

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

山口 仁孝、山崎 省吾、野口英太郎

Molecular Analysis about the Pathogenicity of Shiga toxin-producing

Escherichia coli(STEC) O63:HNM Isolated from Infantile Diarrhea

Yoshitaka YAMAGUCHI, Syougo YAMASAKI, Hidetarou NOGUCHI

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O63 was isolated from the feces of an infantile patient who had stomachache, vomited and hydatoid diarrhea at the medical institution. And we supplementary examined general biochemical test, carbohydrate fermentation, medicine sensitivity, verotoxin productivity, and we analyzed the several pathogenic genes by PCR (polymerase chain reaction).

At the result of these examinations, we confirmed the specific gene of verocytotoxin 2 (VT2) variant f and some pathogenic genes by PCR and PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) and detected the toxin induction by MMC (Mitomycin C) treatment.

From these results, this case is supposed to the very rare precious case detected STEC O63:HNM producing VT2 variant f from the sporadic infantile diarrhea in Japan.

Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), VT2 variant, VT2f

キーワード: 腸管出血性大腸菌(EHEC)、志賀毒素産生大腸菌(STEC)、VT2 バリエーション、VT2f

はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) のカテゴリーの確立は、大きな2つの出来事をきっかけとしている。一つは1983年 Reilyらが2例の出血性大腸炎患者集団発生事例において、それまで非常に稀であった血清型 O157:H7 の大腸菌を発見したことで、二つ目は同年 Karmali らが散発性の溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic uremic syndrome: HUS) 患者から、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae* 1) が産生する shigatoxin (Stx1) に対する抗体で中和される cytotoxin (shiga-like toxin: SLT = verocytotoxin: VT = shiga toxin: Stx) および cytotoxin 産生大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) を検出したことである。

これらの発見の後、Stx (=VT) を産生し特徴的な出血性大腸炎および HUS 病変を誘発する大腸菌群は、他の病原性大腸菌から独立した新しいカテゴリーに分類されることになった¹⁾。

さらにその後の研究で、大腸菌の phage genome 上に

VT 遺伝子 (=stx) が存在していること²⁾ や VT 遺伝子が 100 以上の大腸菌血清型から検出されること³⁾、VT 以外の病原因子 (遺伝子) が腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*: EPEC) と非常に似ていることなどが明らかとなり⁴⁾、志賀毒素産生大腸菌 (STEC) は VT converting phage によって EPEC の serogroup へ、VT 遺伝子が transduction されたものと考えられている⁵⁾。

STEC が産生する毒素 type としては、互いに血清学的に交差反応を示さない VT1 および VT2 が存在し、さらに VT2 については、遺伝子配列の相同性が 60% 前後の多くの variant が確認され、ヒトの下痢症や HUS 患者より分離される主要な variant グループとして、VT2 variant c、d および e が広く知られている¹⁾。

一方、近年 Schmidt らは、ドイツおよびイタリアの豚より分離した株および Gannon らの報告した下痢症患者より分離した Slt II va 株をこれら variant 株と詳細に比較検討した結果、彼らの分離株を新たな variant グループ f とすることを主張している⁶⁾。

今回我々は、下痢症患者より分離された大腸菌 O63:HNM の病原性について若干の検索を行ったので報告する。

発生概要

患者は2歳男子で腹痛・嘔吐・水様便が認められ、医療機関において平成14年6月16日に急性腸炎・腸重積と診断された。患者便について民間検査機関において細菌検査が実施された結果、6月20日にVT2産生大腸菌O63が検出されたため、腸管出血性大腸菌感染症として管轄の保健所に報告され、当所へ菌株の送付がなされた(表1)。

表1:発生概要

<ul style="list-style-type: none"> ・患者:2才、男子。 ・発症日:平成14年6月16日 ・診断名:急性腸炎。腸重積。 ・症状:腹痛。嘔吐。水様便。 ・菌検出日:平成14年6月20日

