

北海道においてまれに分離される血清型の 志賀毒素産生性大腸菌の性状

Phenotypic and Genetic Characters of Shiga Toxin-producing
Escherichia coli Isolates Which Show Minor Serotypes in Hokkaido

山口 敬治 池田 徹也 森本 洋

Keiji YAMAGUCHI, Tetsuya IKEDA and Yo MORIMOTO

Key words : STEC (志賀毒素産生性大腸菌) ; minor serotype (まれな血清型) ; biochemical characters (生化学性状) ; genetic characters (遺伝子性状) ; *stx2* variant (*stx2*変異)

人に感染し出血性腸炎や出血性尿毒症症候群 Hemorrhagic Uremic Syndrome (HUS) を起こす志賀毒素産生性大腸菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) には、様々な血清型が知られている¹⁾。日本において高い頻度でみられる O 血清型は O157 であり、検出 STEC 株の約 70% を占める。また O26 (約 20%) や O111 (約 4%) が比較的高い検出率を示している。O157, O26 及び O111 の 3 種の O 血清型 (以下、代表血清型) で分離 STEC のほとんどが占められている^{2,3)}。その他の O 血清型は、日本においてはまれであった⁴⁾。しかし、最近当所に搬入される STEC 菌株には、代表血清型以外の様々な血清型が認められるようになった。代表血清型以外の血清型の菌株は、生化学性状、志賀毒素 (以下、STX) 型ならびにその *stx* 遺伝子に多様性が認められることから、腸管出血性大腸菌検査を実施する上で注意が必要である。

今回、当所に平成 18, 19 年度に搬入された代表血清型以外の血清型を示す菌について各種性状を検討したので報告する。

材料及び方法

1. 使用菌株

使用した菌は O128 (2 株), O121 (6 株), O103 (2 株), O63 (1 株) の 4 血清型計 11 株を用いた。それぞれ北海道内の事例から得た菌株であった。送付された菌株は単コロニーを得た後、各種試験に供した。O 血清型ならびに H 血清型は病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研(株)製)を用い、使用説明書に従って試験を行った。

2. Polymerase Chain Reaction (PCR) による病原性遺伝子等確認試験

1) DNA の抽出

菌株はトリプトソイブイオン培地を用いて 35°C で一夜培養した。菌体を遠心分離して集菌した後、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 製) を用い、使用説明書に従い DNA を抽出した。

2) プライマー

stx1 及び *stx2* などの *stx* 遺伝子や病原性に関与するその他の遺伝子を検出するためのプライマーを Table 1 に示した。

Table 1 Primers Used in This Report

Target gene/s	Forward	Reverse	Ampricon size	Reference
<i>stxc</i>	GAGCGAAATAATTTATATGTG	TGATGATGGCAATTCAGTAT	518bp	16
<i>stx1</i>	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	AGCGATGCAGCTATTAATAA	130bp	17
<i>stx2</i>	TTCGGTATCCTATTCCCG	TCTCTGGTCATTGTATTA	471bp	18
<i>stx2</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2d-OX3a</i> , <i>stx2d-Ount</i>	AATACATTATGGGAAAGTAATA	TAAACTGCACTTCAGCAAAT	256bp	5
<i>stx2e</i>	CCTTAACTAAAAGGAATATA	CTGGTGGTGTATGATTAATA	230bp	19
<i>stx2f</i>	AGATTGGGCGTCATCACTGGTTG	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	428bp	6
<i>eae</i>	GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT	CTCTGCAGATTAACCTCTGC	591bp	20
<i>bfpA</i>	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	254bp	20
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	326bp	20
<i>astA</i>	GCCATCAACACAGTATATCC	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	106bp	20

3) PCR

Taq DNA ポリメラーゼは Ex Taq (TaKaRa Bio 製) を用い、使用説明書に従い反応液を調製した。PCR 反応条件は以下のとおりである。すなわち、94°Cの前加熱を5分間行った後、熱変性94°C 1分間、アニーリング55°C 1分間、伸張反応72°C 1分間を1サイクルとして、この増幅反応を30回繰り返す。最後に72°C 7分間の反応を行った。PCR 反応液は、臭化エチジウム添加2%GTG アガロースゲルに供して電気泳動した後、UV 照射下で増幅 DNA の確認を行った。

