

## 37. 大腸菌の病原性に關与する遺伝子群の 保有実態に關する包括的調査研究

○ 秋山由美（兵庫県立健康生活科学研究所）

### 【目的】

平成 23 年に、国内では富山県を中心に腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0111 が、また、欧州ではドイツを中心として EHEC0104 が原因となる食中毒が発生し、ともに複数の死者が出る大規模集団事例となった。これらの事例では、従来から知られていたベロ毒素 (VT) 産生性の 0111 に加えて、VT を産生しない 0111 も多数検出された。また、0104 は VT2 産生性であるが、欧州の事例では EHEC が一般的に保有する腸管への限局的な付着因子を欠き、代わりに腸管凝集付着性大腸菌 (EAaggEC) が持つ付着因子を有することが明らかになった<sup>1)</sup>。このような人に起病性を有する下痢原性大腸菌では、様々な遺伝子群が組み合わさって特徴的な症状を発現させているが、これらの遺伝子がファージやトランスポゾン等によって菌株間を移動することで新たな形質を持った病原菌が出現すると考えられる。このため、大腸菌の病原性の解明には、これまでの血清型別に依拠した特定遺伝子に加えて、様々な病原遺伝子やその作用を増強する等の関連遺伝子についても調査対象とすることが必要となっている。そして、複数の病原因子を組み合わせた新たな下痢原性大腸菌の出現に対して、監視体制を強化することが食中毒予防対策として重要である。

そこで、毒素因子に加えて付着因子等合計 12 種の遺伝子の保有状況を迅速に明らかにできる、簡便かつ安価なマルチプレックス-コンベンショナル PCR 法を確立した。さらに、健康福祉事務所や食肉衛生検査センターの協力を得て、県下で発生した食中毒事例で分離した菌や、県内飼育牛に常在する大腸菌について、病原遺伝子の包括的実態調査を行った。

### 【材料と方法】

#### 1. マルチプレックス-コンベンショナル PCR 法

下痢原性大腸菌が保有する主要な 12 種の病原遺伝子を増幅するプライマーを、①毒素因子 (*stx1*, *stx2*, *STp*, *STh*, *LT*)、侵入因子 (*invE*)、②付着因子 (*eae*, *aggR*)、凝集付着性大腸菌耐熱性毒素 (*astA*)、散在付着性大腸菌侵入因子 (*afaD*)、③細胞致死性毒素 (*cdt*)、細胞壊死毒素 (*cnf*) の 3 グループに分けて混合したマルチプレックス PCR 法を実施した<sup>2,3)</sup>。PCR 反応試薬には GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega) を用い、反応条件は 95°C 5 分の後、95°C 30 秒、50°C (グループ①) または 55°C (グループ②および③) 30 秒、72°C 1 分の反応を 30 サイクル行い、その後 72°C で 7 分増幅した。ここで *cdt* および *cnf* が検出された菌株は、既報のプライマー<sup>3-5)</sup> および新たに設計したプライマー (表 1) により、型別を行った。

表1 *cdt*および*cnf*遺伝子の選択的な増幅に用いたプライマー

標的 遺伝子	プライマー	配列 (5'→3')	アニーリング 温度 (°C)	増幅サイズ (bp)
<i>cdt III</i>	cdtIII-f782	GACACAAACGAGTCAACGAA	54	782
	cdtIII-r	GTGATCTCCTTCCATGAAAATATAGT		
<i>cnf1</i>	cnf1-f669	TATCGTAGTCCCGGAGGTATCTG	60	669
	cnf1-r669	TGCGGTAATTTTGGGTTTGTATCAG		
<i>cnf2</i>	cnf2-f667	GTCGCAATTCGCGAGGTGTC	60	667
	cnf2-r667	GCGGTAGTTTTGGGGTCAATTA		

## 2. 人由来株の病原遺伝子調査

平成 24 年 4 月から平成 25 年 8 月に兵庫県内で腸管出血性大腸菌感染症の届け出があった患者および保菌者の便から分離された EHEC125 菌株、食中毒事例で患者便から分離された大腸菌 27 菌株、および患者便 28 検体を病原遺伝子の調査対象とした。

