

## 京都府内で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 株の クレード解析に関する調査

浅井 紀夫 中嶋 智子 杉浦 伸明  
柳瀬 杉夫 伊豫田 淳\*

### Surveillance of Genetic Clades of *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from People in Kyoto Prefecture.

Norio ASAI Satoko NAKAJIMA Nobuaki SUGIURA Sugio YANASE Sunao IYODA\*

1998年から2006年までに京都府内で分離され、感染者の症状が把握された腸管出血性大腸菌 O157:H7 保存株のうち、発生事例ごとに1株を選択し、75株についてMAMA-PCR法を用いたクレード解析を行った。クレード1、クレード2またはクレード3のいずれかに属する株が68株、感染すると溶血性尿毒症症候群（HUS）等の重篤症状を発症する恐れが高いと予測されているクレード8に属する株は7株で全体の9%であった。一方、HUSを発症、あるいは入院の重症状を呈した感染者の株では、4株中2株がクレード8に属していた。さらに、この株の感染者はそれぞれ15歳および40歳であり、比較的抵抗力の高いと予想される年齢であった。

キーワード：腸管出血性大腸菌 O157、クレード解析、MAMA-PCR法、溶血性尿毒症症候群

key words：Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Genetic differentiation of clade, MAMA-PCR method, Hemolytic uremic syndrome

### はじめに

2006年に米国で生食用ホウレンソウに関連した腸管出血性大腸菌 O157:H7 集団食中毒事例が発生した。溶血性尿毒症症候群（HUS）の発症率が従来の集団発生事例と比較して高いことから、Manning et al.<sup>1)</sup> は96遺伝子の塩基配列に基づくDNA型別解析を行い、菌株がクレード1からクレード9のいずれの遺伝子系列に属するかを検討した結果、当該菌株はクレード8に属することがわかった。これは過去に米国で発生したいずれの集団株とも異なる遺伝子系列であった。クレード8が特異な遺伝子系列であることに注目した伊豫田ら<sup>2)</sup> は、クレード8とそれ以外とを鑑別するMAMA-PCR (mismatch amplification mutation assay)法を確立した。これは、クレード1、クレード2またはクレード3のいずれか（以下「クレード1-3」という。）に属する株を特異的に検出するプライマー、およびクレード8に属する株を特異的に検出するプライマーを用いてそれぞれPCRを行うことにより、菌株をクレード1-3に属する株、クレード8に属する株、およびクレード4、クレード5、クレード6、クレード7およびクレード9のいずれかに属する株に分類する方法である。この方法を用いて国内で分離されたO157:H7、243株について解析した結果、HUS患者由来株が有意に高率でクレード8に属することを見出したが、クレード8に属する株が高病原性であるかを判断するためには、系統ごと

の病原性についての解析が待たれると結論している<sup>2)</sup>。

MAMA-PCR法は簡易な手法であり、感染者の予後の早期診断に応用できる期待が大きい。そこで、1997年から2005年に京都府内で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7、75株についてMAMA-PCR法によるクレード解析を検討した。

### 材料と方法

#### 1. 解析したO157株

当所で卵培地上に冷蔵保存された腸管出血性大腸菌 O157:H7 株を用いた。発生事例ごとに1株を選択した。最初に報告された感染者の分離株を用い、該当の菌株を入手できなかった場合や保存中に菌が死滅した場合には、2番目に分離された感染者株を用いた。

卵培地にBrain Heart Infusion Broth (Becton Dickinson 製) 3mLを滴下し、36℃、24時間培養し、一白金耳をTryptic Soy Agar (Becton Dickinson 製) に画線塗抹し、36℃、24時間培養し、生成したコロニーからDNAを抽出した。

#### 2. クレード解析

以下の手法でMAMA-PCR法を行った。

##### 2-1. Template DNAの作製

1μLプラスチックチューブでコロニーを極微量掻き取り、遺伝子用蒸留水50μLに懸濁し、98℃10分間加熱し、10,000×gで1分間遠心した上清をTemplate DNAとした。

(平成23年7月31日受理)

\*国立感染症研究所

\*National Institute of Infectious Diseases

表 1. クレード解析に使用したプライマーのシーケンス<sup>2)</sup>

2357-F3 (共通)	5'-GAAGTGTGCGATCTGTCAGAA-3'
539A-R (クレード 8 専用)	5'-AAGAGCGTTTTCCAGTGGCTCTT-3'
539C-R (クレード 1-3 専用)	5'-CAGAGCGTTTTCCAGTGGCTCTG-3'

## 2-2. 使用プライマー

表1に示したシーケンスのプライマーを合成(Sigma製)して用いた。クレード1-3解析用には2357-F3及び539C-Rを、クレード8解析用には2357-F3及び539A-Rを用いた。

