

腸管出血性大腸菌 O121 感染事例からの考察

熊谷奈々子 須釜久美子 平澤恭子 長沢正秋 渡部啓司
微生物グループ

要 旨

腸管出血性大腸菌 O121 感染事例の発生に伴い、その性状や患者家族から検出された腸管出血性大腸菌 O146 の *eae* 遺伝子の有無、過去の株についての *eae* 遺伝子の有無を調べた。その結果、腸管出血性大腸菌 O121 は乳糖遅分解の性質を示す場合があることや *eae* 遺伝子の保有と症状の関連性などが判明した。これらの結果は報告されている文献と一致し、福島県で分離される菌株も例外ではない事をあらためて確認した。

キーワード：腸管出血性大腸菌 O121, 腸管出血性大腸菌 O146, *eae* 遺伝子

はじめに

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) については O157, O26, O111 などの血清型がよく知られているが、その他の血清型についても少なからず分離されている。特に EHEC O121 は、上記の 3 血清型を除くと、2003 年 13.0 % (108 株中 14 株)、2004 年 17.6 % (119 株中 21 株)、2005 年 11.9 % (84 株中 10 株) と常に上位を占めている。また、その生化学的性状の中で乳糖分解性において、興味深い報告がいくつかなされている^{1)~3)}。

今回、当県において EHEC O121 による患者が発生し、菌株を入手する機会があった。そのため、その性状等の確認・検討を行ったので報告する。また、その関連株についても報告する。

事例の概要

2005 年 6 月 19 日、仙台市内の医療機関から VT2 産生の EHEC O121 の患者発生届け出があった。患者は福島県在住の 3 歳児で、HUS 発症のため仙台市内の病院に転院となっていた。そのため、家族等の関連調査は福島県で行われ、衛生研究所相双支所に検体が搬入された。検査の結果、患者の家族から VT2 産生の EHEC O146 が検出された。しかし、関連調査の対象である EHEC O121 ではなかったこと、健康保菌者であることから届

出基準には該当せず、国立感染症研究所に菌株を送付するのみとなった。

方 法

1 EHEC O121について

EHEC O121 は、仙台市衛生研究所より分与を受けた 2 株 (a, b) について検討した。この 2 株は単一集落由来ではあるが、DHL 上の形状や生化学的性状において若干異なる点があるという情報を受け、以下の分析を行った。

1) 培地、同定キットによる性状確認

DHL 寒天培地 (日水製薬)、クロモアガー O157 (クロモアガー社)、RX O26 寒天培地 (栄研化学) に塗抹し、性状を確認した。また、API 20E (日本ビオメリュー) でも性状を確認した。

2) PFGE 法による解析

染色体 DNA を制限酵素で切断し、その断片を電気泳動してパターン解析を行った。制限酵素 *Xba*I を用い、泳動条件は電圧 6V/cm、パルスタイム 2.2 ~ 54.2 秒、泳動時間 19 時間、バッファー温度は 14 °C とした。なお、DNA サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 を用いた。

2 EHEC O146について

VT2 を産生しているが無症状であるということから、細胞附着性に関与した遺伝子であ

る *eae* 遺伝子の有無を PCR で確認した. プライマーは mSK1, *eaekas_a* を用いた. 増幅産物は 310bp で検出される.

3 過去のEHEC株の*eae*遺伝子保有状況について

2006 年 1 月までの当所にて保存してある EHEC 株の中から, 無症状病原体保菌者より分離された EHEC O26 と EHEC O157 をそれぞれ 5 株ずつ任意に選び, *eae* 遺伝子の有無を PCR で確認した. また, O157, O26, O111 以外の血清型の EHEC 5 株 (O1 が 1 株, O103 が 2 株, O128 が 1 株, O153 が 1 株) についても *eae* 遺伝子の有無を PCR で確認した.

結果

1 EHEC O121について

1) 培地, 同定キットによる性状確認

結果を表 1 に示す. DHL と RX O26 上で a, b 株は異なる性状を示した. また, b 株の赤色, 無色透明集落をもう一度 DHL に塗抹すると, 前者はすべて赤色集落になり, 後者は再び赤色集落と無色透明集落の両方を形成した.

