

[ ノート ]

## 小児下痢症患者から分離された $stx_{2f}$ 遺伝子保有 志賀毒素産生性大腸菌O63 : H6の性状

西海 弘城\* 谷岡 絵理  
辻 英高 山岡 政興

Characterization of Shiga Toxin producing *Escherichia coli* O63 :  
H6 harboring  $stx_{2f}$  Gene Isolated from Infantile Diarrhea

Hiroki NISHIUMI\*, Eri TANIOKA, Hidetaka TSUJI and Masaoki YAMAOKA

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of  
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,  
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Shiga toxin producing *Escherichia coli* O63 : H6 was isolated from feces of 11 years old boy suffered with abdominal pain and muddy diarrhea. This isolate carried  $stx_{2f}$ , *eaeA* and *astA* gene, but neither *stx1*, *bfpA*, *aggR* nor *hlyA* gene as pathogenic genes.

### I はじめに

志賀毒素産生大腸菌(STEC)は下痢, 血便, 出血性大腸炎や溶血性尿毒症候群など人に対して重篤な症状を引き起こす病原細菌として知られている。STECは病原因子のひとつとして毒素を産生する。産生する毒素は大きく2種類に分別される。赤痢菌の産生する志賀毒素と免疫学的, 物理化学的及び生物学的性状が同じであるStx1と, Stx1と生物学的性状は似ているが, アミノ酸配列の相同性が約55%で, 免疫学的, 物理化学的性状が異なるStx2である<sup>1)</sup>。Stx2にはさらに変異型であるStx2c<sup>2)</sup>, Stx2d<sup>3)</sup>, Stx2e<sup>4)</sup>, Stx2f<sup>5)</sup>等が知られている。Stx2, Stx2c及びStx2dは人分離株が産生する毒素である<sup>7)</sup>。一方, Stx2eは主に豚の浮腫病の原因菌が産生す

ると考えられている<sup>4, 7)</sup>。Stx2fは鳩分離株から検出されており<sup>5, 7)</sup>, いずれも人分離株から検出されることは稀である。

今回, 我々は人からStx2変異型毒素産生遺伝子の一つである $stx_{2f}$ を保有するSTEC O63 : H6を分離し, その性状を検討したので報告する。

### II 材料と方法

#### 1. 事例概要

2007年7月, 兵庫県洲本市在住の11歳の男児が腹痛及び泥状の水様性下痢を主訴として医療機関を受診した。糞便の検査を行ったところ, 大腸菌O63が検出された。患者はオフロキサシンを投与され, 数日後に治癒した。家族は3人で, 家族には下痢等の症状はみられず, 大腸菌O63は検出されなかった。

#### 2. 分離菌株の同定と血清型別

分離菌株は常法に従い, 生化学的性状により同定し,

感染症部

\* 別刷請求先 : 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所

感染症部 西海 弘城

デンカ生研製のO血清及びH血清を用いて血清型を決定した。

### 3. 志賀毒素の検出及び志賀毒素の産生誘導

志賀毒素Stx1及びStx2の検出は、VTEC-RPLA(デンカ生研)によりRPLA法で行った。方法はキット付属の説明書に従った。また、mitomycin C (MMC)をTryptic soy brothに最終濃度500ng/mLから10倍段階希釈し、菌培養液を接種後、37°C18時間培養した後、遠心して得られた上清を試料としてStx産生の誘導をRPLA法で確認した。

### 4. 志賀毒素産生遺伝子の検出

Tryptic soy brothで一晩静置培養した菌液を試料とした。試料を遠心、集菌後、滅菌蒸留水に再度懸濁し、95°C、5分間加熱したものをテンプレートとした。志賀毒素産生遺伝子 $stx_1$ 及び $stx_2$ の検出は市販のプライマー(Takara: EVT, EVS)及びLinら<sup>8)</sup>のプライマー(表1)を使用した。反応条件は市販のプライマーは添付文書、LinらのプライマーはLinらの報告<sup>8)</sup>に従った。目的遺伝子の増幅はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルによる電気泳動で確認した。

