

食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の菌学的性状に関する研究（平成 24～25 年度）

E. coli O104 同定用 PCR の確立と陽性対象専用株の作出

八柳 潤 今野貴之 齊藤志保子

2011 年 5 月から 7 月にドイツ北部で腸管凝集付着性腸管出血性大腸菌(EA_g-EHEC) O104:H4 による甚大な健康被害が発生した。*E. coli* O104 用の型別血清が国内では市販されていないことから、*E. coli* O104 O 抗原合成遺伝子群を標的とした PCR 法の確立と、*E. coli* O104 PCR 用陽性対象専用株の作出を試みた。*E. coli* O104 O antigen polymerase (*wzy*) 遺伝子の一部、470 bp を増幅するプライマー O104wzy_F と O104wzy_R を設計した。また、海外旅行者下痢症由来 EA_gEC O104 2342 株から増幅した *E. coli* O104wzy 遺伝子の ORF 全長をクローニングし、*E. coli* O104 同定用 PCR 陽性対象専用株 *E. coli* JM109/O104wzy 株を作出した。この PCR 反応系の確立により、秋田県内で EA_g-EHEC O104 疑い株が患者から分離された場合、被検菌が O104 抗原を保有する EA_g-EHEC であるかどうかを迅速に決定することが可能となった。

1. 緒言

2011 年 5 月 8 日から 7 月 4 日にドイツ北部を中心に 3,842 例の腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*:EHEC) 感染事例が発生した。感染者のうち 855 名が溶血性尿毒症症候群 (HUS) を併発し、53 名が死亡した。この事例の原因菌は血清型 O104:H4、志賀毒素 (Stx)₂ 産生株であった。また、この株は血清型 O157:H7 など多くの EHEC が保有する Locus of Enterocyte Effacement (LEE) 付着因子を保有せず、腸管凝集付着性大腸菌 (EA_gEC) の凝集性付着因子を保有することが明らかとなったことから、腸管凝集付着性 EHEC (EA_g-EHEC) と位置づけられた。PFGE 解析などにより、この株は EA_gEC O104:H4 に Stx₂ フェージが感染することにより派生したものと推察された^{1,2)}。

EA_g-EHEC O104:H4 が欧州において惹起した健康被害は甚大であったことから、国内における本菌の動向を把握することが重要であると考えられる。しかしながら、*E. coli* O104 用の型別血清は市販されていないことから、EA_g-EHEC O104:H4 疑い菌が分離されたとしても血清型の確定までにかかなりの時間を要することが問題であった。

本調査研究事業は、秋田県で EA_g-EHEC O104:H4 疑い株が分離された場合に迅速に血清型を決定するための技術を導入・確立することを目的として実施し、*E. coli* O104 O 抗原合成遺

伝子群を標的とした PCR 法の確立と、*E. coli* O104 PCR 用陽性対象専用株の作出を試みた。

2. 方法

2.1 *E. coli* O104 O 抗原合成遺伝子群を標的とした PCR 用プライマー

E. coli O104 O antigen polymerase (*wzy* : GenBank Accession No. AF361371) 遺伝子の一部、470 bp を増幅する O104wzy_F : 5'-ttt act tca cga ggt gtc aag-3' (79-89) と O104wzy_R : 5'-att aac att aat gca gat aaa tgg-3' (525-548) を設計した。

2.2 *E. coli* O104 PCR 用陽性対象専用株の作出

E. coli O104 PCR 用陽性対象を作出するためには血清群 O104 の大腸菌が必要であることから、国立感染症研究所から海外旅行者下痢症患者由来の EA_gEC O104 2342 株の抽出 DNA 溶液を分与を受け、*E. coli* O104wzy 遺伝子のクローニングに供した。*E. coli* O104wzy 遺伝子のクローニングは図 1 の模式図に示す方法によりクローニングした。プライマー O104wzy_ORF_F : 5'-atg aca tct tat ttc ata tat aat tt-3' と O104wzy_ORF_R : 5'-tta gtg att gat aat tgt tct atc c-3' を使用して *E. coli* O104wzy 遺伝子 ORF の全長 (1,113 bp) を増幅した。得られた増幅断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製した後、TA クローニングシステム (Amersham) と、トランスフォーメーションキット (ニッポンジーン)