材料および方法

当該菌株について以下の試験を行った。

1. 生化学性状試験

(1) 常法によりIMViC、酢酸培地、1%セロビオース加LIG培地を用いて性状試験を行った。

(2) 炭水化物発酵試験についてはAPI50CHE(日本ビオメュー)を用いて行った。

2. 薬剤感受性試験

K-B法(センシディスク:日本ベクトン・ディッキンソン)により、ABPC、CTX、KM、SM、TC、CP、CPFX、TMP、NA、FOM、ST、GMの12薬剤について感受性試験を行った。

3. 血清型別試験

常法により、市販血清(病原大腸菌免疫血清「生研」:デンカ生研)を用いて血清型別を行った。なお、H試験については3ml半流動casitone培地にクレイグー管を入れ、中心部へ菌を接種後、再浮上した菌を同様に5代継代し、新たに継代後18hrsで再浮上せず、懸濁標本の鏡検においても運動性が認められないものをNM(no motility)とした。

4. 病原遺伝子の検索

純培養した後、常法により熱抽出 template を作製し、メーカー指示書および文献の protocol に従い thermalcycler の温度・時間・サイクル数を設定し 50 μ l の

反応混液を作成してPCRを実施し、ampliconを2%アガロースゲル(EtBr 0.5 μ g/ml)に泳動(100V、30min)後、トランスイルミネーターにより観察した。

(1) VT 遺伝子の検出

当初、表2に示す8種類のプライマーのうち、市販の primer A、B、C(No.1、2、3)を用いてVT遺伝子の検出を試みた。ところが amplicon のコピー数が少ないことおよび保存培地(ドルセット卵培地:日水)に約2週間室温保存した同株ではまったく amplicon が検出できなくなったことにより、VT2 variant の可能性を考慮し、使用した市販 primer で検出不可能なVT2 variant e および f を検出する5種類の primer (No.4、5、6、7、8)を加えて比較検討を行った。

(2) PCR-RFLP

Schmidt らの方法⁶⁾により、VT2f 特異 primer 128-1、2で増幅された amplicon について、制限酵素 EcoRV による消化(37°C、1hr)後2%アガロースゲル(EtBr 0.5 μ g/ml)に泳動(100V、30min)し、トランスイルミネーターにより観察した。

(3) その他の病原遺伝子の検出

Attaching-and-effacing (A/E) lesion に関わる遺伝子(eaeA、tir、intimin、espA、espB、espD)、各プラスミド上に存在する enterohaemolysin、EPEC 線毛、EPEC プラスミド特異遺伝子(ehlyA、bfp、EAF)および耐熱性毒素、凝集性接着に関する遺伝子(astA、aggR)の合計11遺伝子について、文献^{7,8,9,10,11,12)}を参考にPCRによる検出を試みた。

5. VT 産生の確認

毒素の検出はVTEC-RPLA(デンカ生研)を用いてRPLA法により行った。

6. mitomycinC による VT induction の確認

mitomycinC(MMC)をTrypticase soy broth(TSB:BBL)に最終濃度50~0.005ng/mlまで10倍段階希釈し、菌培養液(25 μ l)を接種後37°C18hrs培養して、VT産生の誘導をRPLA法により確認した。

7. VT multiplex PCR の検討

Ziebellら¹⁶⁾の方法を参考に、今回のO63:HNM株(VT2f)および保存株111:NM(VT1)、OUT:NM(VT2)、157:7(VT1+VT2)について、Takara EX taq (hot start version)を用い、denature(94°C30sec)、annealing(60°C60sec)、extension(72°C60sec)を30cyclesと簡略化した方法によりmultiplex PCRを検討した。

