

綜

説

小児腸管出血性大腸菌感染症とその発症メカニズム

山 本 達 男

新潟大学大学院医歯学総合研究科

国際感染医学講座 細菌学分野

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection in Children and Its Mechanism

Tatsuo YAMAMOTO

Division of Bacteriology, Department of Infectious Disease

Control and International Medicine, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

腸管出血性大腸菌（血清型 O157:H7）はタイプⅢ分泌システムによって腸管粘膜に粘着し、溶原化したファージから志賀毒素（Stx）を産生して水様下痢や出血性大腸炎などの腹部症状を、さらに溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症などの重症合併症を惹起する。小児や高齢者の HUS 発症は深刻で、予後不良となる。志賀毒素の作用は、蛋白合成阻害によるネクローシス、カスパーゼ活性化を介するアポトーシス、そして IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β などの炎症性サイトカイン産生の誘導で、志賀毒素サブタイプの中では Stx2 が最も臨床的に強毒である。一方で、タイプⅢ分泌システム非依存的に HUS を発症し、死亡した小児例がわが国で発生した。原因大腸菌は、血清型 O86:H- で、Stx2 産生菌であった。この O86 腸管出血性大腸菌は、120.73 kb の粘着性プラスミド pO86A をもち、外膜蛋白 HdaA（15.5 kDa）を産生して、分散型粘着（diffuse adherence）を示した。また、赤痢菌（*Shigella flexneri*）型の IgA1 プロテアーゼ遺伝子を保有し、高い腸管免疫抵抗能力を示した。また、60.238 kb の志賀毒素（Stx2）ファージを溶原化していたが、O157 型ファージとは異なった独自のファージであった。当該小児例では「腸管内で O86 型 Stx2 ファージが高定着性 O86:H- 大腸菌に溶原化し、新しい腸管出血性大腸菌が出現、致命的な HUS が惹起された」可能性が考えられた。

キーワード：腸管出血性大腸菌感染症、O157、溶血性尿毒症症候群（HUS）、志賀毒素、新型腸管出血性大腸菌の出現

Reprint requests to: Tatsuo YAMAMOTO
Division of Bacteriology
Department of Infectious Disease Control and
International Medicine
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学
細菌学分野 山本達男

はじめに

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) は1982年に米国のオレゴン州とミシガン州で発生したハンバーガーによる集団食中毒事例で発見された¹⁾。志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae* type 1) が産生する志賀毒素と同じ毒素 (あるいは類似した毒素) を産生するのが特徴で、血清型は O157: H7 であった。米国の場合、ウシが自然界での保有動物 reservoir で、3週齢以上のウシは発症せず、糞便中に $10^2 \sim 10^5$ CFU/g で排菌し続ける。ヒトの場合、 10^2 個から 10^3 個と少数の菌量の経口摂取で感染が成立、ヒトからヒトへの2次感染も発生する。

わが国では、平成8年(1996年)に世界最大規模の腸管出血性大腸菌感染症 (血清型 O157: H7) の流行が発生、各地が「O157」に席卷された²⁾。以後、大きな流行は制御されているが、血清型 O157 や O26 などによる散発例 (患者数) が年間1000名以上のレベルにあり、死亡数は年間数名以上と依然深刻である。

腸管出血性大腸菌はタイプⅢ分泌システムによって腸管粘膜に粘着し、ゲノムに溶原化したファージから志賀毒素を産生して水様下痢や出血性大腸炎 (hemorrhagic colitis, HC) などの腹部症状を、さらに溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) や脳症などの重症合併症を惹起するが、小児や高齢者の場合には予後不良となる。

一方わが国で、タイプⅢ分泌システム非依存的に HUS を発症し死亡した小児例が発生した。原因大腸菌は血清型 O86: H- で、Stx2 産生菌であった³⁾。本稿では、流行型 O157: H7 の病原性を解説し、さらにわが国で発生したタイプⅢ分泌システム非依存的 HUS 発生例の解析結果を紹介する。

わが国での腸管出血性大腸菌感染症

平成8年(1996年)に、当時“たかが大腸菌”といわれた病原性大腸菌による世界最大規模の流行が発生、全国各地が当該感染症に席卷された。

患者数は17,877名、入院患者数は1,795名、死亡者数は12名を数えた (図1)。同年夏、腸管出血性大腸菌感染症は伝染病予防法の指定伝染病となり、平成11年4月に感染症法の三類感染症に、平成15年11月の改訂時も三類感染症で、現在に至っている。平成16年(2004年)の患者数は1,506名で死亡者数は4名であった。

原因食は、海外では加熱が不完全な汚染した挽き肉、乳製品、非加熱のアップルジュース、ヤギのチーズやミルク、あるいは汚染した湖での遊泳などで、わが国では平成8年当時、かいわれ大根、オカカサラダ、カボチャとシーフードのサラダ、ポテトサラダなどと報告された。最近の例では、焼き肉レストランでの感染の他、牛タキやローストビーフによる集団発生がある。