## 3. 健康牛由来株の病原遺伝子調査

兵庫県内で飼育され、平成 24 年 11 月から平成 25 年 8 月に屠殺された牛 100 頭の腸内容物を EC ブイヨンで増菌後、マッコンキー寒天培地に塗布し、病原遺伝子を保有する大腸菌を探索した。すなわち、平板上のコロニー密集部分から集菌するコロニースイープで各牛が保有している病原遺伝子を予測した後、一頭当たり 30 以上の大腸菌コロニーについて、スクリーニングで陽性となった遺伝子の検出を行った。

## 【結果】

### 1. 人由来株が保有する病原遺伝子

腸管出血性大腸菌感染症の患者および保菌者の便から分離された EHEC の病原遺伝子保有状況を表 2 に示した。VT 産生に関与する遺伝子は、0157 から *stx1* と *stx2* が同時、あるいは *stx2* が単独で検出され、026、0103、0145 から *stx1* が単独で、091、0121 から *stx2* が単独で検出された。また、細胞への局在付着性に関与するインチミン遺伝子(*eae*)が、091を除く 124 株から検出された。*aggR*等のその他の病原遺伝子は検出されなかった。

また、食中毒患者便から副次的に分離された大腸菌について、12 種の病原遺伝子調査を行った結果、*eae*、*astA*および*cnf1*を保有する菌が少数ながら見つかった(表 3)。

表 2 人由来腸管出血性大腸菌の病原遺伝子保有状況

血清型	検査した 菌株数	遺伝子保有菌株数		
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
0157:H7	60	40	60	60
0157:H-	22	17	22	22
026:H11	36	36	0	36
026:H-	1	1	0	1
091:H21	1	0	1	0
0103:H2	1	1	0	1
0121:H19	1	0	1	1
0145:H-	3	3	0	3
合計	125	98	84	124

表 3 食中毒患者から副次的に分離された大腸菌の病原遺伝子

血清型	検出された 遺伝子	菌株の由来
015:HUT	<i>astA</i>	カンピロバクター食中毒患者便
018:H7	<i>cnf1</i>	ロタウイルス食中毒患者便
0127a:H51	<i>eae</i>	サボウイルス食中毒患者便
08:HUT	<i>astA</i>	ノロウイルス食中毒患者便
OUT:HUT	<i>astA</i>	ノロウイルス食中毒患者便
OUT:HUT	<i>astA</i>	ノロウイルス食中毒患者便
0153:H21	<i>eae</i>	ノロウイルス食中毒患者便
OUT:H19	<i>eae</i>	ノロウイルス食中毒患者便
0114:H5	<i>cnf1</i>	ノロウイルス食中毒患者便

表4 牛の下痢原性大腸菌保有状況

検査した牛の数	下痢原性大腸菌陽性	EHEC陽性	遺伝子を保有していた牛の数							
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>STp</i>	<i>eae</i>	<i>astA</i>	<i>cdt</i>	<i>cnf</i>	
合計 100	79	32	10	31	21	29	52	47	32	
%	79.0	32.0	10.0	31.0	21.0	29.0	52.0	47.0	32.0	
去勢 74	57	20	7	19	14	24	37	35	23	
%	77.0	27.0	9.5	25.7	18.9	32.4	50.0	47.3	31.1	
雌 26	22	12	3	12	7	5	15	12	9	
%	84.6	46.2	11.5	46.2	26.9	19.2	57.7	46.2	34.6	

## 2. 健康牛の病原遺伝子保有状況

調査した牛 100 頭中、去勢牛が 74 頭で雌牛が 26 頭、これらの月齢は 25~34 ヶ月が 96 頭で、残りは 18、20 ヶ月の去勢牛、147、205 ヶ月の雌牛が各 1 頭であった。表 4 に、下痢原性大腸菌、その中で EHEC、さらに各病原遺伝子を保有していた牛の数を性別に示した。これらの  $\chi^2$  検定では、去勢牛と雌牛の間に保有率の有意差(有意水準 5%) は認められなかった。病原遺伝子が検出されなかったのは 21 頭で、79 頭から何らかの病原遺伝子を持つ下痢原性大腸菌のべ 184 株が検出された。EHEC は、牛 32 頭からのべ 49 株が検出された。*astA* を半数以上の牛が保有しており、次いで、*cdt*、*cnf*、*stx2* の順で保有率が高かった。なお、ヒト型耐熱性エンテロトキシン遺伝子(*STh*)、易熱性エンテロトキシン遺伝子(*LT*)、*invE*、*aggR*、*afaD* の各遺伝子は検出されなかった。

