

腸管出血性大腸菌 O157 感染症 における血清抗体

濱田嘉徳*† 岩井艶子 濱口武士 遠藤彰一 福田邦明
岡田隆滋 岩井朝幸 篠原ゆかり* 曾根美智子* 峪村昌男*

IRYO Vol. 72 No. 6 (287-292) 2018

要 旨

溶血性尿毒症症候群の原因の一つであるペロ毒素産生性腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染症の血清学的診断を目的として、この大腸菌 O157 が検出された小児 7 例に、血清中の大腸菌 O157 菌体凝集抗体を測定した。

発病 5 日以内ではこの抗体は 10 倍未満（陰性）であったが、6 日以後急速に抗体は上昇した。さらに抗体は 2 週間持続した後に下降した。発症後 35 日では 7 例中 3 例の抗体を測定し、2 例で 20 倍および 40 倍に低下し、1 例は陰性化していた。

対照の小児群では O157 菌体凝集抗体は陰性であった。さらに糞便から大腸菌 O157 が分離された成人保菌者例でも、大腸菌 O157 菌体凝集抗体は陰性であった。

大腸菌 O157 菌体凝集抗体を検査した 7 例の内、4 例において、大腸菌 O157 IgM LPS 抗体を測定し比較した。第 5 病日の O157 凝集抗体が陰性の 1 例では O157 IgM LPS 抗体が認められた。その他の症例ではそれぞれの病日における O157 菌体凝集抗体と O157 IgM LPS 抗体は共に陽性であった。

一方、O157 IgM LPS 抗体が検査された 4 例において、大腸菌 O26, O111, O113, O118, O121 および O165 に対する IgM LPS 抗体測定した 4 例すべて陰性で、O157 IgM LPS 抗体との交差反応はなく、大腸菌 O157 特異性を示した。

キーワード 大腸菌 O157, 出血性大腸菌感染症, O157 菌体凝集抗体, 溶血性尿毒症症候群

はじめに

1995 年 5 月岡山県¹⁾と 7 月堺市を中心に 9,000 名を超える感染者と 12 名の死亡者を記録した腸管出血性

大腸菌 O157:H7（以下 O157 と略す）によるわが国戦後最大の食中毒事件が全国を震撼させた²⁾。8 月には瀬戸大橋を越え、小規模ながら香川県にも及び、香川県西部地域に 47 名の出血性大腸菌感染症を

国立病院機構香川小児病院 小児科（現：国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター） *臨床検査科 †医師
著者連絡先：濱田嘉徳 国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター 〒765-8501 香川県善通寺市仙遊町 2-1-1
e-mail: hamadayo1853@yahoo.co.jp

（平成 29 年 7 月 14 日受付，平成 30 年 2 月 9 日受理）

Serum Antibodies to *Escherichia coli* O157:H7 in Enterohemorrhagic *E. coli* Infection

Yoshinori Hamada*, Tsuyako Iwai, Takeshi Hamaguchi, Shoichi Endo, Kuniaki Fukuda, Takashige Okada, Asayuki Iwai, Yukari Shinohara*, Michiko Sone* and Masao Gakemura*, Kagawa National Children's Hospital

（Received Jul. 14, 2017, Accepted Feb. 9, 2018）

Key Words: *Escherichia coli* O157, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), agglutinating antibody, Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)

経験した。この内、香川小児病院で扱った16歳未満の小児症例27例（有症者22例および保菌者5例）で、今回は翌年1997年以降のO157による症例7例の血清学的解析を試みた。

対象と目的, 方法

【目的】糞便からO157が検出された症例の血清反応を試み、O157菌体凝集抗体価の病日における推移・変動を測定することを目的とした。

【対象】1996年香川県で発症したO157関連疾患および保菌者を含めた感染例47例を疫学的に検討し、一部の患児では抗体測定を試みた。

糞便からのO157の分離菌のベロ毒素 verotoxin-1 および verotoxin-2 の検出にはデンカ生研逆受身ラテックス凝集反応を用いた。

血清学的検査には、47例の内、対象とした小児症例8例とその家族を扱った。8例中血清が得られた5例の血清抗体を測定した。

翌年1997年以降、O157感染が確認できた患児の家族の了解を得た上で、下痢・血便などの発症後、早期に採取し、O157凝集抗体の測定を試みた。明らかにO157感染症と診断された症例7例で、病日を追って採血し、O157凝集反応を試みた。