を使用して *E. coli* JM109 株にクローニングし、*E. coli* JM109/O104wzy 株を得た。

3. 結果と考察

プライマーペアー O104wzy_F と O104wzy_R, O104wzy_ORF_F と O104wzy_ORF_R を使用し、EAggEC 2342 株と *E. coli* JM109/O104wzy 株の抽出 DNA 溶液をテンプレートとして実施した PCR の結果を図 2 に示す。プライマーペアー O104wzy_F と O104wzy_R を使用する PCR により、EAggEC 2342 株 (レーン 2) と *E. coli* JM109/O104wzy 株 (レーン 4) のいずれからとも設計どおりの 470 bp 増幅断片が得られた。また、

O104 wzy_ORF_F と O104wzy_ORF_R を使用する PCR により、EAggEC 2342 株 (レーン 1) と *E. coli* JM109/O104wzy 株 (レーン 3) のいずれからとも O104wzy 遺伝子の全長に該当する 1,113 bp 増幅断片が得られた。*E. coli* O 抗原合成遺伝子群のうち、O antigen Polymerase (wzy) 遺伝子と O antigen Flippase (wzx) 遺伝子が O 抗原に特異的であることが知られている。wzy 遺伝子は O 抗原多糖分子の生合成に関与する酵素の構造遺伝子であり、O 抗原の免疫原性決定の根幹に関わる遺伝子である。このため、O 抗原に対する特異性が極めて高く、これまで O157³⁾, O103⁴⁾, O121⁵⁾ など多種類の *E. coli* O 抗原決定用 PCR の