### 5. Stx2変異型毒素産生遺伝子の検出

Stx2変異型については、Stx2d, Stx2e, Stx2fを対象として、その産生遺伝子である $stx_{2d}$ ,  $stx_{2e}$ 及び $stx_{2f}$ についてPCR法による検出を試みた<sup>5, 9)</sup>。使用したプライマーは表1に示した。目的遺伝子の増幅はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルによる電気泳動で

確認した。さらに増幅産物がどの遺伝子であるのかを確認するため、PCR-RFLPを実施した。 $stx_{2d}$ では制限酵素Rsa I,  $stx_{2e}$ では制限酵素Taq I,  $stx_{2f}$ では制限酵素EcoRVでそれぞれ消化後、エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルによる電気泳動で確認した。

### 6. 病原性遺伝子の検出

大腸菌の病原遺伝子として知られるもののうち、腸管付着に関与する遺伝子で作用機序の異なる3種類の付着性関連遺伝子( $eaeA$ ,  $bfpA$ ,  $aggR$ )と腸管凝集性大腸菌が産生する耐熱性毒素様毒素(EAST1)産生遺伝子( $astA$ ),及びプラスミド上に存在するenterohaemolysin

Table 2. Biochemical Characteristics of *E.coli* O63:H6 isolated from the patient

test	reaction
TSI: Slant/Upper	A/A
Gas from glucose	+
SIM: H <sub>2</sub> S	-
Motility	+
IPA	-
LIM: Lysin	+
Indole	+
VP reaction	-
MUG(LIG)	+
Fermentation of:	+
Glucose	+
Lactose	+
Sucrose	+
Mannitol	+
Innositol	-
Salicin	-
Sorbitol	-
Rhamnose	+
Raffinose	+

Table 1. Primers used for amplification in this study

Target gene	primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
$stx$	up	TTTGATTGTTACAGTCAT	900
	down	GAACGAAATAATTTATATGT	
$stx_{2d}$	Stx2d-a	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	175
	Stx2d-b	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	
$stx_{2e}$	Stx2e-a	ATGAAGTGTATATTGTTAAAGTGGA	267
	Stx2e-b	AGCCACATATAAAATTATTCGT	
$stx_{2f}$	128-1	AGATTGGGCGTCATTCACCTGGTTG	428
	128-2	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	
$eaeA$	eaek1	GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT	591
	EA2	CTCTGCAGATTAACCTCTGC	
$bfpA$	EP1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326
	EP2	GCCGCTTATCCAACCTGGTA	
$aggR$	aggRKs1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254
	aggRKas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
$astA$	EAST 1s	GCCATCAACACAGTATATCC	106
	EAST 1As	GAGTGACGGCTTTGTAGTC	
$hlyA$	hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
	hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

Table 3. Result of induction by mitomycin C (MMC)

dilution multiple	MMC (ng/mL)				Polymixin
	500	50	5	0.5	
1 : 2	+	+	+	-	+
1 : 4	+	+	-	-	+
1 : 8	+	+	-	-	-
1 : 16	+	-	-	-	-
1 : 32	+	-	-	-	-
1 : 64	-	-	-	-	-

産生遺伝子 (*hlyA*) をPCR法により検出を試みた。使用したプライマーは表1に示した通りである。*eaeA*, *bfpA*, *aggR*及び*astA*については小林らの方法に従った<sup>10)</sup>。*hlyA*についてはPatonらの方法に従った<sup>10)</sup>。

### III 結 果

#### 1. 生化学性状

生化学的性状試験の結果は表2に示したとおりである。 $\beta$ グルクロニダーゼ陽性、ソルビトール非分解で、血清型別試験から患者由来の分離株は、大腸菌O63:H6であると同定された。

#### 2. 志賀毒素の検出

VTEC-RPLAによりStx1及びStx2の検出を行った結果、Stx2のみが検出され、Stx1は検出されなかった。また、MMCによるStx2産生の誘導を試みたところ、MMCの濃度が上昇するに従ってStx2の産生量が上昇した(表3)。