次に、牛由来の下痢原性大腸菌 184 株の病原遺伝子保有状況を表 5 に示した。EHEC49 株中、*stx2* 単独保有が 20 株、*stx1* と *stx2* の同時保有が 6 株、また *stx2* と *eae* を保有する 0157:H7 が 3 株見つかった。その他にも、ブタ型耐熱性エンテロトキシン遺伝子(*STp*)や *astA* 等を同時保有する菌株が存在した。*STp* を保有する腸管毒素原性大腸菌(ETEC)は 18 株、*eae* を保有する腸管病原性大腸菌(EPEC)は 25 株分離された。*astA* は単独保有 40 株を含む 68 株が保有していた。*cdt* は 55 株が保有しており、型別では、*cdt I* が 1 株、*cdt III* が 41 株、*cdt V* が 13 株であった。*cnf* は 34 株が保有し、これらはすべて *cnf2* 型で、このうちの 33 株は *cdt III* と *cnf2* を同時保有していた。牛由来の下痢原性大腸菌の約 7 割は血清型別不能であったが、決定できた主な血清型を表 5 に示した。

### 【考察】

今回の調査では 12 種の病原遺伝子を対象としたが、検出されたのは *stx1*、*stx2*、*STp*、*eae*、*astA*、*cdt* および *cnf* の 7 種に限定された。人由来 EHEC からは、従来通り *stx1*、*stx2* および *eae* のみが検出され、VT との共存により強毒化が懸念される 0104 で検出された凝集付着因子(*aggR*) は検出されなかった。人由来大腸菌の中には、行政上、食中毒の原因とは判定されなかったものの、*eae*、*astA* および *cnf1* を単独で保有する菌株が存在しており、これらの病原性や分布状況の調査が必要と思われた。

牛の下痢原性大腸菌の保有率は 79%と高く、EHEC に限定すると 32%であった。分離した牛由来 EHEC49 株中に *aggR* を同時保有するものはなかったが、20 株は *STp*、*astA* あるい

表5 牛由来下痢原性大腸菌の遺伝子保有状況

分類	検出された病原遺伝子の組み合わせ							菌株数	決定できた主な血清型
腸管出血性大腸菌(EHEC)								49	
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>STp</i>		<i>astA</i>			1	
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>						6	
	<i>stx1</i>		<i>STp</i>		<i>astA</i>			2	
	<i>stx1</i>					<i>cdt III</i>	<i>cnf2</i>	2	01:H7
		<i>stx2</i>	<i>STp</i>	<i>eae</i>	<i>astA</i>			2	0119:H-
		<i>stx2</i>	<i>STp</i>		<i>astA</i>			4	0119:H16
		<i>stx2</i>	<i>STp</i>					2	01:H45, 074:H7
		<i>stx2</i>		<i>eae</i>	<i>astA</i>			2	0119:H-
		<i>stx2</i>		<i>eae</i>		<i>cdt V</i>		1	
		<i>stx2</i>		<i>eae</i>				3	0157:H7
		<i>stx2</i>			<i>astA</i>			3	08:H2
		<i>stx2</i>				<i>cdt V</i>		1	
		<i>stx2</i>						20	08:H19, 074:H-
腸管毒素原性大腸菌(ETEC)								18	
			<i>STp</i>	<i>eae</i>	<i>astA</i>			1	
			<i>STp</i>	<i>eae</i>				1	
			<i>STp</i>		<i>astA</i>			4	0142:H-
			<i>STp</i>					12	01:H7, 0142:H19
腸管病原性大腸菌(EPEC)								25	
				<i>eae</i>	<i>astA</i>			2	
				<i>eae</i>				23	0153:H19, 028ac:H-
他の下痢原性大腸菌								92	
					<i>astA</i>	<i>cdt III</i>	<i>cnf2</i>	2	0114:H28
					<i>astA</i>	<i>cdt I</i>		1	
					<i>astA</i>	<i>cdt III</i>		1	
					<i>astA</i>	<i>cdt V</i>		3	08:H40, 0112ac:H2
					<i>astA</i>			40	01:H7, 08:H16
						<i>cdt III</i>	<i>cnf2</i>	29	08:H7, 015:H21
						<i>cdt III</i>		7	
						<i>cdt V</i>		8	08:H45, 091:H9
							<i>cnf2</i>	1	08:H2
合計	11	45	29	35	68	55	34	184	