## 2-3. PCR

反応試薬は2.0 µLの10 × PCR buffer (TAKARA製)、1.6 µLのMgCl<sub>2</sub>(TAKARA製)、2.0 µLのdNTPs(TAKARA製)、0.1 µLのEXTaq (TAKARA製) および1.0 µLの各primerを混合し、遺伝子用蒸留水で17.0 µLにメスアップしたものにTemplate DNAを3.0 µL加えた後、30 µLのミネラルオイル (Sigma製)を重層し、これをTAKARA PCR Thermal cycler 480 (TAKARA製)を用い、94℃2分の熱処理後、熱変性95℃30秒、アニーリング65℃20秒、伸長72℃30秒からなる増幅反応を20サイクル行い、72℃5分の最終伸長の条件でPCRを行った。

## 2-4. 電気泳動

増幅産物を1.5%アガロースゲル(Agarose-1, Dojindo製)で電気泳動(100V、60分)し、エチジウムブロマイド染色後、UV照射下で220bpの位置におけるバンドの有無を確認した。

## 3. 感染者情報

感染者年齢および感染者症状については担当保健所から提供を受けた。

## 結果と考察

クレード解析の結果を事例発生年、事例発生地(管轄保健所名で表記)、感染者年齢、感染者症状および菌毒素型とともに表2に示す。クレード1-3株は65株、クレード8株は7株であり、その他のクレードに属する株はなかった。

感染者症状と感染者数との関係および感染者年齢と感染者数との関係をクレード1-3株およびクレード8株についてそれぞれ図1および図2に示す。感染者症状は無症状、下痢、血便および「HUSあるいは入院」の4段階に区分した。下痢は軟便、水様便等を含み「HUSあるいは入院」はHUS症状を呈した場合、あるいは重篤症状のため入院した場合を示す。感染者年齢は病原微生物検出

情報<sup>3)</sup>の区分を参考に、0-4歳、5-9歳、10-14歳、15-59歳および60歳以上に区分した。

クレード1-3株の68株中では無症状5株および下痢が40株であり、無症状あるいは比較的軽症者と予想される感染者はクレード1-3株全体の66%を占めた。血便が21株で全体の31%となり、「HUSあるいは入院」は2株であり3%であった。一方、クレード8株の7株中、無症状は1株、下痢は2株で、合わせるとクレード8株全体の43%となり、クレード1-3株と比較すると低い割合となった。血便が2株、「HUSあるいは入院」は2株であった。また、「HUSあるいは入院」はクレード1-3株では9歳未満でのみ見られたが、クレード8株では15歳と40歳であった。

古宮ら<sup>4)</sup>によると通常、HUS発症は有症者の3~4%であり、0~4歳が最も多い。本調査においても、クレード1-3株の結果と概ね一致する。一方、クレード8株の7例については「HUSあるいは入院」の割合が約30%も占め、感染すると通常のO157感染による予後より重篤な症状を呈する傾向が伺えた。さらに「HUSあるいは入院」の2例が比較的抵抗力の高いと予想される15-59歳での発症であったことからクレード8株の病原性は高い可能性が推測できる。

クレード8株の事例は京都府北部地域である中丹西保健所管内に1事例、京都府中部地域である南丹保健所管内に2事例、および京都府南部地域である乙訓保健所および山城北保健所管内に4事例発生した。また、事例発生年別では2001年に2事例、2003年に3事例、2004年に1事例および2005年に1事例であった。したがって、クレード8株が特定の地域および特定の時期にのみ流行した株ではないと推測される。1998年、1999年および2000年でのクレード8株の検出はなかったが、1998年、1999年はそれぞれ、1株および2株のみしか集計しておらず、2000年以前に京都府で発生した可能性については不明である。

クレード1-3株ではStx1およびStx2産生株が51株(78%)、Stx2単独産生株が17株(22%)また、Stx1単独産生株はなかった。クレード8株の7例についてはStx1およびStx2産生株が1株、Stx2単独産生株が6株、Stx1単独産生株はなく、Stx2のみ産生する株が多かった。

Boerlin et al.<sup>5)</sup>は感染者の重症化にはStx2が大きな要素の一つであることを報告している。本調査の結果でもクレード8株とStx2の関連がみられ、Stx1よりStx2がより症状に影響を与えている可能性が予測される。

腸管出血性大腸菌感染症はHUS等重篤な症状を呈する場合がある。厚生労働省によると\*1、感染発症の早期を過ぎ、症状が重篤化した場合には抗生剤の使用に注意が必要であり、治療が困難になることもあるため、早期発見、早期治療の重要性を警鐘している。MAMA-PCR法は通常のサーマルサイクラーがあれば実施可能で、PCR反

\* 1: 厚生省生活衛生局. 1998. 腸管出血性大腸菌感染症. 食中毒予防必携, pp122-129, 社団法人日本食品衛生協会, 東京.