8. EPEC O63 との遺伝子比較解析

佐賀県衛生薬業センターより分与された、EPEC 大腸菌O63(5株)との遺伝子相同性について、Xba Iを用いたPFGEによる解析を資料¹⁷⁾に従い行った。

表 2:VT 遺伝子 primer

No.	Primer	Gene specificity	Amplicon size (bp)	Reference
1	市販品 A	(VT1),VT2 , 2c (vha,vhb,vpl) ,2d (O111,OX3a) ,2e	(1193 ^①),(655 ^②),425	Takao,Jackson,Gannon
2	市販品 B	VT2 ,2c ,2e	404	Jackson ,Ito ,Weinstein
3	市販品 C	(VT1),VT2 ,2c ,2e	171	//
4	Lin-all	(VT1),VT2 ,2c ,2d ,2e ,2f	~ 900	Lin ¹³⁾
5	VT2-e,f	VT2 , 2c , 2d(Out,OX3a)	348	Pierard ¹⁴⁾
6	VT2e-a,b	2e	230	Johnson ¹⁵⁾
7	128-1,2	2f	428	Schmidt ⁶⁾
8	STX2e-F,R	2f	112	Ziebell ¹⁶⁾

①:internal control ②:VT1

結 果

1. 生化学性状試験および血清型別試験により、供試株は β-D-グルクロンダーゼ陽性の大腸菌 O63:HNM と同定された(表 3)。また、炭水化物発酵試験では sorbitol(-)、saccharose(+)、D-raffinose(+)であった(表 4)。
2. 薬剤感受性試験では、ABPC10 に耐性、CTX30、KM30、SM10、TC30、GM10 に中等度耐性であった(表 5)。

表 3:生化学性状試験結果

試験項目	判定	試験項目	判定
普通寒天 オキシダーゼ	-	CLIG培地 斜面	R
TSI 培地 高層	+	斜面 高層	Y
	+	β-D-グルクロンダーゼ	+
硫化水素	-	D-ソルビトール(CT-SMAC)	-
ガス	-	酢酸塩培地	+
LIM 培地 リジン	+	O 抗血清 (生菌)	63
SIM 培地 インドール	+	(加熱菌)	63
運動性	-	(生食水)	-
IPA 反応	-	H 抗血清(ホルマリン不活化)	NM
VP 半流動 VP	-		
ガス	+		
クエン酸塩(シモンズ)	-		

表 4:炭水化物発酵試験結果

control	-	galactose	+	αmethyl-D-mannoside	-	melibiose	+	D-turanose	-
glycerol	+	D-glucose	+	αmethyl-D-glucoside	-	saccharose	+	D-lyxose	-
erythritol	-	D-fructose	+	Nacetyl glucosamine	+	trehalose	+	D-tagatose	+
D-arabinose	+	D-mannose	+	Amygdaline	-	inuline	-	D-fucose	-
L-arabinose	+	L-sorbose	+	Arbutine	-	melezitose	-	L-fucose	+
ribose	+	rhamnose	+	Esculine	+	D-raffinose	+	D-arabitol	+
D-xylose	+	dulcitol	+	Salicine	-	amidon	-	L-arabitol	-
L-xylose	-	inositol	-	Cellobiose	-	glycogene	-	gluconate	+
adonitol	-	mannitol	+	Maltose	+	xylitol	-	2ceto-gluconate	-
βmethyl-xyloside	-	sorbitol	-	Lactose	+	βgentiobiose	-	5ceto-gluconate	-

表 5: 薬剤感受性試験結果

薬剤名	ABPC10		CTX30		KM30		SM10		TC30		CP30	
判定基準	13:14-16:17		14:15-22:23		13:14-17:18		11:12-14:15		14:15-18:19		12:13-17:18	
阻止円 実測値 ^①	9.4	R	19.0	I	14.1	I	11.7	I	14.7	I	21.4	S
判定 ^②												
薬剤名	CPFX5		TMP5		NA30		FOM50		ST		GM10	
判定基準	15:16-20:21		10:11-15:16		13:14-18:19		10:11-15:16		10:11-15:16		12:13-14:15	
阻止円 実測値	25.5	S	17.7	S	19.0	S	16.4	S	20.1	S	13.0	I
判定												

