

下痢症患者から分離された stx_2 変異型遺伝子 (stx_{2f}) 保有志賀毒素産生性 (STEC) 大腸菌O128:HNMの性状

押部 智宏^{1*} 福永 真治^{1*} 大町 隆生²
稲元 哲朗¹ 近平 雅嗣¹

Characteristic of *Escherichia coli* O128 : HNM carrying Shiga Toxin 2 Variant (stx_{2f}) Gene from Diarrhea Patients

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Masaharu FUKUNAGA^{1*}, Takao OOMACHI²,
Tetsuro INAMOTO¹ and Masatsugu CHIKAHIRA¹

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

² *Kakogawa health and welfare office*

We have isolated Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) O128: HNM from the feces of 2-years-old child suffered from mild diarrhea. As a result of PCR and PCR-RFLP method for stx genotyping and presence of virulence-related genes, the stx genotype of the STEC O128: HNM isolates were Shiga toxin 2 variant f (stx_{2f}). The isolates were positive for *eaeA* gene, intimin type β and negative for *aggR*, *bfpA*, *astA*, *hlyA* gene. Although the Stx production of the isolates weakly reacted with VTEC-RPLA, the Stx induction of them by Mitomycin C (MMC) treatment could get strong reaction with it. It may be one of the rare cases that STEC O128: HNM carrying stx_{2f} gene were isolated from the infant patient.

I はじめに

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症は激しい腹痛、下痢、鮮血便を伴う出血性大腸炎を引き起こし、重症化すると溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などの合併症を伴う疾患である。国内で分離されるSTECの血清型

は、O157が半数以上で圧倒的に多く、次いでO26、O111の順となっており、これらを合せると全体の9割以上を占めている¹⁾。しかしながら、これら以外の血清型を原因とする症例や stx 変異型遺伝子を保有するSTECの感染例も少なからず報告されている。

2005年11月に兵庫県内で軽度の下痢を呈する幼児から stx_2 変異型遺伝子 (stx_{2f}) を保有するSTEC O128 : HNMが分離された。この変異型遺伝子は日常のPCR検査として当所が採用している市販プライマーには反応せず、またRPLA法では志賀毒素 (Stx) を検出したものの、その力価は1 : 4と検出下限値を示した。

我々はこの分離株の性状について解析し、さらに今回検出した stx_2 変異型遺伝子およびStx変異型に対応し得

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センター

感染症部 押部 智宏

※ 現 疾病対策課

Table 1. Oligonucleotides used for PCR amplification

Taget	Primer	Sequences	Lengh of PCR product	Reference
<i>stx</i>	Lin-all	5'-TAA GGA TTT TGG GAC CC-3' 5'-TTT ATT TGC AGC CCC CCA T-3'	~900bp	2)
<i>stx₂</i>	128-1 128-2	5'-AGA TTG GGC GTC ATT CAC TGG TTG-3' 5'-TAC TTT AAT GGC CGC CCT GTC TCC-3'	428bp	3)
<i>eaeA</i>	eaeAF eaeAR	5'-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC-3' 5'-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG-3'	384bp	4)
<i>aggR</i>	aggRks1 aggRkas2	5'-GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC-3' 5'-ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC-3'	253bp	5)
<i>bfpA</i>	BFP-1 BFP-2	5'-CGT CTG ATT CCA ATA AGT CGC-3' 5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA-3'	264bp	6)
<i>astA</i>	EAST-1S EAST-1AS	5'-GCC ATC AAC ACA GTA TAT CC-3' 5'-GAG TGA CGG CTT TGT AGT C-3'	106bp	7)
<i>hlyA</i>	hlyA1 hlyA4	5'-GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G-3' 5'-TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A-3'	155bp	8)

る検査法について検討したので併せて報告する。

II 材料と方法

1 発生概要

2005年11月6日、県内在住の2歳男児が軽度の下痢(有形軟便)を呈し医療機関を受診した。民間検査機関において細菌検査を行った結果、11月10日、14日に志賀毒素産生性大腸菌O128が検出され、当センターに両分離株が搬入された。接触者調査では患者以外全て陰性であり、その後の患者の症状は軽く抗生物質を投与することなく治癒した。