表 2. 事例情報、患者情報および分離された O157:H7 の毒素型別およびクレード解析結果

No	事例発生年	事例発生地 (管轄保健所)	感染者年齢 (歳)	感染者症状	菌毒素型	クレード解析結果
1	1998	南丹	9	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
2	1999	乙訓	22	下痢、発熱	Stx2	1-3
3	1999	山城北	10	下痢	Stx1+Stx2	1-3
4	2000	南丹	2	下痢、軽症	Stx1+Stx2	1-3
5	2000	山城北	21	下痢	Stx1+Stx2	1-3
6	2000	中丹西	61	無症状	Stx1+Stx2	1-3
7	2000	中丹東	27	下痢	Stx2	1-3
8	2000	中丹東	74	下痢、嘔吐	Stx2	1-3
9	2000	中丹西	8	下痢	Stx1+Stx2	1-3
10	2000	南丹	6	下痢	Stx1+Stx2	1-3
11	2000	南丹	5	下痢	Stx1+Stx2	1-3
12	2001	山城北	29	下痢、嘔吐	Stx2	1-3
13	2001	乙訓	18	下痢、血便	Stx2	1-3
14	2001	乙訓	21	下痢	Stx2	1-3
15	2001	山城北	40	下痢	Stx1+Stx2	1-3
16	2001	山城北	12	血便	Stx1+Stx2	1-3
17	2001	南丹	2	血便	Stx1+Stx2	1-3
18	2001	山城北	51	下痢	Stx1+Stx2	1-3
19	2001	中丹西	58	下痢	Stx1+Stx2	1-3
20	2001	中丹西	79	血便	Stx1+Stx2	1-3
21	2002	中丹西	2	血便	Stx1+Stx2	1-3
22	2002	乙訓	20	下痢	Stx1+Stx2	1-3
23	2002	南丹	4	下痢	Stx1+Stx2	1-3
24	2002	乙訓	24	下痢	Stx1+Stx2	1-3
25	2002	山城南	5	下痢、血便、HUS、入院	Stx2	1-3
26	2002	南丹	31	下痢	Stx1+Stx2	1-3
27	2002	南丹	3	下痢	Stx1+Stx2	1-3
28	2002	南丹	5	下痢	Stx1+Stx2	1-3
29	2003	山城南	3	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
30	2003	山城北	14	下痢	Stx2	1-3
31	2003	中丹東	2	血便	Stx2	1-3
32	2003	山城北	18	下痢	Stx1+Stx2	1-3
33	2003	山城北	12	下痢	Stx1+Stx2	1-3
34	2003	南丹	27	下痢	Stx1+Stx2	1-3
35	2003	山城北	23	下痢、発熱	Stx2	1-3
36	2003	山城北	2	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
37	2003	山城南	15	下痢	Stx2	1-3
38	2003	山城南	3	無症状	Stx1+Stx2	1-3
39	2003	南丹	2	血便	Stx1+Stx2	1-3
40	2003	山城南	10	下痢	Stx2	1-3
41	2003	南丹	4	無症状	Stx1+Stx2	1-3
42	2003	丹後	12	血便	Stx1+Stx2	1-3
43	2004	中丹西	62	下痢	Stx1+Stx2	1-3
44	2004	南丹	11	下痢	Stx1+Stx2	1-3
45	2004	南丹	3	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
46	2004	中丹東	63	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
47	2004	中丹東	73	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
48	2004	丹後	8	下痢	Stx1+Stx2	1-3
49	2004	南丹	7	下痢、吐き気	Stx1+Stx2	1-3
50	2004	中丹東	50	下痢	Stx2	1-3
51	2004	南丹	2	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
52	2005	南丹	2	下痢	Stx1+Stx2	1-3
53	2005	南丹	2	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
54	2005	南丹	1	下痢	Stx1+Stx2	1-3
55	2005	南丹	38	下痢	Stx1+Stx2	1-3
56	2005	南丹	9	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
57	2005	丹後	71	下痢、血便	Stx2	1-3
58	2005	南丹	34	無症状	Stx1+Stx2	1-3
59	2005	山城北	57	血便	Stx1+Stx2	1-3
60	2005	山城北	44	下痢、血便	Stx1+Stx2	1-3
61	2005	山城北	18	下痢	Stx1+Stx2	1-3
62	2005	山城北	20	下痢	Stx1+Stx2	1-3
63	2006	山城南	2	下痢	Stx2	1-3
64	2006	山城南	2	下痢	Stx2	1-3
65	2006	南丹	3	血便	Stx1+Stx2	1-3
66	2006	山城北	3	下痢、血便、HUS、急性腎不全	Stx1+Stx2	1-3
67	2006	南丹	21	下痢	Stx2	1-3
68	2006	山城北	19	無症状	Stx1+Stx2	1-3
69	2001	中丹西	64	血便	Stx2	8
70	2001	山城南	15	血便、入院	Stx2	8
71	2003	南丹	61	下痢、血便、発熱	Stx2	8
72	2003	南丹	64	無症状	Stx2	8
73	2003	乙訓	4	下痢	Stx2	8
74	2004	乙訓	40	下痢、血便、発熱、入院	Stx1+Stx2	8
75	2005	山城北	26	下痢	Stx2	8