腸管出血性大腸菌の O: H 血清型には、わが国や米国での流行と関連する O157: H7 の他に、O26: H11, O111: H- (非運動性; O111: NM と記載する)、あるいは O145: H- など100種類以上が知られている¹⁾。

腸管出血性大腸菌感染症の発症⁴⁾⁵⁾

潜伏期は一般に3～5日。腹痛と頻回の水様下痢といった腹部症状で始まり、38～61%で鮮血便を伴う出血性大腸炎を呈する (図2)。発熱は18～42%でむしろまれ。下痢発症後5～9日を経過すると、6～8%の頻度でより深刻な全身性の微小血管障害 (合併症) が出現する。血小板減少、破碎状赤血球を伴う溶血性貧血、急性腎不全を三徴とする HUS、あるいは脳症 (頭痛、不穏、痙攣、昏睡) がその代表である。

腸管出血性大腸菌の病原性因子

腸管出血性大腸菌の定着部位は小腸と結腸の粘膜で、粘液及び上皮細胞が粘着標的となる (図3)。線毛は補助粘着因子として働く。主な粘着因子 (装置) は、タイプⅢ分泌システム (T3SS) である。腸管出血性大腸菌は、タイプⅢ分泌システムを介して上皮細胞内に分泌蛋白 Tir を移入し、