2 供試菌株

10日および14日に検出され当センターに搬入された2株(05E058, 05E060)を供試した。また、陽性対照として患者由来株STEC O157:H7株(*stx₂*+*stx_{2c}*遺伝子保有株)を使用した。

3 生化学性状試験および血清型別試験

生化学性状試験はTSI, LIM, VP, LIM, CLIG培地を用いて確認試験を行い、さらにクエン酸塩, アミノ酸脱炭酸, 糖分解等の二次確認試験を行った。血清型別試験は市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて実施した。

4 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、センシディスク(日本ベクトンディックンソン)を用いて1濃度ディスク法で実施した。試験には ampicillin, gentamaicin, kanamycin, tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, cefotaxime, cefazolin, chloramphenicol, fosfomycin, nalidixic acid, sulfamethoxazole/trimetoprimの12薬剤を用いた。

5 Stx産生性試験およびmitomycin C (MMC) による毒素産生誘導試験

供試株をMMC(最終濃度50ng/ml)添加あるいは非添加のCAYE培地(デンカ生研)で37℃, 18時間振盪培養し、遠心分離後、上清を被検液とした。毒素の検出は、逆受身ラテックス凝集反応による大腸菌ベロトキシン検出キットVTEC-RPLA(デンカ生研)を用いた。

6 Vero細胞による細胞毒性試験

供試株をCAYE培地で37℃, 18時間振盪培養し、遠心分離後、上清をメンブランフィルター(0.45μm)でろ過滅菌したものを被検液とした。24穴マイクロプレートの各ウェルにVero細胞浮遊液1mlを加えて、37℃, 1日炭酸ガス培養し、被検液を各ウェルに100μl接種した。37℃, 2~4日間炭酸ガス培養を行い細胞変性の有無を顕微鏡下で判定した。

7 *stx*遺伝子の検出、遺伝子型別およびその他の病原遺伝子の検索

供試株を滅菌蒸留水に懸濁後、95℃, 5分加熱し、12,000rpm, 5分間遠心分離した上清をテンプレートとした。*stx*遺伝子の検出は、市販プライマー(EVS1/2;TAKARA), Lin-allプライマー, O128-1/2プライマーの3種類(Table 1)によるPCRを行った。また、Lin-all, O128-1/2プライマーで増幅されたPCR産物について制限酵素HincIIあるいはEcoRVで切断した。

その他の病原遺伝子(*eaeA*, *aggR*, *invE*, *astA*, *bfpA*, *hlyA*遺伝子)は既報のプライマー(Table 1)によるPCRを行った。Intimin型別(α , β , γ , δ 型)は既報の方法⁹⁾に準じた。なお、PCRの反応条件はそれぞれメーカーの添付文書および文献のprotocolに準拠した。増幅DNAおよび制限酵素切断断片は1.5%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い撮影した。

Table 2. Biochemical characteristics of *E. coli* O128 : HNM

Tests	05E058	05E060
Oxidase	-	-
Indol	+	+
Motility	-	-
H ₂ S(TSI)	-	-
Voges-Proskauer	-	-
Simmons citrate	-	-
Christensen citrate	-	-
β -Glucuronidase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+
Arginine decarboxylase	+	+
Glucose(acid)	+	+
Glucose(gas)	+	+
Lactose	+	+
Sucrose	+	+
Mannitol	+	+
Inositol	-	-
Adonitol	-	-
Dulcitol	-	-
Salicin	-	-
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Rhffinose	-	-
Sorbitol	+	+

III 結 果

1 生化学性状および血清型別試験

供試2株の生化学性状試験結果をTable 2に示した。運動性、リジンデカルボキシラーゼ、 β -glucuronidase試験は陰性であった。その他の生化学性状および血清型別試験により本株を*E. coli* O128:HNMと同定した。

2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果をTable 3に示した。05E058株は12薬剤全てに感受性であった。05E060株はampicillinに対して中等度耐性であったが、その他の薬剤は感受性であった。

3 Stx産生性試験およびVero細胞による細胞毒性試験

Stx産生性試験、MMCによる毒素産生誘導試験、Vero細胞による細胞毒性試験の結果をTable 4に示した。供試2株は共にVTEC-RPLAの力価は1:4と低値であった。一方、MMC添加による毒素産生誘導試験では力価が1:32および1:512まで上昇した。

