

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O121:H19 の病原遺伝子と分子疫学的性状

八柳 潤 齊藤志保子 今野貴之

STEC O121:H19 は感染者に比較的重篤な症状を惹起するが、その病原性の背景となる病原遺伝子の性状に関する特徴は不明である。我々は、最近提唱された STEC の病原性と特定の Genomic Island の存在が密接に関連するとの仮説について、秋田県でこれまで分離された STEC O121:H19 21 株を供試して検証した。供試した STEC O121:H19 は全て *stx2*, *eaeA*, *pagC*, *sen*, *efa1* 遺伝子を保有していたが、OI-1, OI-47, OI-141, OI-154 は陰性であった。このことから、STEC O121:H19 は Fimbria 関連遺伝子 OI-1, OI-47, OI-141, OI-154 を保有せず、完全型 OI-122 と *eaeA*, *stx2* 遺伝子を保有することが確認された。完全型 OI-122 と *eaeA* 遺伝子を保有しながら血便や HUS を惹起しない STEC O103 の病原遺伝子との比較から、完全型 OI-122 の存在だけではなく *stx2* 遺伝子の存在が STEC O121:H19 の高い病原性に関与している可能性が示唆された。STEC O121:H19 の感染源、感染ルートに関する知見は STEC O157 と比較して極めて少ないため、今後その点について調査を実施して効果的な感染予防策を構築していく必要がある。

1. はじめに

Shiga toxin(*stx*)-producing *Escherichia coli* (STEC) strains は下痢だけではなく、ときに出血性大腸炎(HC)や溶血性尿毒症症候群(HUS) を惹起する¹⁾。STEC O157:H7 は HC や HUS を併発した患者から最も多く分離される STEC の血清型であるが、それ以外の血清型の STEC も下痢症や HC, HUS 患者から分離される^{2) 3) 4)}。O157 以外の血清群の STEC である Non-O157 STEC のうち、特に STEC O121:H19 は国内で集団下痢症を引き起こしており、秋田県でも井戸水を介した HUS の併発を伴う家族内集団感染事例が発生した⁵⁾。秋田県では 1997 年に初めて分離⁶⁾された STEC O121:H19 は、感染者に血便など比較的重篤な症状を惹起するだけではなく、Non-O157 STEC のうち唯一 HUS を併発している。STEC O121:H19 がなぜ感染者に比較的重篤な症状を惹起し、また Non-O157 STEC のなかで唯一 HUS を併発するのか、背景となる病原遺伝子の性状に関する特徴は不明である。さらに、STEC O121:H19 の Clonal relationship を特徴付ける分子疫学的性状に関する報告も殆どない。

最近、Karmali ら⁷⁾と Shen ら⁸⁾は STEC の病原性と特定の Genomic Island の存在が密接に関連することを報告し、保有遺伝子と病原性の関連から STEC を Seropathotype A から D のカテゴリーに分類することを提唱した。その分類に

従うと、STEC O157 H7 と STEC O157:NM は Seropathotype A, STEC O26:H11, O145:NM, O111:NM, O103:H2, O121:H19 は Seropathotype B に該当する。Seropathotype A は最も高頻度に HUS を併発し、また、集団感染事例を引き起こし、欠損のない「完全型」OI-122 遺伝子に加えて、OI-1, OI-47, OI-141, OI-154 という Fimbria 関連遺伝子を保有している。一方、Seropathotype B は頻度は比較的低いものの HUS を併発し、集団感染事例を引き起こし、Fimbria 関連遺伝子を保有せず、OI-122 に欠損が認められる血清型と完全型 OI-122 を保有する血清型を包含している^{7, 8)}。STEC O121:H19 は Seropathotype B に分類され、完全型 OI-122 遺伝子を保有する一方で Fimbria 関連遺伝子を保有しないとされている^{7, 8)}が、Karmali らが当該論文において供試した STEC O121:H19 はわずかに 3 株であることから、その特徴を明らかにするためにはさらに多くの STEC O121:H19 について検討する必要があると考えられる。