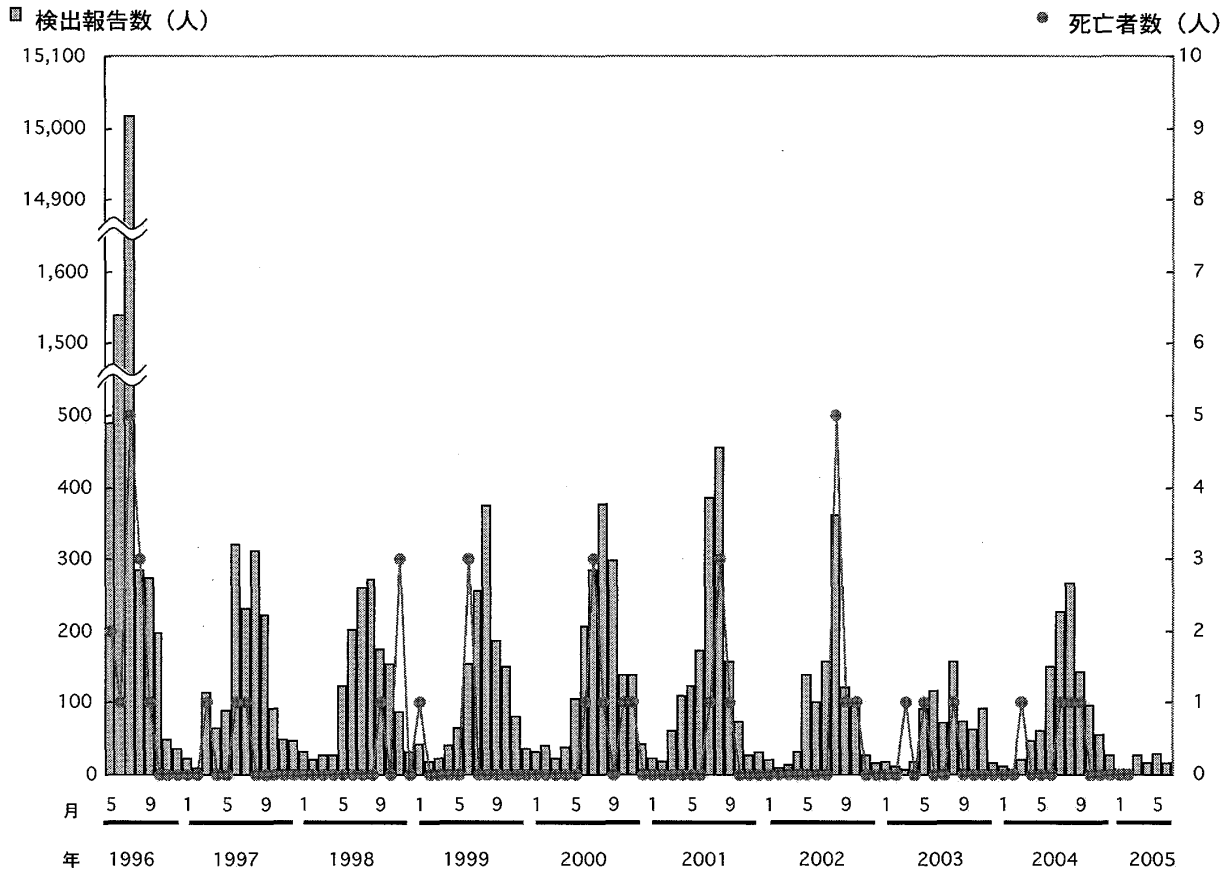


図1 腸管出血性大腸菌感染症の発生件数
厚生労働省, 国立感染症研究所ホームページ引用

Tir レセプターとして細胞表面に局在化させ、それに対して外膜蛋白（インティミン）を結合させて上皮細胞に対して強固な粘着を行う⁶⁾⁷⁾。

その後志賀毒素（別名ペロ毒素）によって毒素性疾患を惹起する。志賀毒素は、アミノ酸配列と作用の違いによって、Stx1 と Stx2 に大別される¹⁾。アミノ酸配列レベルでの相同性は約 56 %。Stx1 は志賀赤痢菌が産生する志賀毒素と同一毒素である。Stx2 にはアミノ酸配列が異なる variant が存在していて、Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e と呼ばれている。Stx2 はトランスロケーションに優れた最も発症力の強い毒素である。HUS との関連は、Stx1 産生株の場合～ 0 %, Stx1 と Stx2 産生株の場合～ 10 %, Stx2 産生株の場合～ 90 % である。Stx2d は腸管の粘液 mucus によって活性化される。また、VT2e はブタ（浮腫病）の STEC が産

生する毒素である。

志賀毒素の分子量は約 70,000。ホロ毒素は 1 分子の A サブユニットと 5 分子の B サブユニットから構成されている¹⁾。A サブユニットの N 末端側部分には A1 フラグメントと呼ばれる RNA N-グリコシダーゼが存在していて、60S リボソームに存在する 28S rRNA に作用し、その 4,324 番目のアデニンを切断する作用（蛋白合成阻害作用）をもつ⁸⁾。B サブユニットは細胞表面の Gb3 レセプターを認識して結合する。

