

宮城県内で検出された健康人由来大腸菌における 病原性関連遺伝子の保有状況調査

Pathogenesis-related Genes of *Escherichia coli* from Healthy Human Faces in Miyagi

中居 真代 宮崎 麻由 那須 務 佐藤 由紀 渡邊 節 沖村 容子
Masayo NAKAI, Mayu MIYAZAKI, Tutomu NASU,
Yuki SATO, Setsu WATANABE, Yoko OKIMURA

(要旨)

病原大腸菌による食中毒事件の多くは腸管出血性大腸菌(EHEC)によるものである。食中毒事件において大腸菌の検査は不可欠であるが、健康人から病原大腸菌の血清型別と一致するものが数多く検出され、検査結果に混乱をきたしている。近年、腸管上皮細胞への付着因子が病原性発現に重要な意味をもつという論文が報告されている。そこで腸管病原性大腸菌および腸管凝集接着性大腸菌の病原性関連遺伝子と考えられている *eaeA*, *bfpA*, *aggR*, *astA* 遺伝子について、これら因子の評価を目的に健康人 172 名の保有状況を調査した。その結果、EHEC 保菌者 25 名のうち 24 名が *eaeA* を保有しており、EHEC と *eaeA* に強い関連性が見られた。EHEC 以外の検体からは *eaeA* が 4 件、*astA* が 5 件検出された。不顕性感染者からの感染拡大、食中毒未然防止のために大腸菌保菌者の O 血清型にとらわれない病原因子を調査することの必要性を感じた。

キーワード：腸管出血性大腸菌；*eaeA* 遺伝子；健康人

Key words: EHEC; *eaeA* gene; Healthy Human

1 はじめに

病原大腸菌は発生の機序により、毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *E. coli*:ETEC)、腸管組織侵入性大腸菌(Enteroinvasive *E. coli*:EIEC)、腸管病原性大腸菌(Enteropathogenic *E. coli*:EPEC)、腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E. coli*:EHEC)、腸管凝集接着性大腸菌(Enteraggregative *E. coli*:EAggEC)の 5 つに大別される。

これらの大腸菌による食中毒事件は年間 30~40 件発生し、その多くは EHEC である¹⁾。ETEC、EIEC、EHEC は病原因子は明らかであるが、EPEC、EAggEC の病原性は明らかではない。食中毒事件において大腸菌の検査は不可欠であるが、健康人から分離される大腸菌も病原大腸菌の血清型別に一致するものが数多く検出され、検査結果に混乱をきたしている。近年、腸管上皮細胞への付着因子が病原性の発現に重要な意味をもつという論文²⁾⁻⁴⁾が報告されている。そこで EPEC の細胞局在付着性に関連する *eaeA*, *bfpA*, EAggEC の細胞凝集付着性に関連する *aggR*, EAggEC が産生する耐熱性毒素に参与する *astA* の 4 遺伝子について、健康人と EHEC 発症者の保有状況を比較し、これら因子の評価をする目的で調査した。

2 対象および検査方法

2.1 対象

2011 年 3 月から 11 月に、宮城県内で採取された 1 歳から 86 歳の健康人 172 名の糞便を検体とした。この研究における健康人とは、家族の中に EHEC の感染者がいるが本人には症状がない人(以下 EHEC 感染者家族等)160 名、食中毒事件時の非発症者(以下食中毒関係者)12 名をいう。対照として EHEC 発症者 20 名の糞便も検体とした。

2.2 方法

2.2.1 ETEC, EHEC の PCR スクリーニング

糞便を滅菌綿棒で採り mEC 培地(日水製薬)10ml に接種し、37℃ で一夜培養した。残りはシードスワブ 1 号(栄研化学)にグリセリンを 10% に加え -80℃ で保存した。この培養液 1ml から遠心分離によって集菌し滅菌蒸留水で 2 回洗浄したものを 95℃ 6 分加熱後、10,000rpm、1 分間遠心分離し上清をテンプレートとした。ベロ毒素(VT) 遺伝子、易熱性毒素(LT) 遺伝子および耐熱性毒素(ST) 遺伝子の検出用プライマーはおのこの EVC-1・EVC-2, ELT-1・ELT-2 および ESH-1・ESH-2(TAKARA)を用いた。テンプレートは puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (GE ヘルスケアバイオサイエンス)を使用して調製し、94℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 1 分(35 サイクル)の条件で増幅(Applied Biosystems 社製 2720 サーマルサイクラー)した。増幅後は電気泳動、エチジウムブロマイドで染色し、検出されたバンドを解析した。