今回、我々は秋田県でこれまでに分離された STEC O121:H19 21 株を供試して Karmali ら⁷⁾と Shen ら⁸⁾が提唱した仮説の検証を試みた。さらに、STEC O121:H19 の分子疫学的性状を他の血清型の STEC と比較し、STEC O121:H19 の Clonal relationship についても検討した。

2. 材料と方法

2.1 PCRによる病原遺伝子の検出

秋田県で分離された STEC O121:H19 21 株 (表 1), STEC O26 14 株, STEC O103 13 株を OI-122 の検出に供試した。これらはいずれも Seropathotype B に分類されている。OI-122 構成遺伝子のうち *pagC*, *sen*, *efa1* 遺伝子 (表 2) を PCR の標的とした⁷⁾。STEC O121:H19 21 株について表 2 に示す構成遺伝子を標的とした PCR により OI-1, OI-47, OI-131, OI-154 遺伝子の存在を検討した⁸⁾。また、供試株について、既報の PCR に従い、*stx* 遺伝子の検出と型別と *eaeA* 遺伝子の検出⁹⁾ を実施した。

2.2 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

STEC O121:H19 21 株, STEC O26 strains 14 株, STEC O103 5 株, STEC O157 21 株を PFGE パターンの比較解析に供した。PFGE は Pulsnet-USA^{1,10)} のプロトコールに従い実施し、デンドログラムは Fingerprinting II software (BIO-RAD) を使用して作成した。制限酵素には *Xba*I (30U/plug) を使用した。

3. 結果と考察

PCR による OI-122 構成遺伝子の検出結果例を図 1 に、供試株の病原遺伝子保有状況を表 3 にそれぞれ示した。供試した STEC O121:H19 21 株は全て *stx2*, *eaeA*, *pagC*, *sen*, *efa1* 遺伝子を保有していたが、OI-1, OI-47, OI-141, OI-154 は陰性であったことから、STEC O121:H19 は Fimbria 関連遺伝子 OI-1, OI-47, OI-141, OI-154 を保有せず、完全型 OI-122 と *eaeA*, *stx2* 遺伝子を保有することが示された。一方、STEC O26 は全て *stx1*, *eaeA*, *sen*, *efa1* 遺伝子陽性、*pagC* 遺伝子陰性であった。また、STEC O103 13 株のうち、6 株が *stx1*, *eaeA*, *pagC*, *sen*, *efa1* 遺伝子を保有し、他 6 株は *stx1*, *eaeA*, *sen*, *efa1* 遺伝子陽性、*pagC* 遺伝子陰性、残り 1 株は *stx1* と *eaeA* 遺伝子のみ陽性、*sen*, *efa1*, *pagC* 遺伝子がいずれも陰性であった。以上の結果は、STEC O26 と STEC O103 が *stx1* と *eaeA* 遺伝子を保有すること、また STEC O26 は欠損のある OI-122 を保有していることを示していた。一方、STEC O103 には完全型 OI-122、欠損のある OI-122 を保有している株と OI-122 を保有しない

株が混在していることが示された。

図 2 に示すように、STEC O121:H19 の PFGE パターンは 69.9% の類似度であったが、STEC O157 の PFGE パターンと STEC O26 の PFGE パターンの類似度はそれぞれ 56.8% と 57.7 % であった。このことは STEC O121:H19 が相互の関連性が高い clone から構成されていることを示唆しているものと考えられた。