API 20E の同定キットでは a, b 両株とも大腸菌と同定された. ただ, ONPG の判定において a 株は明らかな陽性であったが, b 株はよく見ないとわからないほど極めて弱い陽性であった.

2) PFGE 法による解析

EHEC O121 の PFGE パターンを図 1 に示す. a, b 両株は同一パターンを示した.

2 EHEC O146について

図 2 に示したとおり, EHEC O146 は *eae* 遺伝子を保有していなかった.

3 過去のEHEC株の*eae*遺伝子保有状況について

無症状病原体保菌者より分離された EHEC O26 と EHEC O157, 計 10 株については, 図 3 に示したとおり, すべての株が *eae* 遺伝子を保有していた. 一方, O157, O26, O111 以外の血清型の EHEC 5 株については, 図 2

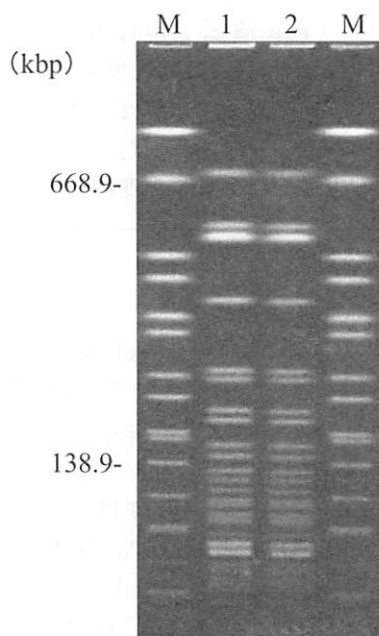


図 1 EHEC O121の*Xba*IによるPFGEパターン
1: a 株
2: b 株
M: *Salmonella* Braenderup H9812

に示したとおり, O103 の 2 株のみが *eae* 遺伝子を保有し, O1, O128, O153 については *eae* 遺伝子を保有していなかった.

考察

1 EHEC O121について

表 1 のとおり, a, b 株で違いのあった項目はすべて乳糖分解性に関するものであった.

表 1 EHEC O121の培地, 同定キットにおける性状

	DHL	DHL (再塗抹)	RX O26	クロモアガー O157	API 20E
a 株 (18時間)	赤	—	緑	青	<i>E. coli</i> (ONPGは明らかな陽性)
b 株 (18時間)	赤 + 無色透明	赤 → 赤のみ 透明 → 赤 + 透明	緑 + 無色透明	青	<i>E. coli</i> (ONPGは極めて薄い陽性)

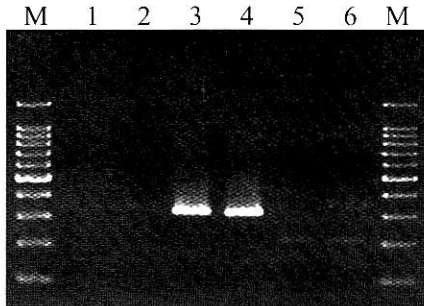


図2 0157, 026, 0111以外の血清型におけるEHEC株の*eae*遺伝子

- 1 : EHEC O146
- 2 : EHEC O1 (0歳, 女)
- 3 : EHEC O103 (4歳, 女)
- 4 : EHEC O103 (13歳, 男)
- 5 : EHEC O128 (44歳, 女)
- 6 : EHEC O153 (不明)
- M : 100bp DNA ラダー

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M



図3 EHEC 026, 0157 (無症状病原体保有者)の*eae*遺伝子

- 1 ~ 5 : EHEC O26
- 6 ~ 10 : EHEC O157
- 11 : BL
- M : 100bp DNA ラダー

DHL には乳糖が含まれ、分解されれば赤色になる。RX O26 には、乳糖分解酵素であるβ-ガラクトシダーゼに反応する発色酵素基質が含まれているため、β-ガラクトシダーゼを産生していれば緑色になる。ONPG もβ-ガラクトシダーゼに反応して黄色を呈する。

b 株は DHL で赤色と無色透明の集落を形成し、また、RX O26 では緑色と無色透明の集落を形成した。つまり、b 株の DHL 上の無色透明集落が乳糖を分解できなかったのはβ-ガラクトシダーゼを産生していなかった、または産生量が非常に少なかったためと考え