#### 3. 毒素産生遺伝子の検出

VTEC-RPLAではStx2が微量検出された。そこで毒素産生遺伝子の確認のため、市販プライマーを使用した

Table 4. PCR amplification of pathogenic genes

pathogenic gene	amplification
<i>eaeA</i>	+
<i>bfpA</i>	-
<i>aggR</i>	-
<i>astA</i>	+
<i>hlyA</i>	-

PCR法を実施したが、*stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*共に増幅産物は確認できなかった。一方、Linらのプライマーを使用してPCRを試みた結果、増幅産物が確認された。

Linらのプライマーでのみ増幅産物が検出されたことから、Stx2の変異型が疑われた。そこで変異型志賀毒素の検出をするため、さらに*stx<sub>2d</sub>*, *stx<sub>2e</sub>*及び*stx<sub>2f</sub>*についてPCR法による検出を試みた。その結果、*stx<sub>2d</sub>*, *stx<sub>2e</sub>*検出用プライマーでは、増幅産物が得られず、*stx<sub>2f</sub>*検出用プライマーで428bpの増幅産物が得られた。その増幅産物を制限酵素*EcoRV*で消化後、電気泳動で分離した結果、145bpと283bpのバンドが確認された(図1)。以上のことから患者由来の大腸菌O63:H6は*stx<sub>2f</sub>*遺伝子を保有していた。

#### 4. 病原性遺伝子の検出

大腸菌の病原性遺伝子についてPCR法による検出を行った結果は表4のとおりである。STEC分離株から高頻度に検出される腸管粘膜定着に関するインチミン産生遺伝子*eaeA*は検出されたが、溶血毒素産生遺伝子である*hlyA*は検出されなかった。また、EAST1産生遺伝子である*astA*が検出された。病原性大腸菌が保有する束形成性線毛産生遺伝子*bfpA*及び腸管凝集性大腸菌の付着因子産生遺伝子*aggR*は検出されなかった。

### IV 考 察

Stx2f産生性大腸菌の人からの報告は少なく、海外ではカナダのGannon<sup>12)</sup>らが、国内では長崎県の山口ら<sup>13)</sup>がStx2f産生志賀毒素産生性大腸菌O63:HNM、富山県の磯部ら<sup>14)</sup>がStx2f産生志賀毒素産生性大腸菌O128:HNMの報告をしている。

国立感染症研究所感染症情報センターの報告<sup>15)</sup>による

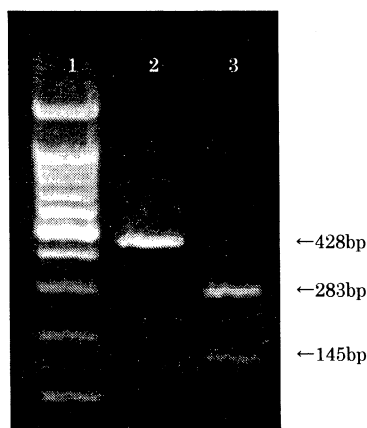


Fig.1 Results of PCR and PCR-RFLP of *stx<sub>2f</sub>*  
1. Marker, 2. PCR product, 3. PCR product digested with *EcoRV*

と、2001年から2006年の間にO63の分離報告は12件ある。その内訳はO63:H6:stx2が2001年に3件、2004年に2件、2006年に1件、O63:H6:stx othersが2003年に1件、O63:HUT:stx2が2002年に1件、O63:HNT:stx2が2003年に1件、2004年に3件である。しかし、これらのO63の病原性や変異型毒素産生性の有無等の詳細に関しては不明である。