①mm、②R:耐性、I:中等度耐性、S:感受性

3. 病原遺伝子および毒素の検出

(1)VT 遺伝子は当初、市販 primer によって極薄く検出できたものの(図 1)、約 2 週間室温保存した株では検出できなくなった(図 2- No.1、2、3)。

市販 primer では検出できない VT2 variant が検出可能な 5 種類の primer を加えての追加試験結果では、Lin-all (No.4)、VT2 variant f 特異 primer である 128-1,2(No.7) および STX2e-F,R(No.8)においてバンドが確認された(図 2)。また、128-1,2primer により増幅された amplicon(428bp)の RFLP 解析では、制限酵素 EcoRV により 283bp および 145bp の fragment に切断された(図 3)。

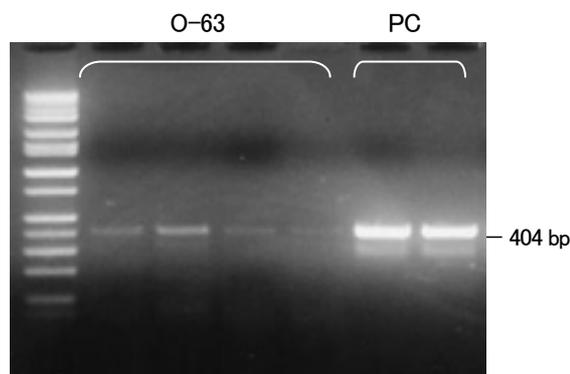
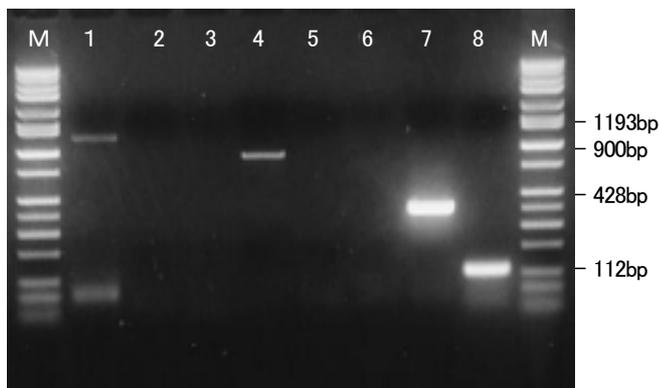


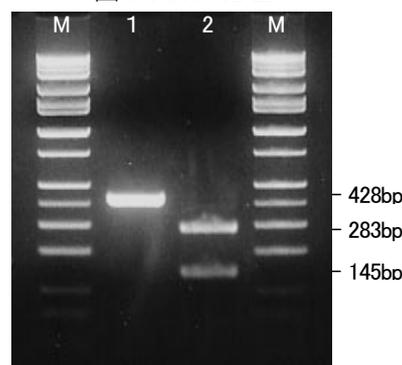
図 1: VT-PCR I (primer: 市販品 B)

図 2: VT-PCR II



No.	Primer	No.	Primer
1	市販品 A	5	VT2-e,f
2	市販品 B	6	VT2e-a,b
3	市販品 C	7	128-1,2
4	Lin-all	8	STX2e-F,R

図 3: PCR-RFLP

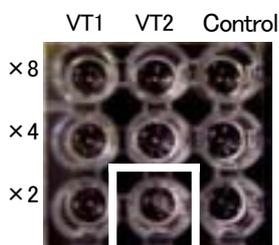


		No.	
		1	2
Treatment	EcoRV digestion	-	+

(2) その他の病原遺伝子の検索では、A/E lesion 関連遺伝子が認められた。しかしながら tir の amplicon は予想バンドより数百 bp 長く観察され、intimin は δ型で espA は認められなかった(表 6)。