Gb3 発現量の多い細胞を認識して結合した志賀毒素は、レトログレードトランスポートによって小胞体に運ばれる⁹⁾。その作用は、蛋白合成阻害⁸⁾によるネクロシス、カスパーゼ（システインプロテアーゼファミリー）の活性化によるアポトーシス誘導⁹⁾¹⁰⁾、そして IL-6, IL-8, TNF- α , IL-

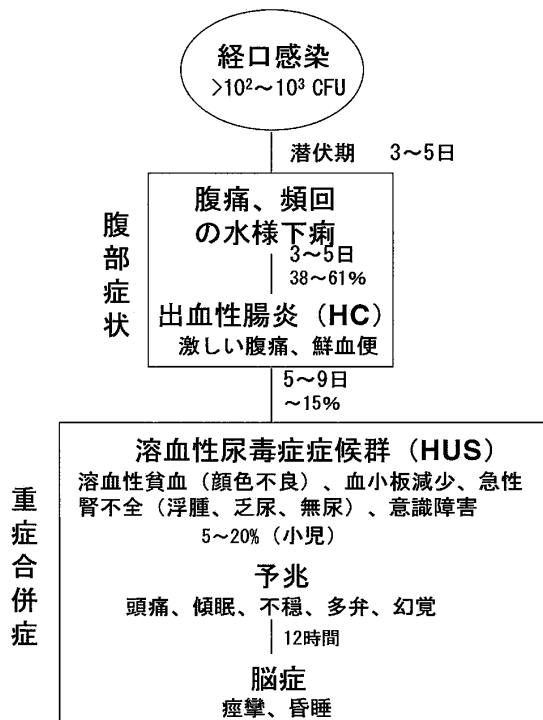


図2 腸管出血性大腸菌感染症の臨床症状と経過

1 β などの炎症性サイトカインの産生誘導である^{11)~14)}(図4)。細胞によって応答の仕方が異なると考えられているが、調節機構は不明である。腎のメサングウム細胞では MCP-1 (monocyte chemoattractant peptide-1) が産生され、血小板活性化因子 (PAF) の活性化による血栓の形成と血小板の減少、誘導された炎症性サイトカイン IL-6 や IL-8 などによる好中球などの組織障害性免疫担当細胞の活性化とその結果起こる活性酸素やプロテアーゼ、エイコサノイドなどによる血管内皮障害が合併症の発症に関与する (図3)。なお、O157などの O 抗原 (LPS) は、レセプターとなる CD14 を表面にもった細胞に作用して、炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α など) を産生させ、好中球増多や標的細胞表面のペロ毒素レセプター (Gb3) 誘導などに関与している¹⁵⁾¹⁶⁾(図3)。