4) PCR-Random Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Table 1 に示したプライマーを使用し増幅した DNA 産物は制限酵素処理した後、PCR-RFLP に供し *stx* 遺伝子の多型解析を行った。すなわち、Piérard *et al.*⁵⁾ のプライマーを用いて増幅した DNA は *Hae* III ならびに *Pvu* II (TaKaRa Bio 製) を用い、Schmidt *et al.*⁶⁾ のプライマーによる増幅 DNA は *Eco* RV (TaKaRa Bio 製) を用い、最終制限酵素濃度が1 Unit/ μ L になるよう調製した。反応液中で37°C、30分間インキュベートした。制限酵素処理液は臭化エチジウム添加2%GTG アガロースゲルで電気泳動し、UV 照射下で DNA 断片の比較解析を行った。

3. 形態及び生化学性状

最初に、菌株を CHROMAgar O157TAM 培地 (CHROMAgar 製) ならびに Tricolor 培地 ((株)エルメックス製) の酵素基質培地に画線塗抹後培養しコロニーの形態を観察した。

次に、生化学性状試験には、TSI 培地 (Merck 製)、LIM 培地、VP 半流動培地、シモンズクエン酸培地 (栄研化学(株)製) 及び CLIG 培地 (極東製薬工業(株)製) を使用した。糖からの酸産生能は、乳糖ならびに白糖を1%添加したフェノールレッドブイオン培地 (Merck 製) に菌株を接種後35°Cで21日間培養して酸産生能を観察した。 β -ガラクトシダーゼ試験 (ONPG 試験) は菌苔を適宜滅菌生理食塩水に懸濁し、ONPG ディスク (Biomérieux 製) を添加後35°Cで2時間インキュベートし判定した。

4. Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) 法ならびにイムノクロマト法による STX の確認

菌株の STX 産生性は、RPLA 法とイムノクロマト法を用いて確認した。RPLA は VTEC-RPLA (デンカ生研(株)製) を、イムノクロマトはデュオパスベロトキシン (Merck 製) を用い、いずれも使用説明書に従い試験を実施した。

5. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

1) プラグ作成

単コロニーから菌を LB broth (BD-Difco 製) に接種し、37°Cで24時間培養した。培養液を0.5 mL 採取し遠心分離した。上清を除き、菌体を1×Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl [pH8.0]・1 mM EDTA [pH8.0]) (TE buffer) に懸濁し遠心分離した。この操作を3回繰り返す、

菌体を洗浄した。最終的に上清を除いた菌体を TE buffer 150 μ L に再懸濁し、これに50°Cに保温した1.2% [W/V] メガベースアガロース (BIO-RAD 製) を等量混和しプラグを作成した。固化したプラグは2 mL のリゾチーム溶液 (0.5 M-EDTA [pH8.0], Lysozyme [3 mg/mL]) に移し、37°Cで6時間振とう (70 rev/min) しながらインキュベートした。プラグをリゾチーム溶液から取り出し、プロテイナーゼ K 溶液 (0.5 mM-EDTA [pH8.0], Proteinase K [1 mg/mL], 1% [W/V] *N*-lauroylsarcosine) に入れ、振とう (70 rev/min) しながら55°Cで一晩インキュベートした。インキュベーション後、プラグは2 mM Pefabloc 溶液 (Roche Diagnostics 製) に移し室温で30分間酵素失活を行った。その後、TE buffer で2回洗浄し、制限酵素 buffer で平衡化を行い、*Xba* I、*Bln* I による処理 (50 U/プラグ) を37°Cで16時間行った。

2) PFGE 及び泳動像の分析

PFGE には CHEF-DR II (BIO-RAD 製) を用いた。適切な大きさに切ったプラグを1% [W/V] Seakem Gold アガロース (TaKaRa Bio 製) ゲルに包埋し、0.5×Tris-Borate-EDTA バッファー中で、バッファー温度14°C、パルスタイム2.2秒から54.2秒、電圧200V、泳動時間21時間の条件で泳動を行った。電気泳動後、ゲルを臭化エチジウム (1 μ g/mL) で染色し、紫外線照射下で観察した。PFGE 法により得た DNA 切断パターンは PHOTODYNE (Atto 製) を用いて TIFF ファイル化した。次いで BioNumerics ver. 4.0 (Applied Math 製) を用いて Dice 法により解析した。なお、クラスター分析には、Tolerance 1.2% の条件で Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average 法を用いた。

結果及び考察

1. 生化学性状及び分子疫学解析

血清型ならびに生化学性状を Table 2 に示した。

O128 : H2株は北海道内でも散发例が認められた。平成18年は、1カ月以内の期間に比較的距離に近い2カ所で発生した。当所での検査では、生化学性状はガス産生能がやや異なる以外ほぼ同一であった (Table 2)。分子疫学解析を行い菌株の相同性を検討した結果、O128 : H2分離株は異なる起源であることが推定された (Fig. 1)。