(3) 毒素の RPLA 試験では、当初、平板法ポリキシン B 溶液上清の 2 倍希釈液で VT2 にごく弱く凝集が認められた(図 4 白枠)。しかしながら、保存株についてはまったく凝集が観察されなくなった(図 5:MMC 右白枠:濃度=0 ng/ml)。無処理では毒素産生が検出されなくなった 063:HMN 株は MMC 処理により、濃度依存的に VT2 を産生し、最終濃度 5ng/ml では無処理の 100 倍以上の毒素産生が確認された(図 5:左白枠)。

図 4:RPLA I



4. multiplex PCR 法の検討

今回、Ziebell らの方法を改良した VT multiplex PCR においては、063:HMN 株および保存株を用いた実験で良好な成績を得た(図 6)。

5. PFGE による EPEC 株との遺伝子比較解析

今回比較解析した EPEC (O63)5 株においては、供試菌(No.1, 2)と同一あるいは近縁株は存在しなかった(図 7)。

図 6:multiplex PCR

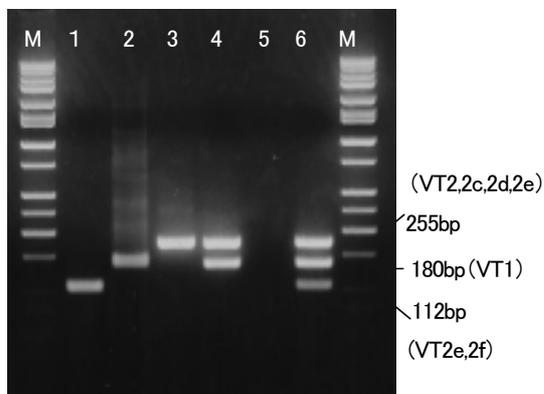
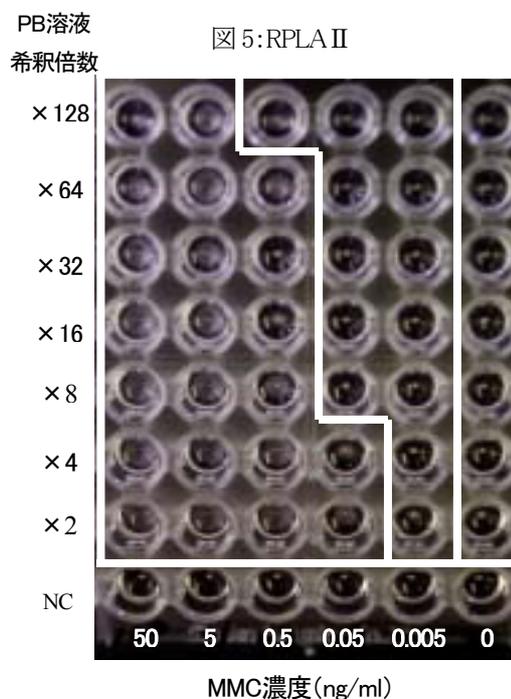


表 6:その他の病原遺伝子検索結果

	遺伝子	結果
A/E lesion	eaeA	+
	tir	(+)*
	Intimin	δ
	ESP-A	-
	ESP-B	+
	ESP-D	+
Plasmid	EhlyA	-
	BFP	-
	EAF	-
Toxin	astA	+
	aggR	-

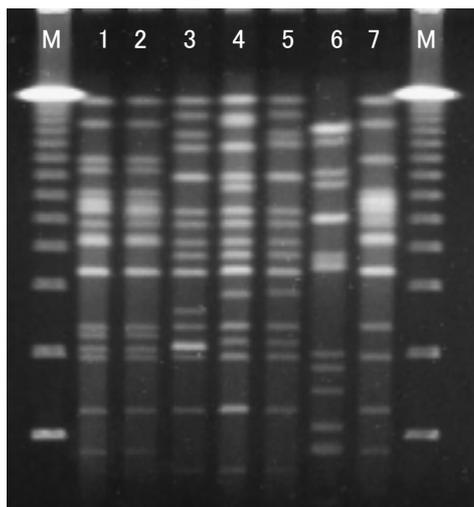
* shifted upper

図 5:RPLA II



No.	Serotype	Toxin type
1	63:NM	VT2f
2	111:NM	VT1
3	OUT:NM	VT2
4	157:7	VT1+2
5	N.C.	-
6	P.C.	VT1+2+2f

