported in Japan. The patient's sera was found to be positive for antibodies against LPS from the homologous isolate as well as against VT2. The patient recovered uneventfully from HUS 40 days after the onset of the disease and was discharged from the hospital.