家族内事例から分離された O121 : H19株は、4株すべてが混合3ならびに O114単味血清に軽い凝集性が認められた。このことから当所の保存菌株の O114(?) : H19 (1997年臨床株) 2株を再検査したところ、血清型は O121 : H19であった。保存菌株を対照株とし O121 : H19株6株を比較した。分離株の4株は TSI 高層斜面培地で斜面部が弱いものの赤色を呈し、乳糖・白糖からの酸産生が弱い株であることが示唆された (Table 2)。乳糖・白糖のおの単独の基質を用いて酸産生能を確認したところ、乳糖は翌日陽性反応が、白糖は10日後陽性反応が認められた (Table 2)。マッコンキー寒天培地に分離菌株を画線塗抹

Table 2 Biochemical Characters of STEC Isolates

No.	Sample No.	Serovar	Shiga toxin type	Colony color		TSI			LIM			CLIG			Acid from					
				TAM	Tricolor	Slant/butt	H ₂ S	Gas	Lysine	Indole	Motility	VP	M/R	SC	ONPG	Slant/butt	Gas	MUG	Lactose	Sucrose
1	sp/07-4	O128 : H2	STX1 & STX2	indigo blue	blue	A/A	-	++	+	+	+	-	+	-	+	K/A	+w	+	+	+
2	sp/07-4	O128 : H2	STX1 & STX2	indigo blue	blue	A/A	-	+w	+	+	+	-	+	-	+	K/A	+	+	+	+
3	sp/07-27	O121 : H19	STX2	indigo blue	blue	K/A	-	+	+	+	+w	-	+	-	+w	K/A	-	+	+	+10
4	sp/07-27	O121 : H19	STX2	indigo blue	blue	K/A	-	+	+	+	+w	-	+	-	+w	K/A	-	+	+	+10
5	sp/07-27	O121 : H19	STX2	indigo blue	blue	K/A	-	+	++	+	+w	-	+	-	+w	K/A	-	+	+	+10
6	sp/07-27	O121 : H19	STX2	indigo blue	blue	K/A	-	+	++	+	+w	-	+	-	+w	K/A	-	+	+	+10
7	sp/97a	O121 : H19	STX2	indigo blue	blue	A/A	-	++	+	+	+	-	+	-	+	K/A	-	+	+	-
8	sp/97a	O121 : H19	STX2	indigo blue	blue	K/A	-	+	+	+	+	-	+	-	+w	K/A	-	+	+	-
9	sp/07-36	O103 : H2	STX1	indigo blue	indigo blue	A/A	-	++	+	+	+	-	+	-	+	K/A	-	+w	+	+
10	sp/07-36	O103 : H2	STX1	indigo blue	indigo blue	A/A	-	+	+	+	+	-	+	-	+	K/A	+w	+w	+	+
11	sp/07-26	O63 : H6	STX2	indigo blue	blue	A/A	-	++	+	+	+	-	+	-	+	K/A	-	+w	+	+

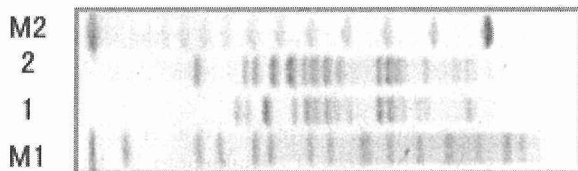
TAM : CHROMAgar O157TAM, H₂S : hydrogen sulfide test, Gas : gas producing, Lysine : lysine decarboxylase test, Indole : indole test, VP : Voges Proskauer test, SC : Simmon's citrate utility test, MUG : methylumbelliferyl-β-D-glucuronidase test