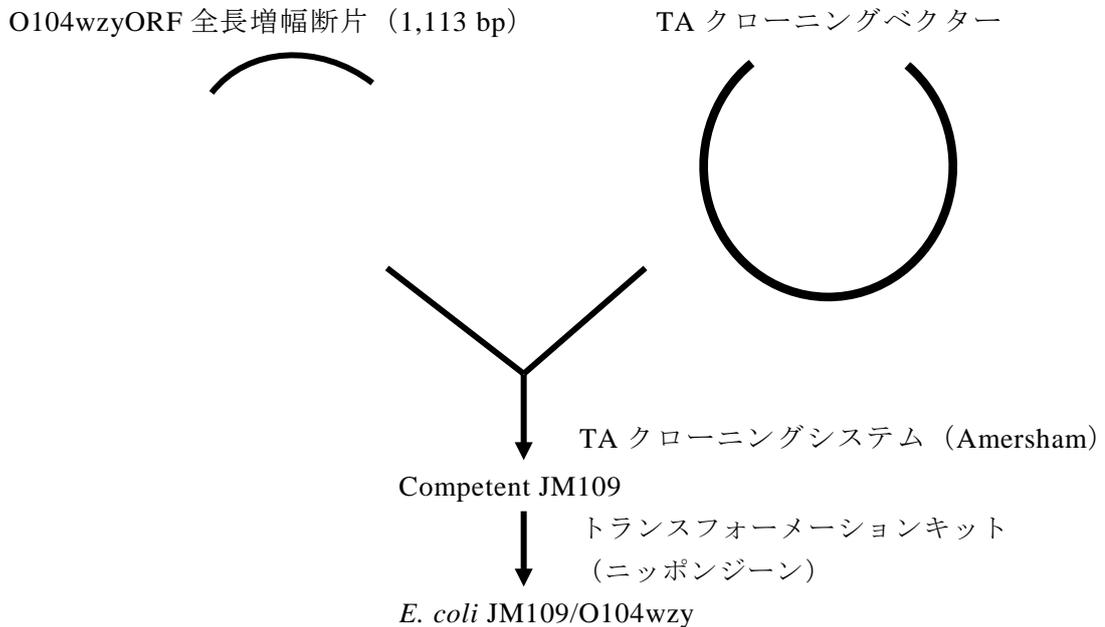


図 1 O104wzy PCR 用陽性対象株の作出方法模式図

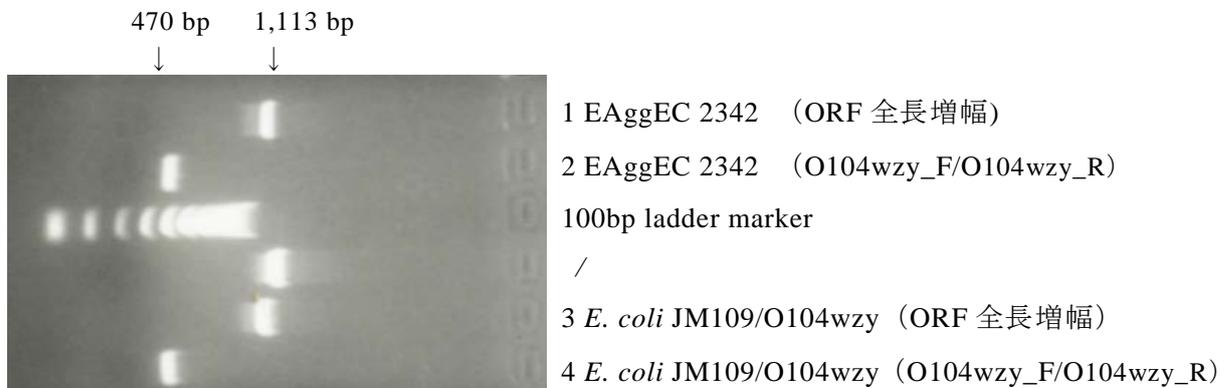


図 2 プライマーペアー O104wzy_F と O104wzy_R による EAggEC 2342 と *E. coli* JM109/O104wzy からの 470bp 断片の増幅

標的遺伝子とされている。実際、*E. coli* O104wzy 遺伝子と O157, O26 などの wzy 遺伝子の塩基配列を比較すると、相同性は認められない。

一方、Genbank には *E. coli* O104wzy が 2 種類登録されており、それらの塩基配列を比較すると相同性は極めて高い。

E. coli O104 O antigen gene cluster の配列は、*E. coli* K9 抗原合成遺伝子の配列と例外的に同一⁶⁾である。このため、*E. coli* O104 同定用 PCR は O104 抗原を保有しない *E. coli* K9 も陽性となる「偽陽性反応」が出現することになる。K9 抗原を保有する大腸菌は O8 と O9 に限られている⁶⁾ことから、O8/O9 と O104 の鑑別が可能であれば *E. coli* K9 による偽陽性の問題を回避することが可能である。この鑑別に利用可能な *E. coli* O8 と O9 の mannosyltransferase B (*wbdD*) 遺伝子の共通配列を標的とした PCR 用プライマーが報告されている⁶⁾ので(#3592:5'-GGC ATC GGT CGG TAT TCC-3', #3594:5'-TGC GCT AAT GCG GTC TAC-3', 増幅断片サイズ 972 bp), O104 の PCR により陽性となった大腸菌については、更にこの PCR を実施して K9 抗原による反応であるか否かを確認する必要がある。

4. まとめ

秋田県内で EA_gg-EHEC O104 疑い株が患者から分離された場合、*stx* 遺伝子、*aggR* 遺伝子などと併せて今回確立した PCR 方を実施することにより、迅速確実に被検菌が O104 抗原を保有する EA_gg-EHEC であるかどうかを決定することが可能となった。国内における EA_gg-EHEC O104 の分離報告は今のところ無いが、本菌が欧州で惹起した健康被害は甚大であったことから、秋田県内での EA_gg-EHEC O104 による感染者の発生状況や秋田県内で食肉用にと殺される牛の EA_gg-EHEC O104 保菌状況に注視する必要がある。

参考文献

- 1) 大西 真, 伊豫田 淳, 三戸部治郎, 寺嶋 淳 : ドイツを中心とした EA_gg-EHEC O104:H4 による大規模集団事例, 病原微生物検出情報, **33**, 2012, 131-132.
- 2) Scheutz F. et al. : Characterization of the enteroaggregative Shiga toxin / verocytotoxin - producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. Euro Surveill. 2011;16(24):pii=19889. E-ALERT.
- 3) Maurer J.J. et al. : Development of Primers to O-Antigen Biosynthesis Genes for Specific Detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl. Envir. Microbiol., **65**, 1999, 2954-2960.
- 4) Fratamico P.M. et al. : DNA sequence of the *Escherichia coli* O103 O antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O103 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. Can. J. Microbiol., **51**, 2005, 515-522.
- 5) Fratamico P.M. et al. : Sequence of the *Escherichia coli* O121 O-Antigen Gene Cluster and Detection of Enterohemorrhagic *E. coli* O121 by PCR Amplification of the *wzx* and *wzy* Genes. J. Clin. Microbiol., **41**, 2003, 3379-3383.
- 6) Wang L. et al. : Sequence of the *E. coli* O104 antigen gene cluster and identification of O104 specific genes. Gene, **270**, 2001, 231-236.