O157感染例は家族の糞便検査および血液検査などを行った。血清抗体検査等の承諾はO157治療研究の際の基準によった³⁾⁴⁾。

【方法】凝集反応：抗原には *E. coli* O157:H7（予研株）を培養液（Luria-Bertanis Broth）中で培養し、増殖した菌をオートクレーブ120℃、30分加熱処理し、生理食塩水で洗浄し、600nmで吸光度1.3-1.4になるよう、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）により調整したものを凝集反應用抗原として用いた。

【O157凝集抗体測定】抗体測定はマイクロプレート法により、血清の2の倍数希釈系列を作成（25μl量）し、これに対して抗原25μlをそれぞれの希釈血清に滴下し、よく混和した。37℃で1-2時間反応した後に、4℃で1夜静置した後、凝集が認められた最終希釈倍数をもって抗体価と判定した。なお血清希釈は10倍から開始し、倍数希釈した。

凝集抗体は抗原など急性期と回復期のペア血清（および同一症例で2回以上の採血検査）の凝集抗体の測定は一括して同時に測定した。

さらにO157患児の家族で糞便からO157が分離された成人保菌者（28歳）1例の抗体を測定した。

【O157に対する lipopolysaccharide (LPS) IgM 抗体の測定】O157凝集抗体を測定した7例中4例には、微量の抗体を検出可能である *E. coli* に対する lipopolysaccharide (LPS) IgM 抗体 (ELISA 抗体) を enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法で同時に測定した。

結 果

1996年香川県で経験した腸管出血性大腸菌の感染者は47人で、感染発症者28例、無症状の健康保菌者19例であった。

地域別：香川県例47例の地域別ではO26の2例を含む高松市ならびに東讃地区で5例、坂出市、丸亀市、善通寺市を含む中讃地区で40例、観音寺市を含む西讃地区で2例であった。47例には含まれないが、香川小児病院で扱った近隣地域（愛媛県東部）で2例を経験した。

月別発生：月別では5月1例および7月1例、8月14例、9月31例であった。

年齢分布：小児の年齢別では、有症例の小児22例で、性別は男児11例、女児11例であった。発症の年齢は2歳未満4例、2歳-3歳11例、4歳-7歳未満6例、9歳以上1例であった。年齢のピークは2歳で、幼児に多発した。成人の有症者は6例であった。

また保健所の指導により、発症した患児の家族の糞便培養も試みた。この内、患者の家族の検便検査により、保菌者は両親ならびに患児同胞にみられた。保菌者は7歳未満の学童3例、9歳-13歳2例で、成人に比べ、小児には少なく、有症児の幼児の同胞であった。

家族の保菌者は20歳代では患児の母親の6例、30歳代では4例、40歳代では2例中1例は患児の父であり、50代では患児の祖母2例であった。

47例中1例の4歳女児において、7病日より血小板減少4.6万（最低値2.6万）貧血（Hb最低値5.6g/dl）、LDH（最高値1,287 IU/L）でHUS発症例であったが軽症であった。Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) の判定には日本腎臓病学会の基準⁵⁾に従った。

O157凝集抗体検査：香川小児病院でO157が証明された最初の流行の8例中5例の血清では、いずれも160倍-1,280倍の高値を示し、抗体の変動がみられず、抗体検査では抗体の推移が十分観察できなかった。そこで1997年以降の抗体測定には出血性大腸