Table 3 Genetic Characters and Shiga Toxin Type of STEC Isolates

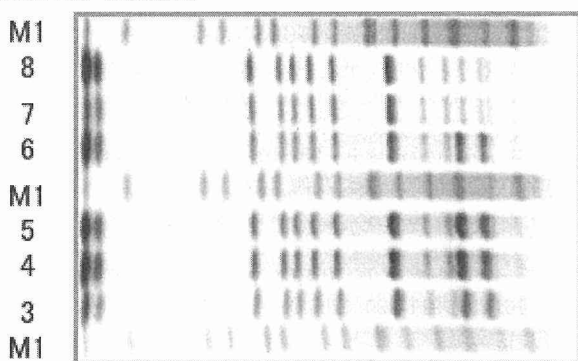
No.	Sample No.	Serovar	PCR stx and other gene/s harbored	Shiga toxin type	RPLA		Immunochromatograph	
					STX1	STX2	STX1	STX2
1	sp/07-4	O128 : H2	<i>stx1, stx2d-ount</i>	STX1 & STX2	+	-	+	+
2	sp/07-4	O128 : H2	<i>stx1, stx2d-ount</i>	STX1 & STX2	+	-	+	+
3	sp/07-27	O121 : H19	<i>stx2, eae</i>	STX2	-	+	-	+
4	sp/07-27	O121 : H19	<i>stx2, eae</i>	STX2	-	+	-	+
5	sp/07-27	O121 : H19	<i>stx2, eae</i>	STX2	-	+	-	+
6	sp/07-27	O121 : H19	<i>stx2, eae</i>	STX2	-	+	-	+
7	sp/97a	O121 : H19	<i>stx2, eae</i>	STX2	-	+	-	+
8	sp/97a	O121 : H19	<i>stx2, eae</i>	STX2	-	+	-	+
9	sp/07-36	O103 : H2	<i>stx1, eae</i>	STX1	+	-	+	-
10	sp/07-36	O103 : H2	<i>stx1, eae</i>	STX1	+	-	+	-
11	sp/07-26	O63 : H6	<i>stx2f, eae, astA</i>	STX2	-	-	-	+w

RPLA : Reversed Passive Latex Agglutination test, +w : weakly positive

O128:H2 isolates



O121:H19 isolates



M1 : *Salomonella* Braenderup H9812 after restriction digestion with *Xba* I, M2 : Lambda Ladder
1-2 : sp/07-4 isolates, 3-6 : sp/07-27 isolates, 7-8 : control strain (sp/97a)

Fig. 1 PFGE Pattern of STEC O128:H2 and O121:H19 Isolates

培養したところ、コロニーは帯褐白色を示し、ONPG 試験では弱い陽性反応を示した (Table 2)。従って、分離株は乳糖からの酸産生は弱く、白糖は遅分解であったことが確認された。対照株では白糖からの酸産生が陰性であった。保存株 2 株のうち 1 株は ONPG 試験が陽性で TSI 培地の斜面部は酸性化し黄色を呈した。他の 1 株は ONPG 試験が弱い陽性のため、TSI 培地の斜面部は赤色を呈した。血清型 O121 : H19 の 6 株について、PFGE による分子疫学分析を行い菌株の相同性を検討した結果、07 年の分離株は同一起源である可能性が示唆された (Fig. 1)。

なお、家族内事例発生から分離された O103 : H2 株と O63 : H6 株の菌株について、基本的生化学性状が大腸菌のものに一致していることが認められた。

2000~2006 年の 7 年間に自治体から国立感染症研究所に報告のあった 13,007 株の STEC における O 血清型別占有率は O128, O121, O103, O63 はそれぞれ 0.18%, 0.89%, 0.89%, 0.09% であった³⁾。代表血清型及び O UT 以外はいずれも O 血清型別占有率は 1% 以下であり、STEC 検査でまれに検出されるものと考えられる。しかし、これらの中には重篤な症状を示すものもあり、今後、検査法の検

討をはじめ、症例からの分離や媒介物のモニター等広範な調査が必要と考えられる。

2. 病原遺伝子ならびに STX 型

stx 遺伝子等の PCR 結果ならびに RPLA 及びイムノクロマト法による STX 検査結果を Table 3 に示した。O121 : H19株は *stx2* を保有し、RPLA ならびにイムノクロマト法でも STX2陽性であった。O103 : H2は *stx1* を保有し、RPLA ならびにイムノクロマト法でも STX1陽性であった。一方、O128 : H2株は *stx1* 及び *stx2* の variant である *stx2d-ount* を保有し、STX 型も STX1及び STX2陽性と判定された。しかし、STX2についてはイムノクロマト法では陽性になったものの、RPLA 法では陽性を示さなかった。O63 : H6株は *stx2* の variant である *stx2f* を保有し、STX2陽性であった。イムノクロマト法では反応は弱いものの陽性であったが、RPLA 法では陽性を示さなかった。*eae* 遺伝子は O128 : H2株を除くすべての菌株に、*astA* 遺伝子は O63 : H6株のみにみられた。

stx 遺伝子は互いに血清学的に交差しない *stx1* 及び *stx2* が知られるが、いずれも variant が報告されている。特に *stx2* は遺伝子配列の相同性が60%程度の variant が多数確認されている^{8,9)}。*stx2d-ount* 遺伝子が確認された O128 : H2株は、当所保存株の中にも *stx2d-ount* 遺伝子保有株が多く、また、海外でも *stx2d-ount* 遺伝子保有株が知られている^{7,10)}。今回、*stx2d-ount* 遺伝子は Schmidt *et al.* のプライマーの使用とイムノクロマト法により検出されたが、STX 検査において使用説明書に従って実施した RPLA 法では検出されなかった。また、各地で検出された O63菌株は、(1) O63 : H6, STX2産生, *stx2f* (+), *eae* (+), (2) O63 : HNM, STX2産生, *stx2f* (+), *eae* (+), (3) STX2産生性 O63とそれぞれ特徴のある菌株であった^{11,12)}。いずれの O63菌株も STX2を産生している。しかし、当所で検査した菌株では RPLA 法による STX2検出が困難なものがあつた。これらのことから、適切なプライマー選択とイムノクロマト法併用が STX 検出にあたって重要であると考えられる。