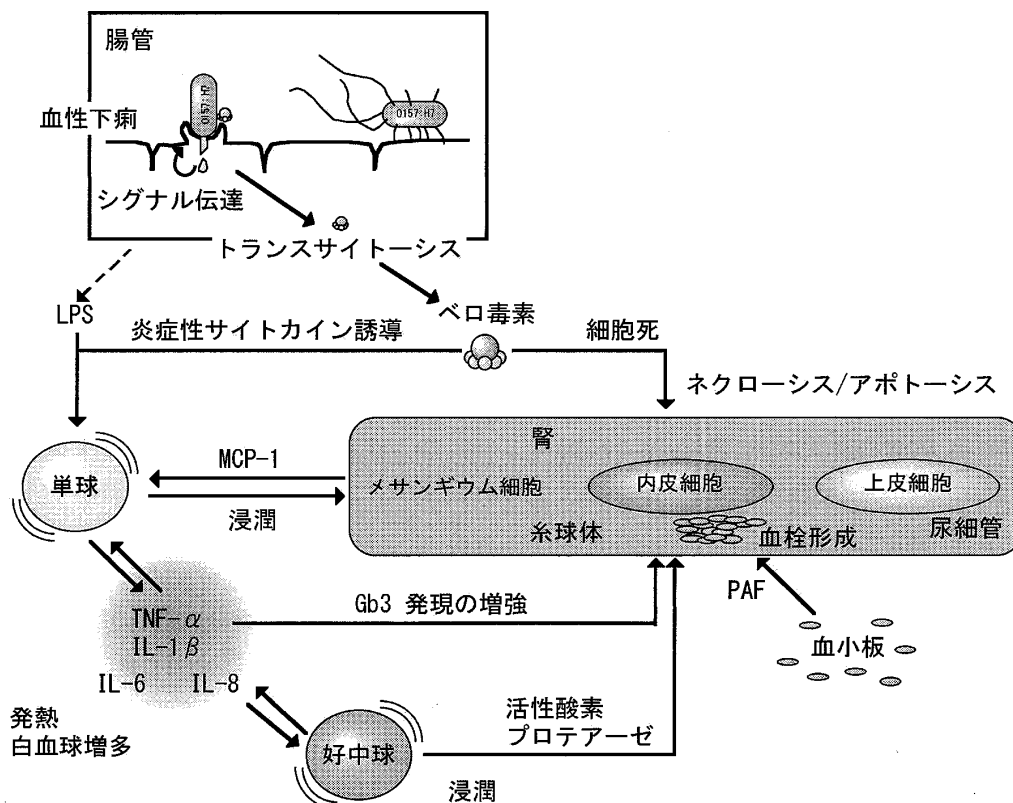


図3 腸管出血性大腸菌の発症メカニズム

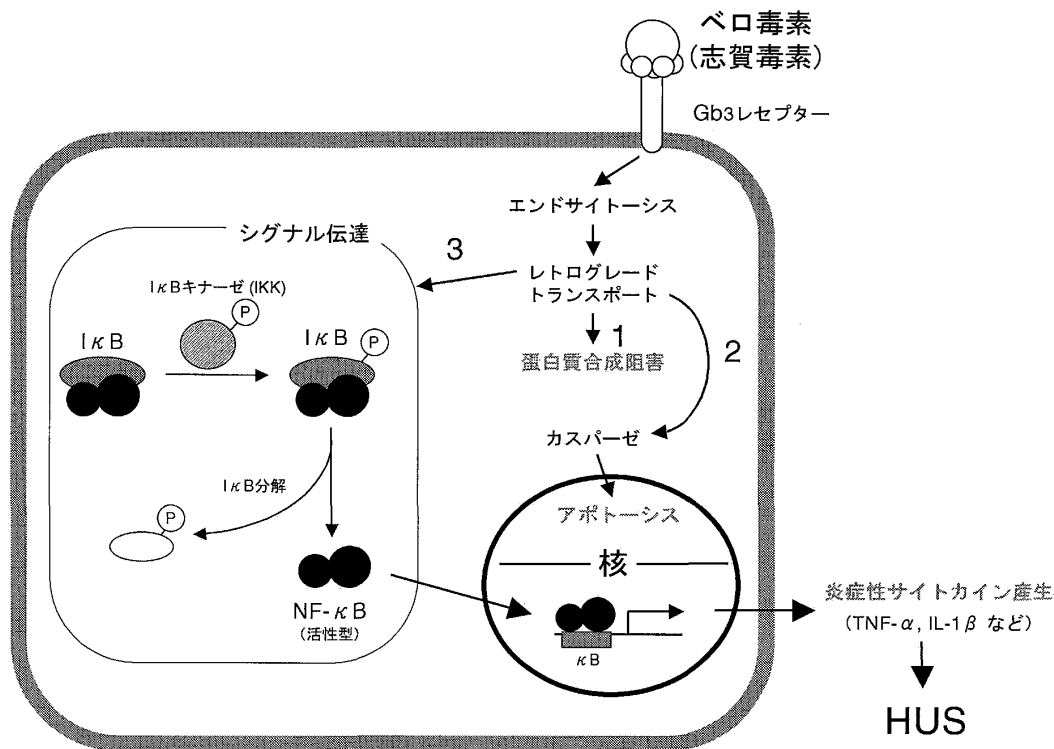


図4 志賀毒素の作用

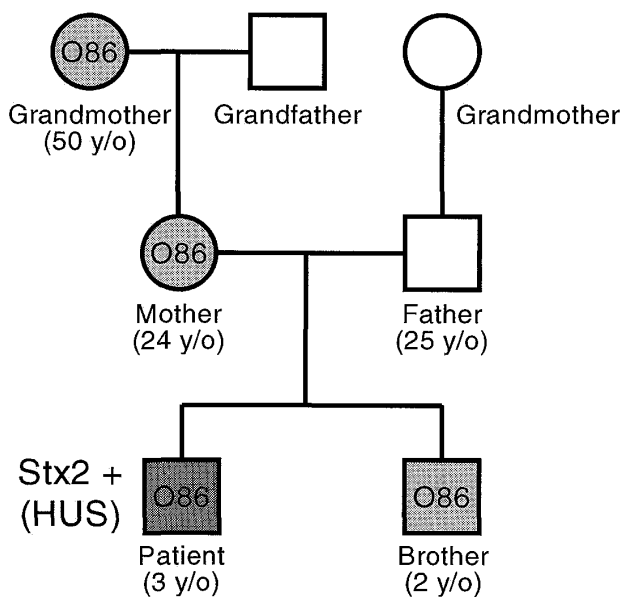


図5 血清型 O86: H-大腸菌による家族感染

血清型 O86: H-大腸菌による家族感染・HUS 発症例の解析

鹿児島で血清型 O86: H-大腸菌による家族感染が発生した (図5)。この家族例では、男児 (3歳児) だけが Stx2 産生菌 (腸管出血性大腸菌) の感染によって、HUS を発症し、死亡した。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析で、家族株は同一パターンを示したが、男児株では約 50 kb の Stx 陽性 DNA の挿入が確認された。

男児株はタイプ III 分泌システムが陰性で、細胞に対する分散型粘着 (diffuse adherence) とマンノース耐性のヘマグルチニン活性 (mannose-resistant hemagglutinin, MRHA O86) を示した³⁾。分散型粘着は男児株がもつ 120.73 kb のプラスミド pO86A にコードされていて、pO86A 上に分散型粘着因子遺伝子 (*hdaA*, HUS-associated diffuse adherence A) が存在した (図6)。*hdaA* を含む分散型粘着遺伝子領域は、腸管凝集粘着性大腸