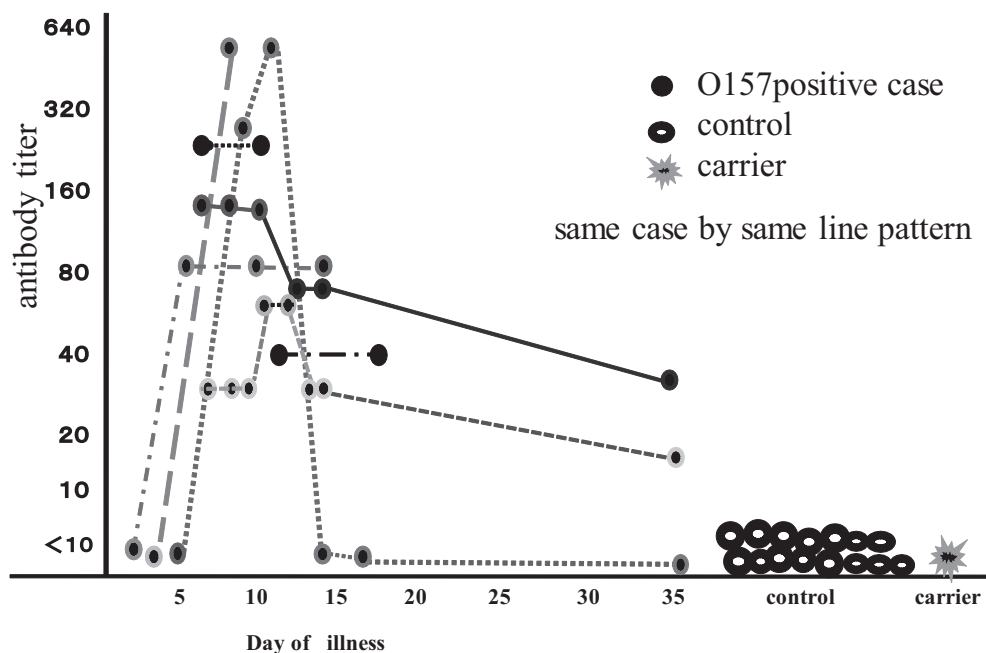


図 O157 antibody titer

発症5日以内では抗体は陰性であったが、6日以後上昇し、2週間持続し以後下降した。発症35日には2例で低力価、1例では抗体は消失した。保菌者では抗体は陰性であった。

菌 O157感染症7例を対象とした。7例の内訳は糞便から O157例が分離された5例ならびに HUS 併発例2例（同胞の1例で分離）である。この同胞例の HUS 合併例2例のうち糞便から O157陰性の姉（図の実線）は病初期から抗体が160倍を示しており、抗体推移を提示した。7例の採血には、できる限り発症7日以内の発病早期症例の血清学的検査を試み、さらに2回以上の採血し、病日を追って抗体の推移を観察した。

5日以内に採血した症例3例はいずれも抗体は陰性（<10倍）であった。6日以後の採血ではすべて40倍以上を示した。抗体は6病日以降急速に上昇した。抗体は約2週間持続し、以降下降し、発症35日では3例中2例は HUS 合併の同胞例でピーク時から、20倍、40倍に低下していたが、低力価の抗体をわずかに保有していた。他の1例は陰性化していた（図）。

さらに、O157凝集抗体検査を測定した7例中4例においては、同時に O157LPS IgM 抗体を測定した。症例⑬第5病日の凝集抗体では<10で陰性であったが、O157LPS IgM 抗体は低い値であるが陽性であった。症例⑰は第3病日で凝集抗体ならびに O157LPS IgM 抗体共に陰性であった（表）。

この LPS 抗体検査で扱われた LPS の血清型は O26, O111, O113, O118, O121, O157, O165で、

O157以外の抗体はみられなかった。

考 察

牛の糞便中には大腸菌 O157が約1-10%に陽性であるとされる⁶⁾⁷⁾。国内各地から収集した子牛の大腸菌の内、Verotoxin producing *E. coli*, (VTEC) 陽性の大腸菌が19.4%同定されている⁸⁾。

血清抗体による O157による HUS の血清診断はオランダにおいて1974年から1989年76名の患児の凍結保存検体63中34検体（54%）に抗体を ELISA 法でスクリーニングし、immunoblotting 法で確認証明している⁹⁾。

O157による出血性大腸炎において、症状の出現後、病原体の検出されるのは短期間で、とくに HUS など病状が急速に進行した症例では病原体の検出不可能な例も少なくない。そこで著者らは血清抗体検査によって O157感染を診断することを目的として、今回の臨床研究で O157が検出された症例の血清の抗体を検討した。病原菌が分離されない症例でも、今後 O157感染症の診断が血清学的に可能であることを示唆した。

抗原となる細菌と患者血清との凝集反応は古くから抗原抗体反応の基本的検査であるが、原因病原体の証明が重視され、抗体検査法による診断法は普及

表 O157凝集抗体と O157 LPS IgM 抗体

O157凝集抗体検査と同時に4例に O157LPS IgM 抗体を測定した。1例で凝集抗体が陰性であったが、感度の高い O157LPS IgM 抗体は微量ながら検出された。