STEC の病原性は血清型に異なることが知られていたにもかかわらず、その理由は明らかとなっていない⁷⁾。近年、下痢原性大腸菌¹¹⁾ を含む病原細菌の病原性には Pathogenicity Island (PAI) と呼ばれる水平伝播により獲得された一群の遺伝子が重要な役割を果たしていることが認識されるようになった。STEC の病原性についても最近、PAI に該当する各種の OI の関与が指摘されている^{7) 8)}。Non-O157 のうち、STEC O121:H19 は STEC O26 や STEC O103 などとは異なり、秋田県⁵⁾ だけではなく欧米⁴⁾ においても患者が比較的重篤な症状を呈することが報告されていることから、注目すべき血清型であるものの、その高い病原性の理由となる病原遺伝子上の特徴については明らかにならなかった。今回、秋田県でこれまで分離された 21 株の STEC O121:H19 を用いて実施した我々の検討により、Karmali らと Shen らが提唱した仮説を支持する結果が示された。しかし、STEC O103 には STEC O121 と同様に完全型 OI-122 を保有している株が約半数認められたにもかかわらず、秋田県では STEC O103 が患者に血便や HUS を併発した例はこれまで認められていない。このことは、STEC の病原性に OI-122 以外の要因が関与していることを示唆するものと考えられる。STEC O121:H19 と STEC O103 の病原性の違いがどのような機構に起因しているのか詳細は不明であるが、Paton ら¹²⁾ は *Stx2* 単独産生株が *Stx1* 単独産生株と比較して、また *eaeA* 遺伝子保有株が *eaeA* 遺伝子非保有株と比較して、より高頻度に HUS などの重篤な症状の発現に関与していることを疫学的に指摘している。いずれも完全型 OI-122 を保有している STEC O121:H19 と STEC O103 に認められる病原性の違いには、Paton らが提唱した産生する *stx* の型の違いが関与している可能性があるものと考えられ、この点については今後、さらなる検討が必要と考え

られる。一方、Tarrらは*E. coli* O121:H19が単一のETから構成され、他の血清型の大腸菌よりもhomogeneousであることを指摘している。今回、我々がPFGEパターンの比較解析により得た、STEC O121:H19が相互の関連性が高いcloneから構成されていることを示唆する結果は、TarrらがETの検討により得た結果と一致するものであった。

Seropathotype Bに分類されるSTEC O121:H19が完全型OI-122、*eaeA*遺伝子、*stx2*遺伝子を保有することが実際に確認され、完全型OI-122の存在だけではなく、*eaeA*遺伝子と*stx2*遺伝子の存在がSTEC O121:H19の高い病原性に関与している可能性が示された。STEC O121:H19は重篤な症状を惹起するNon-O157 STECであることから、STEC O157同様に感染対策を講じる必要があると考えられる。しかしながら、STEC O121:H19の感染源、感染ルートに関する知見はSTEC O157と比較して極めて少ないため、今後その点について研究を実施して効果的な感染予防策を構築していく必要がある。

4. まとめ

- ・秋田県でこれまでに分離されたSTEC O121:H19 21株について病原遺伝子の保有状況を検討した結果、供試したSTEC O121:H19は全て*stx2*、*eaeA*、*pagC*、*sen*、*efa1*遺伝子を保有していたが、OI-1、OI-47、OI-141、OI-154は陰性であった。このことから、STEC O121:H19はFimbria関連遺伝子OI-1、OI-47、OI-141、OI-154を保有せず、完全型OI-122と*eaeA*、*stx2*遺伝子を保有することが確認された。

- ・完全型OI-122の存在だけではなく、*eaeA*遺伝子と*stx2*遺伝子の存在がSTEC O121:H19の高い病原性に関与している可能性が示された。

- ・*Xba*I PFGEパターンの比較検討により、STEC O121:H19が相互の関連性が高いcloneから構成されていることが示唆された。

- ・STEC O121:H19の感染源、感染ルートに関する知見はSTEC O157と比較して極めて少ないため、今後その点について研究を実施して効果的な感染予防策を構築していく必要がある。

5. 文献

1) Karmali, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 1989; 2: 15-38.

2) Tarr, P.I., and Neill, M.A. Perspective; the problem of non-O157:H7 shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 1996; 174: 613-624.

3) Ludwig, K., Bitzan, M., Zimmermann, S., Kloth, M., Ruder, H., and Muller-Wiefel, D.E. Immune response to non-O157 vero toxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. J. Infect. Dis., 1996; 174: 1028-1039.

4) McCarty, T.A., Barrett, N.L., Hadler, J.L., Salisbury, B., Howard, R.T., Dingman, D.W., Brinkman, C.D., Bibb, W.F., and Carter, M.L. Hemolytic-uremic Syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. Pediatrics, 2001; 108: E59.

5) Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito and Isao Ito, A case of Hemolytic-Uremic Syndrome Associated with Shiga Toxin 2-Producing *Escherichia coli* O121 Infection Caused by Drinking Water Contaminated with Bovine Feces. Jpn. J. Infect. Dis., 2002; 55: 174-176. 6) 八柳 潤, 木内 雄, 齊藤志保子, 鈴木陽子, 佐藤宏康, 宮島嘉道, 1997年7月に秋田県で分離されたVero毒素産生性大腸菌O121:H19 2株の性状とVirulence factor, 感染症学雑誌, 1999; 73: 218-224.

7) Karmali, M.A. et al. Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. J. Clin. Microbiol., 2003; 41: 4930-4940.

8) Shen, S. et al. Identification of Four Fimbria-Encoding Genomic Islands That Are Highly Specific for Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Serotype O157 Strains. J. Clin. Microbiol., 2005; 43: 3840-3850.

9) Yatsuyanagi, J. et al. Characterization of Enteropathogenic and Enterocytotoxic *Escherichia coli* Isolated from Diarrheal Outbreaks. J. Clin. Microbiol., 2002; 40: 294-297.

10) The National Molecular Subtyping Network

for Foodborne Disease Surveillance, CDC.

1 1) Kaper, J.B., Mellies, J.L., and Nataro, J.P. (1999): Pathogenicity Islands and Other Mobile Genetic Elements of Diarrheagenic *Escherichia coli*. In MKaper, J.B., and Hacker, J. (ed.), Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements.

American Society for Microbiology, Washington, D.C.

1 2) Paton, J.C. et al. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. Clin. Microbiol. Rev., 1998 ; 11 : 450-479.

表1 STEC 0121:H19供試株

菌株番号	分離年月日	由来	菌株番号	分離年月日	由来
EC707	'97 Jul. 18	SP BD	EC4230	'00 Oct. 31	Bovine
EC716	'97 Jul. 23	SP BD	EC4237	'00 Oct. 31	Bovine
EC1603	'98 Aug. 12	SP D	EC5122	'01 Jun. 27	SP D
EC2935	'99 Oct. 22	SP D	EC6804	'02 Jul. 19	OB BD
EC3105	'99 Nov. 10	FML D	EC6998	'02 Aug. 28	SP D
EC3725	'00 Jul. 7	SP BD	EC7982	'03 Jun. 24	SP D
EC3772	'00 Jul. 18	SP BD	EC8048	'03 Jul. 24	SP D
EC3896	'00 Aug. 11	FML HUS	EC8243	'03 Sep. 26	SP D
EC3964	'00 Aug. 23	SP D	EC9065	'04 Sep. 2	SP D
EC3993	'00 Aug. 30	SP D	EC9208	'04 Nov. 9	FML D
EC4151	'00 Oct. 7	FML HUS			

SP: 散発 OB: 集発 FML: 家族内感染
D: 下痢 BD: 血性下痢

表2 検出したO1とPCRの標的としたO1構成遺伝子

Genomic islands	標的としたO1構成遺伝子						
O1-122	Z4321 (pagC)	Z4326 (sen)	Z4332 (efa1)	Z4333 (efa1)			
O1-1	Z0024						
O1-47	Z1528	Z1534	Z1538	Z1542	Z1548	Z1552	Z1556
O1-141	Z4965	Z4966	Z4971				
O1-154	Z5220	Z5221	Z5225				

表3 秋田県で分離されたSeropathotype B STECの病原遺伝子

		O1-122								<i>eaeA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
		Z4321	Z4326	Z4332	Z4333	O1-1	O1-47	O1-141	O1-154			
STEC 0121	21/21	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
STEC 026	14/14	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	-
STEC 0103	6/13	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	-
	6/13	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	-
	1/13	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	+	+	-