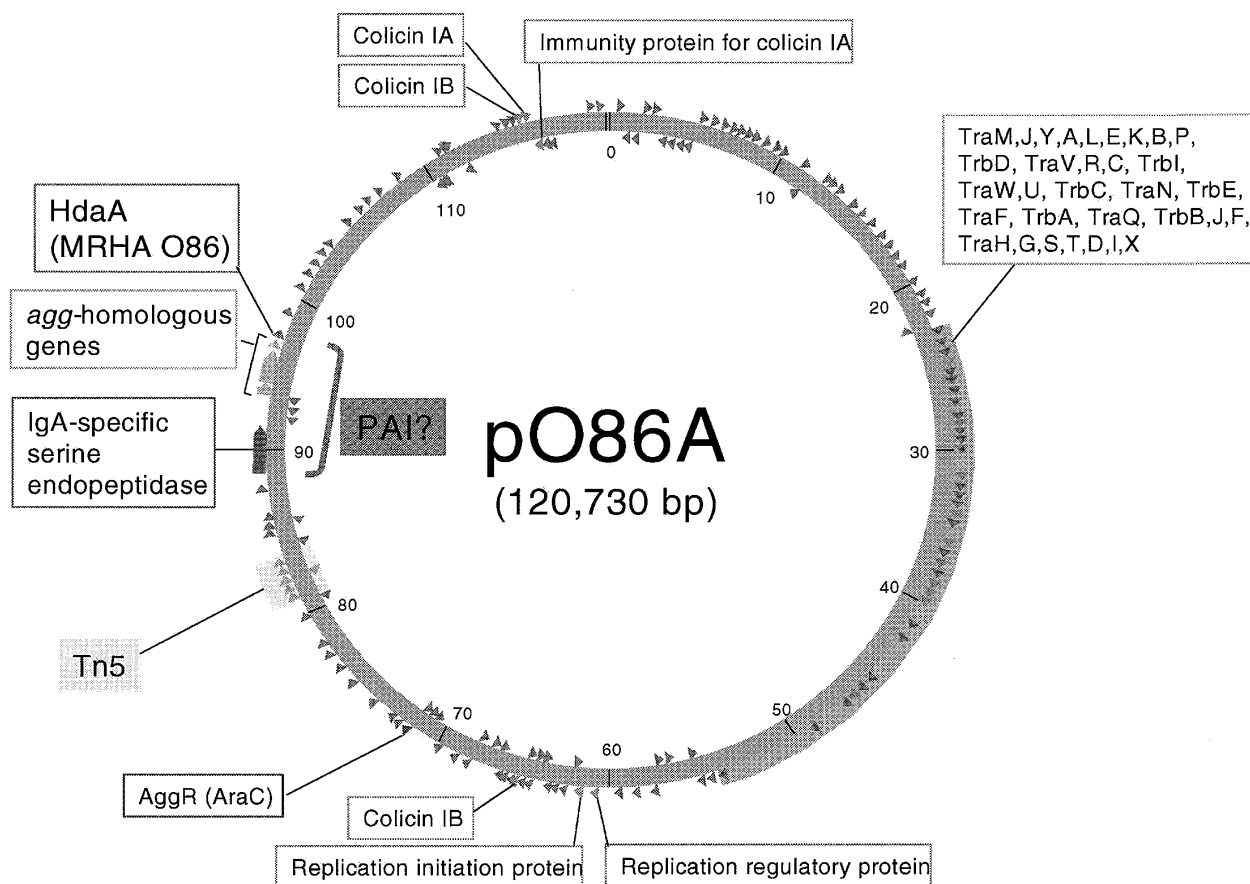


図6 血清型 O86: H-腸管出血性大腸菌 (男児株) がもつ粘着性プラスミド pO86A の遺伝子地図

菌 (enteroaggregative *E. coli*, EAggEC) が示す凝集型粘着 (aggregative adherence) 遺伝子領域に極めて類似したが、粘着遺伝子 (*hdaA*) と enteroaggregative *E. coli* の粘着線毛 AAF/I¹⁷⁾ や粘着線毛 AAF/II¹⁸⁾ の遺伝子 (*aggA*, *aafA*) の間には全く相同性が存在しなかった (図7)。

分散型粘着因子遺伝子 (*hdaA*) を knock-out したプラスミド (pO86Am) を作製した。pO86A あるいは pO86Am をもつ *E. coli* HB101 から外膜を調整し、SDS PAGE で解析した結果、18.0 kDa (計算上 15.5 kDa) の外膜蛋白が *hdaA* の遺伝子産物であることが分かった。pO86A とは異なると、pO86Am は分散型粘着が陰性で (図8)、MRHA O86 活性も陰性であった。

また、粘着性プラスミド pO86A には赤痢菌 (*S. flexneri*) の IgA1 プロテアーゼ遺伝子 (GenBank

accession no. AL391753) に 99 % の相同性を示す IgA1 プロテアーゼ遺伝子が存在した (図6)。遺伝子は *ipd* (IgA1 protease of diffusely - adhering enterohemorrhagic *E. coli*) と命名。

さらに、男児株から Stx2 ファージを調整し、DNA 塩基配列を決定した。サイズは 60.238 kb で、血清型 O157:H7 腸管出血性大腸菌の Stx ファージ¹⁹⁾²⁰⁾ に類似したが、挿入配列部分は O86 独自の配列であった。