られる。API 20E で、b 株の ONPG がよく見ないとわからないほど極めて弱い陽性であった事も、β-ガラクトシダーゼを産生している菌数が非常に少なかったためと考えれば説明する事が可能になる。

さらに、b 株の赤色、無色透明集落を再度 DHL に塗抹すると、前者はすべて赤色集落になり、後者は再び赤色集落と無色透明集落が混在した状態になった。この事から、一度β-ガラクトシダーゼの産生量が多い a 株のような状態(コロニー)になると、その性質は変化しない事が考えられた。

また、乳糖分解に関わる遺伝子自体は a, b 両株とも同じく持っているため、PFGE でパターンが変化するほどの違いはなかったと推察する。ただ、酵素の発現を調節する遺伝子では若干の違いが現れる可能性は考えられる。

通常の大腸菌は a 株のような性状であるが、EHEC O121 に関しては b 株のような性状の場合もあるので、注意が必要と考える。

2 EHEC 0146について

eae 遺伝子は *bfpA* 遺伝子とともに、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) の付着因子遺伝子として知られている⁴⁾が、EHEC の感染にも関与していることが明らかになっている⁵⁾。*eae* 遺伝子はインチミンというタンパクをコードし、インチミンは腸粘膜上皮細胞と結合する。付着因子についてはまだ不明な点も多いが、腸管病原菌による腸内感染は腸管の標的細胞に付着があって初めて成立すると考えられているため、その有無は重要である。

今回検出された EHEC O146 は、*eae* 遺伝子を保有していなかった。インチミンがなければ VT を産生していても定着できず、腸管内を一過性に通り返るのみであると考えられる。患者の家族は無症状であり、検出された EHEC O146 は *eae* 遺伝子を保有していなかったことから、たまたま経口的に体内に入り腸管細胞に付着する事なく、通過菌として体外に出された際に検出されたものと推察できる。

3 過去のEHEC株の*eae*遺伝子保有状況につ

いて

EHEC O157, O26, O111 については症状の有無にかかわらず、ほとんどの株が *eae* 遺伝子を保有している事が知られている⁹⁾。今回の結果もそれを裏付ける結果となった。

一方、O157, O26, O111 以外の血清型の EHEC 株 (O1, O103, O128, O153) については、O103 の 2 株のみが *eae* 遺伝子を保有していた。O103 は *eae* 遺伝子の保有率が高いとの報告がある⁴⁾。O128 については給食調理者のため定期検便検査で検出されており、今回の EHEC O146 と同じく偶然発見された可能性が高い。O1 については O103 の 2 株に比べると比較的症状は軽かった。O153 については詳細な資料がないため明確にはわからないが、*eae* 遺伝子を保有していなかったことから症状が軽かったか、あるいは別の付着様式をとっていたかのいずれかが考えられた。

引用文献

- 1) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 結核感染症課. <情報>1997年7月に秋田県内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O121 : H19の性状. 病原微生物検出情報 1998 ; 10 : 226.
- 2) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 結核感染症課. <特集関連情報>保育園における腸管出血性大腸菌O121 : H19の集団発生事例—佐賀県. 病原微生物検出情報 2002 ; 6 : 143 - 144.
- 3) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 結核感染症課. <国内情報>飼育牛が感染源と特定された小学校における腸管出血性大腸菌 O121集団感染事例—千葉市. 病原微生物検出情報 2004 ; 11 : 302 - 303.
- 4) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 他. 下痢原性大腸菌における付着性因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察. 感染症学雑誌 2002 ; 76(11) : 911 - 920.
- 5) Boerlin P, McEwen S, Boerlin-Petzold F, et al. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-1 Escherichia coli and Disease in Humans. J Clin Microbiol. 1999;37(3):497 - 503.
- 6) McKee M, Melton-Celsa A, Moxley R, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Requires Intimin To Colonize the Gnotobiotic Pig Intestine and To Adhere to HEp-2 Cells, Infect. Immun. 1995;63:3739 - 3744.