細胞毒性試験では、被検液を添加したVero細胞とCAYE培地のみを添加した陰性対照のVero細胞を比較した結果、MMC存在下および非存在下の被検液を添加した双方のVero細胞から明瞭な細胞変性が観察された。

4 *stx*遺伝子の検出および遺伝子型別

各プライマーによる*stx*₂遺伝子の検出およびPCR産物の制限酵素切断結果をFig. 1に示した。供試2株は市販プライマーでは陰性であった。Lin-allプライマーで

Table 3. Result of antimicrobial susceptibility of *E. coli* O128:HNM

Antimicrobial agent	05E058	05E060
gentamaicin ; 10 μ g	S	S
ampicillin ; 10 μ g	S	I
kanamycin ; 30 μ g	S	S
tetracycline ; 30 μ g	S	S
ciprofloxacin ; 5 μ g	S	S
norfloxacin ; 10 μ g	S	S
cefotaxime ; 30 μ g	S	S
cefazolin ; 30 μ g	S	S
chloramphenicol ; 30 μ g	S	S
fosfomicin ; 50 μ g	S	S
nalidixic acid ; 30 μ g	S	S
sulfamethoxazole/trimetoprim; 23.75 μ g/1.25 μ g	S	S

S, sensitive ; I, intermediate

は、目的とする900bp付近にDNAの増幅が確認された。さらに制限酵素Hinc IIで切断したところ、目的とする521bpと374bp付近にバンドが認められた。これは陽性対照 (*stx*₂ + *stx*_{2c}遺伝子型株) の556bp, 324bp, 262bp, (62bp), (16bp) 付近の切断パターンと異なる*stx*_{2f}遺伝子型のパターンであった。

*stx*_{2f}遺伝子特異 (O128-1/2) プライマーでは、供試株は目的とする428bp付近にバンドが認められた。さらにこの増幅産物を制限酵素EcoRVで切断したところ、目的とする283bpと145bpの切断パターンが得られたため*stx*_{2f}遺伝子型と同定した。

5 病原遺伝子の検索

*stx*₂遺伝子以外のPCR法による病原遺伝子の検索結果をTable 5に示した。供試2株は*eaeA*遺伝子の保有が確認され、Intimin型は β であった。その他の*aggR*, *invE*, *astA*, *bfpA*, *hlyA*遺伝子は保有していなかった。

IV 考 察

供試株の*stx*遺伝子の検出を目的としたPCR検査で陰性となった市販プライマーは、その塩基配列が非公開のため詳細な検討はできなかった。このため平成18年11月2日付け(食安監第1102004号)厚生労働省監視安全課長通知による検査法に記載されているLin-allプライマー²⁾およびSchmidtらが報告した*stx*_{2f}遺伝子特異プライマー (O128-1/2)³⁾に着目してその反応性について検討した。Lin-allプライマーは*stx*₁, *stx*₂, *stx*_{2c}, *stx*_{2a}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f}の遺伝子型に反応するとされ、さらにBastianら¹⁰⁾はこのPCR産物を制限酵素Hinc IIで切断したパターンからそれぞれの遺伝子型を型別できることを報告している。このLin-allプライマーを用いて供

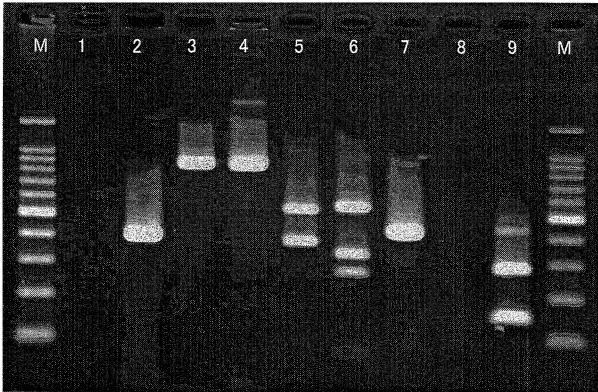


Fig.1 PCR products of *stx2* gene obtained with commercialized primers, Lin-all primers, Lin-all primers restricted by *Hinc* II, O128-1/2 primers and O128-1/2 primers restricted by *Eco*RV.