図 7:PFGE



No.	Strain(serotype)	No.	Strain(serotype)
1	VT2f01(63:NM)	5	EC343(63:6)
2	VT2f02(63:NM)	6	EC566(63:NM)
3	EC124(63:6)	7	EC3140(63:6)
4	EC255(63:6)		

まとめ及び考察

今回小児下痢症患者より分離された大腸菌 O63:HNM は、①PCR 法による毒素遺伝子の検索で、VT2 variant f が検出され、同 amplicom は RFLP によって variant f と確認された。また、②RPLA 法による毒素の確認では、MMC 処理により毒素産生が誘導され、VT2 毒素が確認された。③Ziebell らの方法を改良した multiplex PCR 法において、供試株の variant f 遺伝子は良好に検出された。④PFGE による解析では、比較した EPEC O63 (5 株) とは近縁あるいは同一株ではないものと考えられた。

血清型 O63 については、O157、111、26 をはじめとする従来から報告されている EHEC 血清型には含まれず、STEC としても非常に稀な血清型であると言える。また、近年、O63 の VT2 陽性株が本邦で数株分離されている¹⁸⁾が、VT2 毒素の詳細な variant type についての報告はなく、今回の分離株との相同性については不明であった。一方、O63 は散発性下痢症患者からしばしば分離され、VT 毒素(遺伝子)が検出されないため、EPEC とされている場合が多いものと思われる。今回の分離株についても VT 以外の遺伝子については、EhlyA や espA といった典型的な EHEC が保有する遺伝子が認められず、むしろ遺伝子的には EPEC により近いようにも思われた。いずれにせよ、O63 に限らず VT variant の検出が不十分である場合は、EPEC に分類された中に VT2 variant f を保有する株が少なからず存在するものとも考えられる。

通常、重篤な症状を呈する患者から分離される VT2 variant type のほとんどは c または d で、小児下痢症患者から非常に稀に豚浮腫病原菌である variant e が分離されると報告されている⁶⁾ことから、現在市販されている VT 検出用の primer や RPLA(EIA)用の抗体は VT2 または variant c、variant d といった major な type の毒素(遺伝

子)をターゲットに作製されているため、minor な variant である e や f については、今回のように検出値が一定しなかったり、まったく検出されないことも考えられる。また、VT 毒素の検出については、従来から行われている培養細胞を用いた検出系が最も確実と思われるが、今回の株のように、通常では産生される毒素量が非常に微量な場合には検出が困難で、MMC などの inducer による前処理の有無によって検出率に大きな差が出るものと考えられる。したがって、STEC の検査方法については、国によって使用する primer や毒素の検出方法を統一マニュアル化することが望まれる。今後当所では今回検討した Ziebell らの方法を改良した VT multiplex PCR により、糞便の培養液等からの検出を検討し、有用な遺伝子スクリーニング法として確立したい。また、PCR 陽性株のうち通常の方法で VT 毒素陰性の場合には、MMC 等の induction 試験を取り入れていきたい。

VT2 毒素の induction については、MMC 以外にも new quinolone 系薬物(Norfloxacin、Ciprofloxacin)や家畜の成長促進剤として飼料に配合されている薬物(Olaquinox、Carbadox)においても報告されており^{19,20,21)}、STEC 保菌患者へこれらの薬物を投与した場合は逆に induction がかかることで大量の毒素が腸管内で産生され、HUS を発症することも考えられる。また、家畜におけるこれら薬物の長期投与は薬剤耐性菌の誘導はもちろんのこと、VT converting phage の大量産生を誘起することによって VT 非保有の大腸菌や他の細菌への phage 感染を拡大していることが懸念される。したがって、今回検索した STEC O63 の様にたとえ微量の毒素を産生する株についても、公衆衛生上十分に注意する必要があると考えられる。