今回分離されたO63は一般の大腸菌と同様β-D-グルクロニダーゼ陽性だったが、ソルビトールはO157と同様に非分解だった。病原性遺伝子として付着に関係するインチミン産生遺伝子である*eaeA*とEAST1産生遺伝子である*astA*を保有していたが、STEC分離株から高頻度に検出される溶血毒素産生遺伝子である*hlyA*は保有していなかった。運動性以外は2002年に長崎で分離されたO63:HMN<sup>33</sup>に近似していた。今回分離された大腸菌O63:H6も他の血清型のSTECと同様に*eaeA*を持っていたことから、インチミンを産生・分泌し、患者の腸管内に定着し、病原性を発揮したと考えられる。

StxはA-B型毒素に分類され、毒素活性を担っているAサブユニットと受容体への結合に関与しているBサブユニットから構成されている<sup>1)</sup>。Stx2変異型毒素であるStx2c、Stx2d、Stx2e及びStx2fとStx2の塩基配列の相同性はAサブユニットでそれぞれ99.7%、94.9%、94.0%及び63.4%、Bサブユニットでそれぞれ95.2%、86.6%、79.0%及び75.4%である<sup>2, 3, 4, 5)</sup>。Stx2fは他の変異型毒素に比べStx2との相同性が低く、RPLAによる毒素の検出値が低かったため、市販プライマーで産生遺伝子を検出できなかったのではないかと考えられる。検査方法によっては、Stx2fを検出することができないため、注意が必要である。

Stx2f産生STECについては鳩からの分離報告がある<sup>4, 5)</sup>が、今回の事例については、感染源や感染経路を特定するには至らなかった。今後も変異型毒素産生STECの菌株収集及び性状解析を積極的に行い、感染源や感染経路の解明に努めていきたい。

## V 要 旨

11歳の男児からStx2変異型毒素産生遺伝子*stx<sub>2f</sub>*を保有する志賀毒素産生大腸菌O63:H6が分離された。分離菌株は病原性遺伝子として*stx<sub>2f</sub>*、*eaeA*及び*astA*遺伝子を保有していたが、*stx<sub>1</sub>*、*bfpA*、*aggR*及び*hlyA*遺伝子は保有していなかった。

- 1) 喜多英二, 杉浦重樹: ペロ毒素, 櫻井純, 本田武司, 小熊恵二編, 細菌毒素ハンドブック, 356 - 365, サイエンスフォーラム, 東京 (2002)
- 2) Schmitt, C. K., McKee, M. L., O'Brien, A. D. : Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.*, **59**, 1065-1073 (1991)
- 3) Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S. : Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3317-3322 (1998)
- 4) Weinstein, D. L., Jackson, M. P., Samuel, J. E., Holmes, R. K., O'Brien, A. D. : Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.*, **170**, 4223-4230 (1988)
- 5) Schmidt, H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler, L. H., Karch, H. : A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1205-1208 (2000)
- 6) Kobayashi, H., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. : Prevalence and characteristics of intimin- and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 1071-1073 (2002)
- 7) Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon A., Karch H. : *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.*, **185**, 74-84 (2002)
- 8) Lin, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S., Takeda, Y. : Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 543-548 (1993)
- 9) Wang, G., Clark, C. G., Rodgers, F. G. : Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components

- of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3613-3619 (2002)
- 10) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 斉藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹沢俊彦, 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, 山田亭, 伊藤健一郎: 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査の一考察. *感染症学雑誌*, **76**, 911 - 920 (2002)
- 11) Paton, A. W., Paton, J. C. : Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 598 - 602 (1998)
- 12) Gannon, V. P., Teerling, C., Masri, S. A., Gyles, C. L. : Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1125-1135 (1990)
- 13) 山口仁孝, 山崎省吾, 野口英太郎: 小児下痢症患者より分離された志賀毒素産生大腸菌O63の病原分子解析. *長崎県衛生公害研究所報*, **47**, 21-28(2001)
- 14) 磯辺順子, 木全恵子, 霜島正浩, 細呂木志保, 田中大祐, 刑部陽宅: 下痢患者からのstx2f遺伝子保有志賀毒素産生大腸菌. *感染症学雑誌*, **78**, 1000-1005 (2002)
- 15) 国立感染症研究所感染症情報センター  
<http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>