新型腸管出血性大腸菌が小児腸管内で出現した可能性

血清型 O86 大腸菌による家族感染例について次のようにまとめることができる。わが国で血清型 O86 大腸菌による下痢症が流行していた。Stx

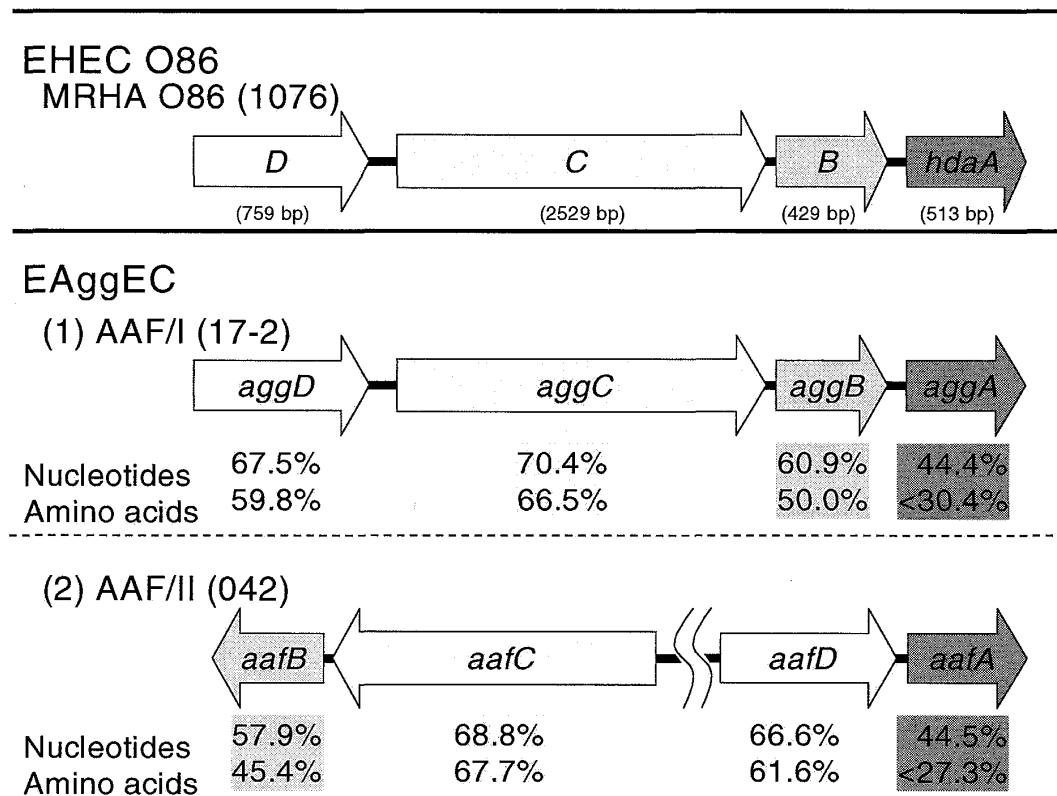


図7 血清型 O86: H-腸管出血性大腸菌（男児株）と enteroaggregative *E. coli* がもつ粘着遺伝子領域の比較

上段：分散型粘着（diffuse adherence）遺伝子領域．下段：凝集型粘着（aggregative adherence）遺伝子領域で，相同性（％）は分散型粘着遺伝子との比較値を示す．いずれの場合も右端が粘着因子をコードする遺伝子で，*aggA* と *aafA* は粘着線毛遺伝子．また，いずれの場合も調節遺伝子 *aggR* を伴う．

はすべて陰性であった．血清型 O86 大腸菌は EPEC 血清型ではあるが FAS（アクチン重合）陰性で，もともと重要な下痢原性大腸菌とは考えられてこなかった．しかし，鹿児島での家族感染例では，血清型 O86 でかつ Stx2 産生腸管出血性大腸菌による感染が発生，男児が HUS を発症して死亡した．

男児株を含む家族株は強い腸管定着性を有していた．腸管粘膜には分泌型 IgA に基づく強い免疫が存在するが，赤痢菌（*S. flexneri*）と同程度に強い抵抗性（IgA1 プロテアーゼ産生能）をもっていた．さらに，家族株は細胞に対する強い分散型粘着（diffuse adherence）能力を備えていた．

男児株の Stx2 ファージは血清型 O86 特異的なファージで，血清型 O157 腸管出血性大腸菌に由来したものではない．したがって，当該小児例では「小児腸管内で，O86 型 Stx2 ファージが高定着性 O86: H-大腸菌に溶原化し，新しい腸管出血性大腸菌が出現，致命的な HUS が惹起された」可能性が高い．また，HUS 発症にタイプⅢ分泌システムが必須でないことが示唆された．

おわりに

小児腸管内で新しい腸管出血性大腸菌が出現していること，そして Stx2 産生大腸菌の場合には

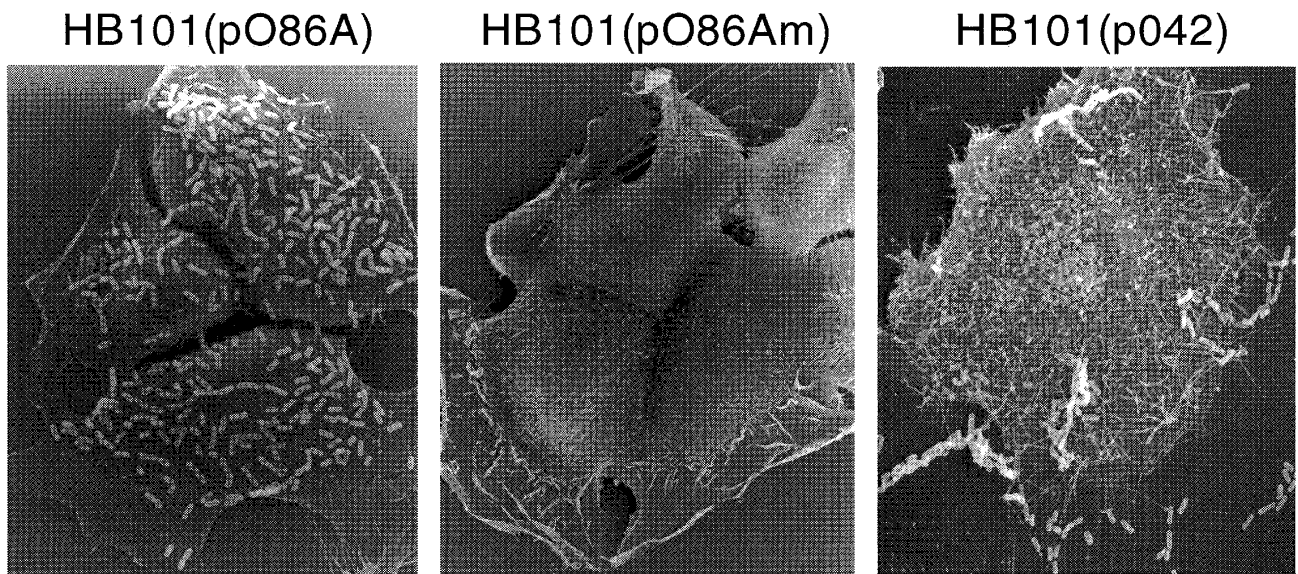


図8 培養細胞 HCT-8 への粘着と様式

左：血清型 O86:H-腸管出血性大腸菌（男児株）がもつ粘着性プラスミド pO86A が決定する分散型粘着（diffuse adherence）。中央：粘着遺伝子 *hdaA* をノックアウトしたプラスミド pO86Am の場合（粘着性を欠く）。右：enteroaggregative *E. coli* O42 株（ボランティア病原株）がもつ粘着性プラスミド pO42 が決定する凝集型粘着（aggregative adherence）。