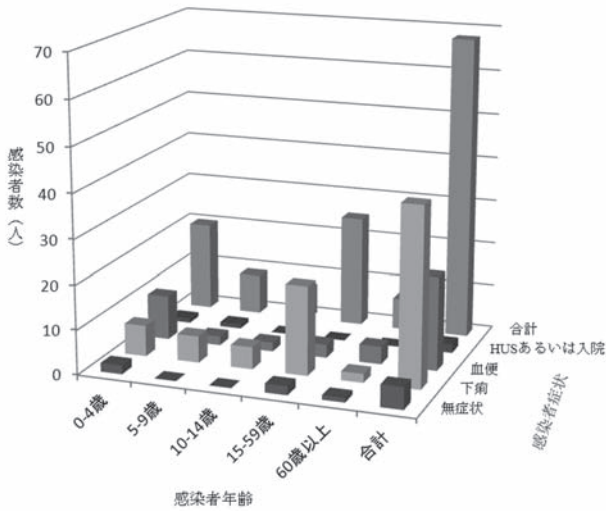


図1. クレイド1-3株における感染者症状と感染者数との関係および感染者年齢と感染者数との関係

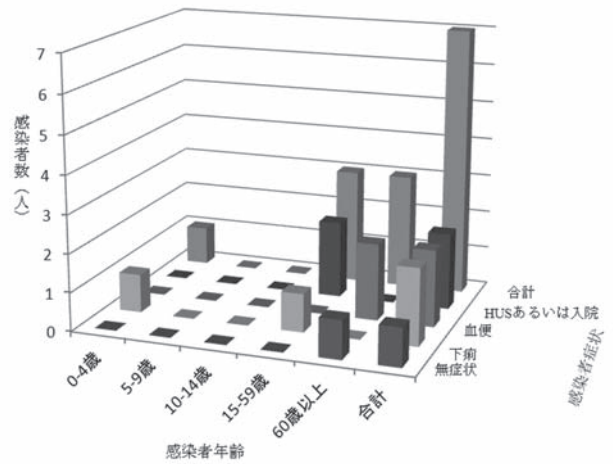


図2. クレイド8株における感染者症状と感染者数との関係および感染者年齢と感染者数

応時間も約1.5時間である。感染者の予後診断に優れた知見を与える方法として期待できると考えられる。

集団発生株が混在すると解析結果に混乱を招く恐れがあるので、本報では1事例につき1株のクレイド解析を実施した。しかし、Diffuse outbreak株や株の変異も正確な解析に影響を与える可能性がある。本報では現在まで解析した結果の傾向を述べるに留め、今後、解析数を増加し、IS-printing system等の分子疫学的手法を併用した検討を行い、次報以下詳しく報告する。

### 謝 辞

本研究にあたり感染者情報を提供していただいた京都府保健所関係者各位様に深謝いたします。

### 引用文献

- 1) Manning D.S., Motiwala S.A., Springman C.A., Qi W., Lacher W. D., Ouellette M.L., Mladonicky M.J., Somsel P., Rudrik T.J., Dietrich E.S., Zhang W., Swaminathan B., Alland D., and Whittam S.T. 2008. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 4868-4873.
- 2) 伊豫田淳, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 渡邊治雄. 2009. 日本国内における腸管出血性大腸菌感染症の現況と分離株の性状. 獣医畜産新報, 62, 801-806.
- 3) 寺嶋淳, 伊豫田淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎, 石原朋子, 大西真. 2011. <特集>腸管出血性大腸菌感染症 2011年4月現在. 病原微生物検出情報(月報) 32, 125-126.
- 4) 古宮伸洋, 古宮伸洋, 富岡鉄平, 齊藤剛仁, 鳥田智恵, 砂川富正, 多田有希. 2010. 感染症発生动向調査からみた腸管出血性大腸菌感染症における溶血性尿毒症症候群, 2009年. 病原微生物検出情報(月報) 31, 170-172.
- 5) Boerlin P., McEwen A.S., Boerlin-Petzold F., Wilson B. J., Johnson P. R., and Gyles L. C. 1999. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. Journal of Clinical Microbiology, 37, 497-503.