今回、induction 後のろ過上清を用いて、他の大腸菌に対する phage 感染試験についても実施したが、

transductionは認められず、VT2 converting phageの同定には至らなかった。しかしながら、今回検索した株は、本邦におけるVT2 variant f 産生 STEC O63として、貴重な株と思われるため、さらに今後 VT2f 陽性株を収集し、amplicon のシーケンス、phage の精製・感染試験や induction

実験などの分子解析を実施していきたい。

本稿をまとめるにあたり、菌株の提供をしていただいた佐賀県衛生薬業センター微生物課 森屋 一雄、隈元 星子 両氏に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1)James P.Nataro.,et al:Diarrheagenic *Escherichia coli*, Clin.Microbiol.Rev.,Jan., p.142- 201 (1998)
- 2)O'Brien,A.D.,et al:Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhage colitis or infantile diarrhea,Science 226:694-696(1984)
- 3)Karmali,M.A.,et al:Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*,Clin.Microbiol.Rev.2:15 - 38(1989)
- 4)Gad Frankel.,et al:Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*:more subversive elements,MicroReview Mol.Microbiol.30(5).911-921 (1998)
- 5)DAVID W.K.ACHESON.,et al:In Vivo Transduction with Shiga Toxin 1-Encoding Phage, Infection and Immunity,Sept,p4496-4498 (1998)
- 6)HERBERT SCHMIDT.,et al:A New Shiga Toxin 2 Variant(Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons,Applied and Environmental Microbiology, Mar,p1205-1208(2000)
- 7)Adu-Bobie,J.,et al:Detection of intimins α , β , γ , and δ ,four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens,J.Clin. Microbiol. 36:662-668(1998)
- 8)Franke,J.,et al:Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids,J. Clin.Microbiol.32:2460-2463(1994)
- 9)Gannon,V.P.,et al:Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction,J.Clin. Microbiol.31:1268-1274(1993)
- 10)Paton,A.W.,et al:Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*,*stx2*,*eaeA*, enterohemorrhagic *E.coli hlyA*,*rfb_{O111}*,and *rfb_{O157}*,J.Clin. Microbiol. 34:1622-1627(1998)
- 11)Wieler,T.S.,et al:Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines :association of adherence with carriage of eae and other genes,J.Clin. Microbiol. 34:2980-2984(1996)
- 12)HIDEKI KOBAYASHI.,Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Healthy Cattle in Japan,Appl.Env. Microbiol, Jan: 484-489(2001)
- 13)Lin,S.,et al:Cloning and sequencing of two new verotoxin 2 variant genes of *Escherichia coli* isolated from cases of human and bovine diarrhoea, Microbiol.Immunol.37:451-459(1993)
- 14)D.PIERARD.,et al:Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates,J.Clin. Microbiol. 36:3317-3322(1998)
- 15)Johnson,W.M.,et al:Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTE) by the polymerase chain reaction,J.Clin. Microbiol. 28: 2351-2353(1990)
- 16)Kim A.Ziebell.,et al:Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins,Res. Microbiol.153:289-300(2002)
- 17)渡辺 治雄,他:パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis,PFGE)の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究.平成 12 年度厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 総括・分担研究報告書, p142-164(2001)
- 18)IASR (Infectious Agents Surveillance Report) HP:<http://www.idsc.nih.go.jp/iasr/iasr-gg1.html>
- 19)AIZO MATSUSHIRO.,et al:Induction of Prophages of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with Norfloxacin,J.Bacteriol. Apr: 2257- 2260(1999)
- 20)Xiaoping Zhang.,et al:Quinolone Antibiotics Induce Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages, Toxin Production, and Death in Mice,J. Infec. Dis. 181:664-670 (2000)
- 21)Bernd Kohler.,et al:Antibacterials that are used as

growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains, Microbiol.146:1085-1090(2000)