表 1 使用したプライマーの塩基配列と増幅サイズ

対象	Name	Sequence(5'to3')	Product size(bp)
混合用プライマー			
EHEC	VT	EVC-1/2(TAKARA)	171
ETEC	LT	ELT-1/2(TAKARA)	263
	ST	ESH-1/2(TAKARA)	131
EPEC	eaeA	mSK1 eaekas_a	310
	bfpA	bfpAk_multi_S2 bfpAk_multi_A2	394
EAggEC	aggR	aggRk_multi_S4 aggRk_multi_A4	254
	astA	EAST-S1 EAST-AS2	109
単独用プライマー			
EHEC	VT1	EVT-1/2(TAKARA)	349
	VT2	EVS-1/2(TAKARA)	404
EPEC	eaeA	EA-1 EA-2	454
	bfpA	EP-1 EP-2	330
EAggEC	aggR	aggRks1 aggRks2	254
	astA	EASTOS1 EASTOAS2	109

2.2.2 EPEC, EAggEC のスクリーニング

付着に関する因子を特異的に検出する *eaeA*, *bfpA*, *aggR* と EAST を検出する *astA* のプライマーを用い、2.2.1 と同一のテンプレートを試料とし、94 30 秒、55 1 分、72 30 秒(30 サイクル)の条件でマルチプライマー-PCR を実施した。使用したプライマーは表 1 に示した。

2.2.3 PCR 陽性検体からの菌分離

スクリーニングで標的遺伝子が検出された場合、グリセリン加シードスワブ 1 号から直接 DHL 寒天培地(栄研化学)に画線塗抹した。37 で 24 時間培養し、発育したコロニーの中から大腸菌が疑われるものを 10~30 個鈎菌し、各々を 95 6 分加熱後、10,000rpm1 分遠心分離し上清をテンプレートとし PCR で当該遺伝子の保有の有無を調べた。大腸菌の同定には、TSI 寒天培地(栄研化学)、LIM 培地(栄研化学)を用いた。O 血清型別は病原大腸菌免疫血清 1 号セット(デンカ生研)を用い、スライド凝集法で行った。このセットで型別不能のものを OUT とした。H 血清型別はクレイギー管入り HI 半流動培地(自家調製)を 3~5 回通過させた後、病原大腸菌免疫血清 2 号セット(デンカ生研)を用い試験管凝集法で実施した。分離された大腸菌は表 1 に示した単独用プライマーを用いて PCR を実施し、再度保有病原遺伝子を確認した。VT 陽性検体では VT 型の確認も行った。

2.2.4 EHEC 発症者からの付着性関連遺伝子 PCR スクリーニング

対照実験として EHEC 発症者から分離された大腸菌

20 株の付着性関連遺伝子を表 1 にある混合用プライマーを使って 2.2.2 と同様の方法で PCR を実施した。

3 結果

3.1 PCR 陽性検体のスクリーニング結果

mEC からの PCR スクリーニング検査結果は、VT 陽性 27 件、*eaeA* 陽性 15 件、*bfpA* 陽性 1 件、*aggR* 陽性 3 件、*astA* 陽性 21 件であった(表 2)(重複を含む)。LT、ST 陽性検体はなかった。VT 陽性検体はすべて EHEC 感染者家族等からの検体で、食中毒関係者からの検体はなかった。

表 2 mEC からの病原遺伝子検出結果

病原遺伝子	全体	EHEC感染者家族等	食中毒関係者
total	172	160	12
VT	27	27	0
LT	0	0	0
ST	0	0	0
eaeA	15	14	1
bfpA	1	1	0
aggR	3	3	0
astA	21	20	1