タイプⅢ分泌システムが陰性であっても、それに代わる強い腸管粘膜定着性を備えていれば HUS を惹起することが本研究の結果明らかになった。IgA1 プロテアーゼは、赤痢菌、淋菌、インフルエンザ菌などの粘膜感染菌が備えている病原性因子²¹⁾で、腸管出血性大腸菌の場合には他の血清型にはない血清型 O86 だけの特性であった。また、血清型 O86 大腸菌の分散型粘着（diffuse adherence）因子は新規の粘着因子で、さらに分子レベルでの解析が必要である。

謝 辞

血清型 O86 腸管出血性大腸菌に関する研究の一部は「新潟大学医学研究助成金（有壬基金）」の助成による。

文 献

- 1) Kaper JB and O'Brien AD: *Escherichia coli* O157: H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology (ASM) press, Washington, D.C., 1998.
- 2) Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Ito K and Tamura K: Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 infection by two different genotype strains in Japan. *Lancet* 348: 831-832, 1996.
- 3) Yamamoto T, Taneike I, Tamura Y, Nishi J and Kawakami K: A novel hemagglutinin of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O86:HNM associated with hemolytic uremic syndrome in a child. *Acta Med Biol* 48: 147-152, 2000.
- 4) Pickering LK, Obrig TG and Stapleton FB: Hemolytic-uremic syndrome and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J* 13: 459-475, 1994.
- 5) American gastroenterological association, Consensus conference statement: *Escherichia coli* O157:H7 infections - an emerging national health crisis, July 11-13, 1994. *Gastroenterology* 108: 1923-1934, 1995.
- 6) Moxley RA: *Escherichia coli* O157: H7: an update on intestinal colonization and virulence

- mechanisms. *Anim Health Res Rev* 5: 15 - 33, 2004.
- 7) Mota LJ and Cornelis GR: The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* 37: 234 - 249, 2005.
 - 8) Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T and Igarashi K: Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N - glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* 171: 45 - 50, 1988.
 - 9) Kojio S, Zhang H - M, Ohmura M, Gondaira F, Kobayashi N and Yamamoto T: Caspase - 3 elevation and apoptosis induction coupled with the retrograde transport of Shiga toxin: inhibition by brefeldin A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29: 275 - 281, 2000.
 - 10) Cherla RP, Lee SY and Tesh VL: Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 228: 159 - 166, 2003.
 - 11) Inward CD, Varagunam M, Adu D, Milford DV and Taylor CM: Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin - producing *Escherichia coli* infection. *Arch Dis Child* 77: 145 - 147, 1997.
 - 12) Proulx F, Turgeon JP, Litalien C, Mariscalco MM, Robitaille P and Seidman E: Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic - uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 17: 899 - 904, 1998.
 - 13) Litalien C, Proulx F, Mariscalco MM, Robitaille P, Turgeon JP, Orrbine E, Rowe PC, McLaine PN and Seidman E: Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 13: 840 - 845, 1999.
 - 14) Westerholt S, Hartung T, Tollens M, Gustrau A, Oberhoffer M, Karch H, Klare B, Pfeffer K, Emmrich P and Oberhoffer R: Inflammatory and immunological parameters in children with hemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis - pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokines* 12: 822 - 827, 2000.
 - 15) Westerholt S, Pieper AK, Griebel M, Volk HD, Hartung T and Oberhoffer R: Characterization of the cytokine immune response in children who have experienced an episode of typical hemolytic - uremic syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:1090 - 1095, 2003.
 - 16) Guessous F, Marcinkiewicz M, Polanowska-Grabowska R, Kongkhum S, Heatherly D, Obrig T and Gear AR: Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function. *Infect Immun* 73: 8306 - 8316, 2005.
 - 17) Savarino SJ, Fox P, Deng Y and Nataro JP: Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J Bacteriol* 176: 4949 - 4957, 1994.
 - 18) Elias WP Jr, Czeczulin JR, Henderson IR, Trabulsi LR and Nataro JP: Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 1779 - 1785, 1999.
 - 19) Plunkett G 3rd, Rose DJ, Durfee TJ and Blattner FR: Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late - gene product. *J Bacteriol* 181: 1767 - 1778, 1999.
 - 20) Makino K, Yokoyama K, Kubota Y, Yutsudo CH, Kimura S, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe H, Iida T, Yamamoto K, Onishi M, Hayashi T, Yasunaga T, Honda T, Sasakawa C and Shinagawa H: Complete nucleotide sequence of the prophage VT2 - Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet Syst* 74: 227 - 239, 1999.
 - 21) Senior BW and Woof JM: Effect of mutations in the human immunoglobulin A1 (IgA1) hinge on its susceptibility to cleavage by diverse bacterial IgA1 proteases. *Infect Immun* 73: 1515 - 1522, 2005.