O157 antibody		(LPS IgM OD:0.244<+)	
case	day of illness	O157 agglutinating antibody	O157 LPS IgM antibody
⑬	5	<10	0.569
	9	640	1.567
⑭	7	160	1.736
	8	160	1.572
	9	160	1.747
	10	80	1.181
	15	80	1.587
	35	40	1.179
⑮	7	40	0.868
	8	40	1.207
	9	40	1.263
	10	80	1.884
	11	80	1.342
	12	40	1.376
	15	40	1.202
35	20	0.704	
⑰	3	<10	0.100
	6	80	0.650
	10	80	0.634
	16	80	0.566

していなかった。そこで、この方法のほかに近年精製された LPS 抗原を用い、感度の高い LPS 抗体と比較し検討した。

今回の報告では下痢発症後、5-6 病日で抗体が 160倍以上に上昇し、抗体価は約 1 カ月間持続することを確認した。このことは竹田ら¹⁰⁾¹¹⁾も指摘している。今回の抗体検査の内、初年度流行の血清(単独血清 2 例、ならびにペア血清、2 回以上の採血したものの 3 例)では、発症 6 日を経過しており、いずれも 160倍以上の高値を認め血清診断には応用できなかったため、次の研究計画として今回、下痢・血便などの発病後できるだけ早期に採血検査を試みた。1 週間以内の血清では抗体は陰性で、その後の抗体は 6 病日以降急速に上昇し、診断が可能である。さらに上昇した抗体価は約 2 週間持続し、以後は下降した。しかも同一症例の凝集抗体検査は同時に検査されたため、従来の報告と異なり、正確に抗体の変化を捉えることができた。

発症後、回復期の約 1 カ月(35 病日)で 3 例に検査された。3 例中 2 例は 20 倍および 40 倍に低下し、低力価の抗体を保有していた。他の 1 例は 10 倍未満で抗体を認めなかった。本検査により今後 O157 の感染を診断することが可能と考えられる。

著者らは 3 例において凝集抗体と同時に微量の抗体を検出できる O157LPS (IgM 値) で測定した。O157 の抗体を認めたが、その他の血清型 O26, O111, O113, O118, O121, O165 の LPS 抗体はみられず、交差抗体を認めなかった。

今回の O157 感染症の年齢分布では、発症例は乳幼児に多発し、保菌者例は成人に多くみられた。このことは有症者のみを隔離することは意義が少ないことを示唆する。2006 年国内の出血性大腸菌感染症の年齢別有症者の割合をみると、年少者と高齢者に高い比率を示した¹²⁾。最近の新聞報道でも老人施設での集団発生による死亡者の報告がみられている。

著者らの経験した O157 感染症で入院例の家族の検便により、保菌者と診断された 1 例について血清抗体を測定したところ、O157 が検出されたにもかかわらず、この保菌者の O157 凝集抗体は陰性であった。小林らは糞便から O157 を検出した保菌者小児 3 例の凝集抗体は陰性であったと報告している¹³⁾。

O157 凝集抗体ならびに O157LPS (IgM) 抗体の保有ならびに抗体上昇は O157 感染症の発症者だけに特徴的で、健康保菌者には証明されない。O157 の合併症である HUS 例では糞便から分離できない例が少ない。今後 O157 が分離できない例で、

抗体検査により診断の助けになるであろう。また感度が低い凝集抗体でも O157LPS (IgM) 抗体により検出が可能ながある。これらの抗体は発病7日以降では O157感染を反映したもので、O157感染症患児の有症者にのみ認められる抗体であり、今後診断に有用である。

結 語

出血性大腸炎 O157 : H7 感染症の血清学的診断を目的として、O157感染の診断が確定した患児の血清凝集抗体を病日の経過とともに測定した。本研究により、今後 HUS など糞便から O157が証明されない症例でも血清抗体による O157感染症の有症者の診断が可能であることを示唆した。

謝辞：本論文の一部は第68回日本小児科学会香川地方会において報告した。稿を終わるにあたり、指導頂いた旧国立小児病院小児医療研究センター感染症研究部長竹田多恵先生に深謝します。O157LPS 抗体の検査には国立小児病院小児医療研究センター感染症研究部（現国立成育医療研究センター）竹田多恵先生、原田視代先生にご協力いただきました。疫学にご協力・ご指導いただいた香川県健康福祉部主幹倉山幸治博士に深謝します。本研究に関して、患児の血清を本研究に使用することに、ご理解とご協力いただいた患児家族の方々に感謝します。