3.2 分離菌株の病原遺伝子保有状況

EHEC 25 株、EPEC4 株、EAggEC5 株が分離できた。単独プライマーで再度保有病原遺伝子を確認したところ、EHEC では VT1 陽性が 16 株(O26:HNM 7 株、O26:H11 5 株、O55:H7 2 株、O103:H2 1 株、O103:H11 1 株)、VT2 陽性が 7 株(O121:H19 6 株、OUT:H21 1 株)、

VT1.2 陽性が2株(O157:H7 1株, O145:HNM 1株)であった。付着性関連遺伝子は *eaeA* のみが検出され EHEC25 株のうち 24 株に保有が認められた(表3)。EPEC は *eaeA* 陽性が4株(O86a:H6 1株, O142:H34 1株, O115:HUT 1株, OUT 1株)EAggEC では *astA* 陽性が5株(O20:H41 2株, O74:H6 1株, OUT 2株)であった。(表4)。

表3 EHEC 分離株の付着遺伝子保有状況

分離菌	分離数	VT型	付着遺伝子			
			<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>
O26:HNM	7	1	7			
O26:H11	5	1	5			
O55:H7	2	1	2			
O103:H2	1	1	1			
O103:H11	1	1	1			
O121:H19	6	2	6			
OUT:H21	1	2				
O157:H7	1	1,2	1			
O145:HNM	1	1,2	1			
計	25		24	0	0	0

表4 EPEC, EAggEC 分離株の付着遺伝子保有状況

分離株	分離数	付着遺伝子			
		<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>
EPEC O86a:H6	1	1			
O142:H34	1	1			
O115:HUT	1	1			
OUT	1	1			
EAggEC O20:H41	2				2
O74:H6	1				1
OUT	2				2
検出数	9	4	0	0	5

3.3 EHEC 発症者からの付着性関連遺伝子 PCR スクリーニングの結果

症状のある VT 陽性検体 20 件の付着因子は *eaeA* 19 件, *aggR* 1 件であった。(表5)

表5 EHEC 発症者の付着遺伝子保有状況

血清型	検体数	VT型	付着遺伝子			
			<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>
O26:H11	2	1	2			
O26:HNM	2	1	2			
O26:H51	1	1	1			
O91:HNM	1	1			1	
O103:H2	4	1	4			
O103:H11	1	1	1			
O55:H7	1	2	1			
O121:H19	3	2	3			
O157:H7	1	2	1			
O157:H7	4	1,2	4			
合計	20		19	0	1	0

4 考察とまとめ

本研究では病原遺伝子を検出する方法として mEC 増菌培地からマルチプレックス PCR でスクリーニングを実施後 陽性検体を直接塗抹することで菌分離を行った。その結果, 24 検体中 9 検体(37.5%)から菌分離ができ, 菌分離には本手法が効率的であると考えられた。しかし,

mEC からのテンプレート作成のため, エキストラバンドが多く出現した。今後プライマー設計や増幅条件を検討することが必要と感じた。

今回保有を確認した 4 遺伝子中 *eaeA*, *astA* 以外の *bfpA*, *aggR* は菌を分離することができず, VT 保有の有無にかかわらず, 比較することが出来なかった。

eaeA を保有するものは分離できた菌株中 EPEC, EAggEC では 44.4%(4/9)で, EHEC の 96%(24/25)より低かった。一方 *astA* は EHEC では保有が認められなかったが EPEC, EAggEC では 55.6%(5/9)の保有が認められた。