は *cdt* を同時保有しており、人由来 EHEC と異なる傾向が認められた。*astA* は、EHEC のみならず ETEC や EPEC から検出され、*cdt* を同時保有する 7 株も検出された。*astA* は分離菌株中の保有率が 37% と最も高く、*astA* が下痢原性大腸菌に広く分布するという報告<sup>6)</sup>を裏付けるデータが得られた。*astA* の下痢との関連は明らかになっていないが、*astA* 保有菌が原因と考えられる集団食中毒事例の報告<sup>7)</sup>もあり、検査を継続すべき遺伝子である。*cdt III* と *cnf2* は pVir プラスミド上に存在し、牛からはこれらの同時保有株が多く分離されることが報告されており<sup>8)</sup>、今回の調査でも同様の結果が得られた。また、牛から検出された *cnf* はすべて *cnf2* であったが、人から検出されたのは *cnf1* であったことから、今後調査事例を増やして、*cdt* や *cnf* の種間での遺伝子型の違いと病原性との関連について明らかにする必要があると考えている。

### 【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人大同生命事業団に心より感謝いたします。また、牛の保有菌の採取にご協力いただいた兵庫県食肉衛生検査センターの皆様、ならびに有症者便由来の菌株をご提供いただいた兵庫県健康福祉事務所検査室の皆様に厚く御礼申し上げます。

### 【参考文献】

- 1) 寺嶋 淳, 他: 腸管出血性大腸菌感染症の最近の動向, 食品衛生研究, **61**, 7-15 (2011)
- 2) 平成 23 年度新興再興感染症技術研修 資料「遺伝子検査法」, 国立感染症研究所
- 3) Toth, I. et al. : Production of Cytolethal Distending Toxins by Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Human and Animal Sources: Establishment of the Existence of a New *cdt* Variant (Type IV), *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4285-4291 (2003)
- 4) Mehdipour, S. et al. Detection of cytolethal distending toxin (*cdt*) and cytotoxic necrotizing factor (*cnf*) genes among *Escherichia coli* isolates from Iranian sheep carcasses, *Comp. Clin. Pathol.*, **21**, 1683-1688 (2012)
- 5) Bielaszewska, M. et al. : Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Non-O157 Serogroups, *Infect. Immun.* **72**, 1812-1816 (2004)
- 6) Savarino, S. J. et al. : Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin Is Not Restricted to Enteroaggregative *E. coli*, *J. Infect. Dis.*, **173**, 1019-1022 (1996)
- 7) Zhou, Z. et al. : An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1(EAST1), *Epidemiol. Infect.*, **128**, 363-371 (2002)
- 8) Clark, C. G. et al. : PCR for Detection of *cdt-III* and The Relative Frequencies of Cytolethal Distending Toxin Variant-Producing *Escherichia coli* Isolates from Humans and Cattle, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2671-2674 (2002)

### 【経費使途明細】

細菌培養消耗品 (培地、シャーレ等)	45, 885
PCR 用試薬及び器具 (PCR 用マスターミックス、コーム等)	193, 410
遺伝子解析用試薬 (シークエンスキット)	42, 840
光熱水費	21, 769
旅費	1, 120
合計 (助成金 30 万円、交通費 5000 円および預金利息 24 円を含む)	305, 024