[文献]

- 1) 市場洋三. 岡山県における腸管出血性大腸菌 O157 : H7 による集団食中毒の概要. 医事新報 1996 ; 第3785号, 26-30.
- 2) 堺 宣道, 市場洋三. 第52回総合医学会指定シンポジウム, O157出血性大腸炎. 1997年11月 (高松).
- 3) 竹田多恵. 研究代表者 病原性大腸菌 O157による疾患の重症化の予防及び治療を目的とした医薬品の開発研究 第4分野 課題番号42282研究報告書 2000年4月.
- 4) Ito H, Takeda T, Honda M et al. Preventive Effect of TAKE-751S on complications of hemorrhagic colitis. Jpn J Antibiot 2002 ; 55, 203-27.
- 5) 日本小児腎臓病学会. 1996 : 腸管出血性大腸炎に伴う溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診断・治療のガイドライン.
- 6) 中澤宗生, 鮫島俊哉. 牛の腸管出血性大腸菌 O157 : H7 の排泄と飼料の関連. 感染症誌 2002 ; 76 : 76-7.
- 7) Elder RO, Keen JE, Siragusa GR et al. Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 Prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc Natl Acad Sci USA 2000 ; 97 : 2998-3003.
- 8) 中澤宗生, 甲斐明美. 日本のウシ由来ベロ毒素産生大腸菌の性状. 感染症誌 1994 ; 68 : 1437-39.
- 9) Chart H, Rowe B, Kar NVD et al. Serological Identification of Escherichia coli O157 as cause of haemolytic uraemics syndrome in Netherlands. Lancet 1991 ; 337 : 437.
- 10) 竹田多恵. 腸管出血性大腸菌の同定法 3. 血中抗体検査. 臨検 1992 ; 36 : 1339-43.
- 11) 竹田多恵, 本田雅敬, 五十嵐隆ほか. 溶血性尿毒症症候群と腸管出血性大腸菌の関連性に関する血清学的検討. 小児感染免疫 1992 ; 4 : 11-4.
- 12) 腸管出血性大腸菌感染症 (発生動向). IASR2006 ; 27 : 141-50.
- 13) 小林一寛, 田口真澄, 勢戸和子ほか. 下痢患者におけるベロ毒素産生大腸菌の血清学的診断法について. 感染症誌 1996 ; 70 : 80-6.

Serum Antibodies to *Escherichia coli* O 157 : H 7 in Entero-hemorrhagic *E.coli* Infection

Yoshinori Hamada, Tsuyako Iwai, Takeshi Hamaguchi,
Shoichi Endo, Kuniaki Fukuda, Takashige Okada,
Asayuki Iwai, Yukari Shinohara, Michiko Sone and Masao Gakemura

Abstract

Verotoxin-producing entero-hemorrhagic *Escherichia coli* O 157 : H 7 causes bloody diarrhea as the main symptom of infection. For serological diagnosis of this bacterial infection, we measured titers of the O 157-agglutinating antibody in the serum of seven pediatric patients in whose stool samples O 157 was detected.

In these patients, before and on the fifth day of onset of infection, the titer of this antibody was 1 : 10 or less (considered to be negative) ; however, after the sixth day, the titer rapidly increased and remained high for two weeks, which was followed by a rapid decrease. On the 35 th day of onset, two patients showed titers as low as 1 : 20 or 1 : 40 and one patient showed a negative titer.

The titer of the O 157-agglutinating antibody was negative in children in the control group as well as in an adult carrier from whose stool sample O 157 was isolated.

In four of the seven patients whose O 157-agglutinating antibody was tested, we measured titers of the IgM antibody to O 157 LPS to compare the titer values of the two antibodies. In one of the four patients, the O 157-agglutinating antibody titer was negative on the fifth day, whereas the titer of the IgM antibody to O 157 LPS was positive, indicating a discrepancy between the titer values of the two antibodies. In the remaining three patients, these antibody titers were both positive on the days tested.

In contrast, serum titers of the IgM antibodies to LPS of other strains of *E.coli* (i.e., O 26, O 111, O 113, O 118, O 121, and O 165) were negative in all of the patients. These antibodies did not show cross-reactivity with the IgM antibody to O 157 LPS, which indicated that this IgM antibody to O 157 LPS was specific to O 157.