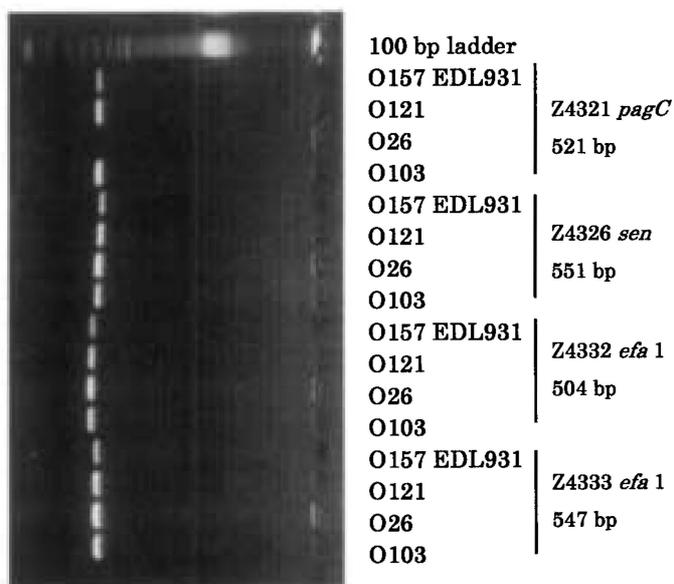


図1 PCRによるOI-122構成遺伝子の検出

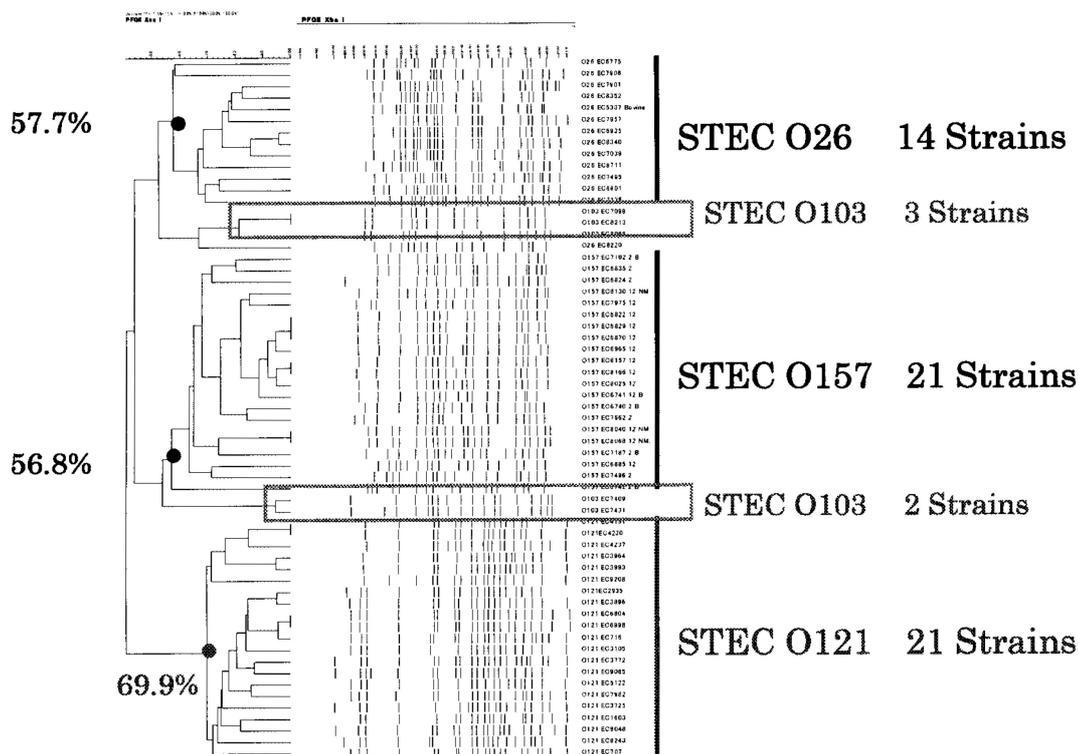


図2 STEC 0121、0157、026、0103分離株のXbaI PFGEパターンから構築したデンドログラム