VT と *eaeA* の関連性は血清型 O26, O111, O157 及び O103 の VT 陽性株では症状の有無にかかわらず *eaeA* を保有していることが知られている^{4)~6)}。今回の結果もそれを裏付ける結果となった。さらに, これら以外の血清型の EHEC について調査したところ, O55, O121, O145 保菌者からも *eaeA* の保有状況が確認された。*eaeA* はインチミンが腸粘膜上皮細胞と結合する際に必要な遺伝子であり, VT 遺伝子はインチミンがなければ腸管内に定着できず腸管内を一過性を通り過ぎるのみであると考えられている⁶⁾。そのため VT の毒素, 病原性発現には *eaeA* が関与していると考えられている。しかし, 今回の研究では VT かつ *eaeA* を保有するが, 発症しないグループが認められた。2 つの因子が存在するが, なんらかの理由で症状が現れなかったと考えられ, VT かつ *eaeA* を保有する検体が病原性を発現するにはさらに別の因子の関与があるものと推察された。対照実験として, 症状がある EHEC について付着因子関連遺伝子の保有状況を調べたが, *aggR* 陽性が 1 件検出されたのを除き症状がない場合と同様の結果となり, 付着因子関連遺伝子と EHEC の発病についての因果関係を明らかにすることは出来なかった。

EPEC, EAggEC 陽性検体では付着因子関連遺伝子保有状況を他文献^{7)~11)}と比較したところ, 有意な差は認められなかった。今後, さらに他の因子などについても調査していく必要があると考える。

平成 20 年に給食従事者等の検便検査法が変わり, O157 等指定されていた数種の EHEC から, すべての VTEC 遺伝子をもつ大腸菌保菌者を陽性とする事になった¹²⁾。宮城県では平成 19 年までは年間 20 数の事例数であったものが, 平成 20 年以降には 60 事例を超え, 無症状の EHEC 感染者の存在が発症者の 2 倍以上であることがわかっている。不顕性感染者からの感染拡大, 食中毒未然防止のために, 大腸菌保菌者の O 血清型にとらわれない病原因子を調査していくことの必要性があると思われる。

2011 年にはドイツを中心に EU で 3,000 人以上が感染する O104:H4 感染症の大流行があった。原因菌は, EHEC と EAggEC の性状を持つ複合型の新型大腸菌であることが判明した^{13)~15)}。菌は常に変異し, 病原性も

変化している。今後も新たな病原因子を獲得した病原性大腸菌が出現する可能性もあり，検査に携わる者として注意を払っていく必要があると考える。

5 参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ：
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 2) Donnenberg MS, Kaper JB: Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992;60:3953-61
- 3) Beebakhee G, Louie M, De Azavedo J, Brunton J: Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol Letter* 1992;91:63-8
- 4) 小林一寛他：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：感染症学会誌第76巻第11号2002年
- 5) 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
- 6) 熊谷奈々子他：腸管出血性大腸菌 O121 感染事例からの考察：福島県衛生研究所年報 No.23 2005
- 7) 成松浩志他：健康人由来大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況調査：大分県衛生環境研究センター年報 第30号、47~52(2004)
- 8) 森屋一雄他：散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EAggEC) 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)
- 9) 加藤玲他：散発下痢症由来大腸菌の腸管病原性大腸菌の腸管病原性大腸菌 (EPEC) *eaeA* 遺伝子および腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) *aggR* 遺伝子保有状況とその病原性の評価：感染症誌, 76, 721-729(2002)
- 10) 倉園貴志：ヒトから分離される大腸菌の血清型とそれらにおける下痢原性遺伝子保有状況に関する研究：杏林医学会誌 35巻1号 20~30 2004年3月
- 11) 成松浩志他：大分県における下痢症由来大腸菌の病原性関連遺伝子の保有状況調査：大分県衛生環境研究センター年報, 29, 51-55(2001)
- 12) 平成20年6月18日付厚生労働省通知 食安発第0618005号
- 13) 村上光一ら：*eaeA* 遺伝子を検出した大腸菌 O20 による食中毒事例：第63回日本公衆衛生学会要旨集 P15-005
- 14) 野田裕之他：中学校で発生した腸管凝集性大腸菌 O44:H18 を原因とする食中毒事例：山梨衛公研年報 第51号 2007年
- 15) 非典型的病原血清型大腸菌 (OUT:HNM) が主因と推定された食中毒事例 (IASR Vol.33 p8-9:2012年1月号)