O121 : H19及び O103 : H2は、ともに東北地方で1990年代後半に確認されている¹³⁻¹⁵⁾。これらは、いずれも牛との関連が示唆されている。今回の再検査で、北海道においても過去に分離されていたことが明らかになった。O121 : H19は感染者に重篤な症状を惹起することが報告されていることから、酪農人口の大きい北海道では、感染に至る経路を究明し感染予防対策をとることが必要であると考えられる。

現在、STEC の検査は主に O157のみ、もしくは O157と O26を対象とする検査が行われているが、今後はまれに検出される血清型をも念頭に置いて検査することが肝要である。集団事例発生時には、大量の試料を迅速に検査する

ことが求められる。また、散発事例でも迅速な検査が求められることから、あらかじめ *stx* variant 株の存在を考慮に入れた試験系を組み立てることが重要であると考えられる。

文 献

- 1) 坂崎利一：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒，中央法規出版，東京，2000，pp.266-291
- 2) 伊藤 武：食品衛生研究，56(6)，9-16 (2006)
- 3) 感染症研究所感染症情報センター：
<http://idsc.nih.gov/iasr/virus/graph/vtec0006.xls> (2007)
- 4) 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科食中毒研究班：東京都微生物検査情報，28(5)，45-46 (2006)
- 5) Piérard D, Muylldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S : J. Clinical Microbiol., 36(11), 3317-3322 (1998)
- 6) Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H : Applied Environ. Microbiol., 66(3), 1205-1208 (2000)
- 7) Beutin L, Zimmermann S, Gleier K : Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 42(1), 1-8 (2002)
- 8) Beutin L, Steinruek H, Krause G, Steege K, Haby S, Huiltsch G, Appel B : J. Applied Microbiol., 102(3), 630-639 (2007)
- 9) Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR : J. Clinical Microbiol., 29(7), 1339-1343 (1991)
- 10) Djordjevic SP, Ramachandran V, Bettelheim KA, Vanselow BA, Holst P, Bailey G, Hornitzky MA : Applied Environ. Microbiol., 70(7), 3910-391 (2004)
- 11) Seto K, Taguchi M, Kobayashi K, Kozaki S : Jpn. J. Vet. Med. Sci., 69(12), 1215-1222 (2007)
- 12) 山口仁孝, 山崎省吾, 野口英太郎：長崎県衛生公害研究所報，47，21-28 (2002)
- 13) 八柳 潤, 齋藤志保子, 伊藤 功：病原微生物検出情報，22(6)，141-142 (2001)
- 14) 八柳 潤, 齋藤志保子, 木内 雄, 鈴木陽子, 佐藤宏康, 森田盛大：病原微生物検出情報，18(6)，132-133 (1997)
- 15) 八柳 潤, 齋藤志保子, 佐藤宏康, 熊谷 学, 小林良雄, 玉田清治, 対馬典子, 筒井理華, 大友良光, 大谷勝実, 村山尚子, 片桐 進, 小黒美舎子：病原微生物検出情報，20(1)，10-11 (1999)
- 16) Yamasaki S, Lin Z, Shirai H, Terai A, Oku Y, Ito H, Ohmura M, Karasawa T, Tsukamoto T, Kurazono H, Takeda Y : Microbiol. Immuno., 40(5), 345-352 (1996)
- 17) Pollard DR, Johnson WN, Lior H, Tyler D, Rozee KR : J. Clinical Microbiol., 28(3), 540-545 (1990)
- 18) Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Manning PA : J. Clinical Microbiol., 31(11), 3063-3067 (1993)
- 19) Johnson M, Pollard DR, Lior H, Tyler SD, Rozee KR : J. Clinical Microbiol., 28(10), 2351-2353 (1990)
- 20) 小林一寛, 瀬戸和子, 八柳 潤, 齋藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎 貢, 林 賢一, 松根 渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田 亨, 伊藤健一郎：感染症学雑誌，76(11)，911-920 (2002)