Lane1, 2; *stx2* gene specific commercialized primers (EVS1/2; TAKARA), Lane 3, 4; *stx* gene specific Lin-all primers, Lane 5, 6; PCR products with Lin-all primers restricted by *Hinc* II, Lane 7, 8; *stx2_f* gene specific O128-1/2 primers, Lane 9; PCR products with O128-1/2 primers restricted by *Eco*RV
 M;100 bp Marker, Lane 1, 3, 5, 7, 9; 05E058 strain, Lane 2, 4, 6, 8; Positive control (STEC O157:H7; *stx2* + *stx2_c* positive strain)

試2株のPCRを行ったところ増幅が認められ、そのPCR産物を制限酵素*Hinc* IIで切断した結果、対照のパターンとは異なる*stx2_f*遺伝子型のパターンが観察された。さらに、O128-1/2プライマーでも増幅が認められ、制限酵素*Eco*RVによる切断でも目的とするパターンが観察された。このことから*stx2_f*遺伝子の検査についてはLin-allプライマーおよびO128-1/2プライマーによるPCR法およびこれらの増幅産物の各々の制限酵素*Hinc* II, *Eco*RVによるPCR-RFLPにより迅速簡便な同定が可能であると考えられた。

RPLA法によるStxの検出では、供試2株は共に力価が検出下限値である1:4を示した。この試薬の添付文書には、Stx変異型に対する検出感度は通常よりも低く、偽陰性を生じる可能性があると記載されており、通常の検出感度はStx1で0.7 ng/ml, Stx2では0.6 ng/mlであるのに対し、Stx2c変異型では17.5ng/mlと報告¹²⁾されている。また、Stx2e変異型も同様に報告され¹³⁾、Stx2f変異型に関する報告はないが、これらと同じく検出感度が低いことが推察された。近年、Stx産生を誘導する薬剤としてMMCやNorfloxacin等が知られており、Stx2f変異型産生性大腸菌においてもMMC処理により産生が誘導されたことが報告されている^{8), 10)}。供試株の

Table 4. Result of Stx production of *E. coli* O128:HNM by Vero cell assay and commercial RPLA kit

Isolate	not induced		induced with MMC	
	Vero cell assay	VTEC-RPLA	Vero cell assay	VTEC-RPLA
05E058	+	+(1:4)	+	+(1:512)
05E060	+	+(1:4)	+	+(1:32)

Table 5. Detection of virulence-related genes of *E. coli* O128:HNM.

Gene	05E058	05E060
<i>eaeA</i>	+	+
intimin type β	+	+
<i>aggR</i>	-	-
<i>bfpA</i>	-	-
<i>astA</i>	-	-
<i>hlyA</i>	-	-

Stx産生を増強しStxの検出を容易にすることを目的としてMMC処理を行った結果、それぞれ8倍から128倍のRPLA力価の上昇が認められた。Stx産生株の中にはMMC処理により産生が誘導されない株が存在することも考慮する必要があるが、今回の結果からStx変異型株を検査する際にはMMC処理法が有効であると考えられた。Vero細胞による細胞毒性試験法では、MMC処理していない検体でも明瞭な細胞変性が認められたことから、迅速性に乏しいもののStx変異型の検出に極めて有用な方法であると思われた。

今回の分離株をCT-SMAC培地およびDHL寒天培地で再分離したところ、CT-SMAC平板培地上では、赤桃色・スムーズな集落および中心は赤色、辺縁が白濁・ムコイド状の均一な集落の2種類の集落が形成され、DHL平板培地上では、赤色・スムーズな集落および赤色・ラフ様の集落の2種類の集落が形成された。それぞれの分離培地上で色や形態が明らかに異なる集落について生化学性状、血清型、毒素遺伝子および産生性試験、PFGE型別を行った結果、全て分離株と合致したためこれらの集落は同一クローン由来と確認された。2002年の富山県で分離された*stx2_f*遺伝子保有STEC O128:HNM株においても同様に培地上に色や形態の異なる2種類の集落が認められたことが報告されており¹¹⁾、分離の際に注意すべき性状であると考えられた。

今回報告した*stx2_f*遺伝子保有するヒト由来のSTECは、国内では2001年の長崎県内の2歳児からのSTEC O63:HMNの分離報告¹⁰⁾や2002年の富山県内の1歳および生

後11ヵ月乳幼児からのSTEC O128:HNM 2株の分離報告¹¹⁾に次ぐ極めて稀な感染例であるが、本事例では感染源を特定することはできなかった。Morabitoら¹⁰⁾はローマでハトの糞便の649検体中30検体(4.6%)から stx_{2f} 遺伝子保有STECを分離し、その血清型の内訳はO45:H-が18株、O18:H-が4株、O75:H-が3株、Rough:H-が2株、その他O15、O25、O152が1株ずつと報告している。このことから血清型O63、O128以外についても stx_{2f} 遺伝子を保有している可能性があり、特にMorabitoらが報告したこれらの血清型に今後注意を払う必要があると思われた。また、ハト等の鳥類が stx_{2f} 遺伝子保有STEC保菌宿主である可能性がある^{3), 10)}ことから、人への感染が認められた場合、感染源として鳥類との接触調査を行う必要があると考えられた。

IV ま と め

軽度の下痢を呈した2歳児の便からSTEC O128:HNMが分離された。Lin-all、O128-1/2プライマーによるPCR、PCR-RFLPを行った結果、 stx 遺伝子型が極めて稀な stx_{2f} 変異型であることが判明した。その他の病原遺伝子では、*eaeA*遺伝子を保有しておりインチミン型は β であった。*aggR*、*invE*、*astA*、*bfpA*、*hlyA*遺伝子は保有していなかった。本株はVero細胞による細胞毒性試験で明瞭な変性像が確認された。また、MMC処理によるStxの産生誘導によりRPLA法で容易にStxを検出することができた。

文 献

- 1) 病原微生物検出情報, 28, p131-132, 国立感染症研究所, 東京 (2007)
- 2) Lin, Z. Kurazono, H. Yamasaki, S. and Takeda, Y.: Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*, **37**, 543-548 (1993)
- 3) Schmidt, H. Scheef, J. Morabito, S. Caprioli, A. Wieler, L.H. and Karch, H.: A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1205-1208 (2000)
- 4) Paton, A.W. and 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)
- 5) 森屋一雄他: 散発下痢症患者および健常乳幼児由来大腸菌における局在及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EAaggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA*の保有状況について. *感染症誌*, **74**, 134-142 (2000)
- 6) 塚本定三: PCR法による腸管出血性大腸菌(局所性付着)および腸管集合性大腸菌の検出. *感染症誌*, **70**, 569-573 (1996)
- 7) 小林一寛: 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法の一考察. *感染症誌*, **76**, 911-920 (2002)
- 8) Schmidt, H. Beutin, L. and Karch, H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun*, **63**, 1055-1061 (1995)
- 9) Adu-Bobie, J. Frankel, G. Bain, C. Goncalves, A.G. Trabulsi, L.R. Douce, G. Knutton, S. and Gan, G.: Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol*, **36**, 662-668 (1998)
- 10) 山口仁孝他: 小児下痢症患者から分離された志賀毒素産生性大腸菌O63の病原解析. 長崎県衛生公害研究所報, **47**, 121-128 (2001)
- 11) 磯部順子他: 下痢症患者からの stx_{2f} 遺伝子保有志賀毒素産生性大腸菌O128:HNMの分離. *感染症誌*, **78**, 1000-1005 (2004)
- 12) Karmali, M.A. Petric, M. and Bielaszewska, M.: Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, **37**, 396-399 (1999)
- 13) 甲斐明美他: ラテックス凝集反応法によるVero毒素産生性大腸菌の同定, 大腸菌ベロトキシン検出用試薬の評価. *感染症誌*, **71**, 248-252 (1997)
- 14) Bastian, S.N. Carle, I. and Grimont, F.: Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, **149**, 457-472 (1998)
- 15) Morabito, S. Dell'Omo, G. Agrimi, U. Schmidt, H. Karch, H. Cheasty, T. and Caprioli, A.: Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol*, **82**, 275-283 (2001)