

鳥取県における1997年の腸管出血性大腸菌O26の分離状況

【微生物科】

戎谷 佐知子 ・ 田中 さゆり ・ 川本 歩
木村 義明 ・ 太田垣 公利

Characterization and Genotypic Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Isolated in Tottori prefecture in 1997

Sachiko EBISUTANI, Sayuri TANAKA, Ayumi KAWAMOTO
Yosiaki KIMURA, Kimitosi OOTAGAKI

Abstract

For the examination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26 isolated in Tottori prefecture, we tested 17 strains. 9 of the 17 strains isolated from patients with diarrhea were Sigatoxin positive, *eaeA* positive and did not have Rhamnose-decomposition. 8 of the 17 strains were Sigatoxin negative. Among them, 6 strains had Rhamnose-decomposition. 9 EHEC O26 strains isolated from 3 cases were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). DNA fragment patterns digested by Xba I were the same in the same cases, but there were some different patterns in 3 cases. It is suggested that the 3 cases were not due to a common source of infection.

1 はじめに

鳥取県における1997年の腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症の発生は、4～10月に限られていたが、中でも9月に多発した (16/28株)。国内においては、毎月のようにEHECの検出報告があるが、特に7～9月には多くの報告がみられた¹⁾。

また、鳥取県において最も多く検出されたEHECの血清型は、O157:H7 (14/28株)であり、次いでO26:H11/— (9/28株)であった。全国で比較しても同じような状況がみられる。EHEC O157については、ソルビトールの分解能が判別性状の一部となっているが、O26については、ラムノースの分解能が判別性状となるという

報告がある²⁾。

そこで、1997年に鳥取県で発生したEHEC O26感染症について、患者発生状況、患者由来株のラムノース分解能、志賀毒素 (Stx) 遺伝子保有状況、*eaeA*遺伝子保有状況を調査し、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) による遺伝子解析を行ったので報告する。

2 供試菌株

1997年4月～1998年3月の間に鳥取県内でEHEC患者または保菌者から検出されたEHEC O26 9株を用いた。また、対照として当所保存菌株のうちEHEC以外の*E. coli* O26 8株を用いた (表1)。

表1 供試菌株の概要

No.	分離年月	由来	血清型	毒素型	備考
1	1997年5月	M 9歳	O26:H-	Stx 1, 2	患者
2	1997年8月	F 5歳	O26:H11	Stx 1	患者
3	1997年9月	M 1歳	O26:H11	Stx 1	No.2の家族
4	1997年9月	M 1歳11ヶ月	O26:H11	Stx 1	患者
5	1997年9月	F 1歳	O26:H11	Stx 1	No.4と同一保育園
6	1997年9月	F 1歳	O26:H11	Stx 1	No.4と同一保育園
7	1997年9月	性別 年齢不明	O26:H11	Stx 1	No.4と同一保育園
8	1997年9月	性別 年齢不明	O26:H11	Stx 1	No.4と同一保育園
9	1997年9月	性別 年齢不明	O26:H11	Stx 1	No.4と同一保育園
10	1990年11月	F 年齢不明	O26:H17	-	
11	1993年10月	M 年齢不明	O26:H42	-	
12	1994年6月	F 年齢不明	O26:H-	-	
13	1994年9月	性別 年齢不明	O26:H20	-	
14	1997年9月	F 年齢不明	O26:H-	-	
15	1997年9月	M 年齢不明	O26:H-	-	
16	1997年9月	M 年齢不明	O26:H11	-	
17	1997年5月	M 年齢不明	O26:H7	-	

3 方 法

(1) ラムノースの分解能

アンドレードペプトン水にラムノース（和光純薬）を1%に加え、37℃、7日間観察後、判定を行った。

(2) Stx遺伝子保有状況

PCR法により遺伝子の検出を行った。プライマーは、VT1、VT2 遺伝子検出用プライマーセット（TaKaRa）を使用した。

(3) *eaeA*遺伝子保有状況

PCR法により、腸管のAE病変形成に関与する外膜蛋白質をコードしている*eaeA*遺伝子の検出を行った。プライマーは、

*eae*k1 5' -GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT-3' と

*eae*k4 5' -TCGCCGTTTCAGAGATOGC-3' とを用いた³⁾。

(4) PFGEによる解析

国立感染症研究所の方法により実施した。すな

わち、供試菌株のうちEHEC O26 9株をHI寒天平板で37℃、24時間培養後、200 μ lの滅菌蒸留水で菌液の濃度がMcFarland 1程度となるようサスペンドした。その後、1% Low Melt Agarose (Bio Rad) を200 μ l加えて混合し、プラグモールド (Bio Rad) に流し込み、ゲルブロックを作製した。ゲルブロックに37℃、3時間のlysozyme (SIGMA) 処理と50℃、overnightのproteinase K (Boehringer Mannheim) 処理とを行った。次に、1mM PMSF (Molecular Probes Inc.) を含むTE bufferで50℃、30分の振とう処理を2回行った後、PMSFを含まないTE bufferにかえ、氷上で30分の振とう処理を行い、制限酵素 Xba I (TaKaRa) を含むbufferで37℃、overnightの振とう処理を行った。そして、1% PFGE certified agaroseを用いてBio Rad CHEF DR IIIによるパルスフィールド電気泳動を行った。泳動条件は、200V定電圧、4to8 sec (linear ramp) 12時間、8to50 sec (linear ramp) 10時間とし、泳動中の緩衝液の温度は12℃に設定した。

泳動後、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイドで染色し、DNA断片を観察した。

4 結 果

(1) ラムノースの分解能

EHEC O26 9株すべてがラムノースを分解しなかった。また対照菌株である*E. coli* O26 8株のうち2株は、ラムノースを分解しなかった(表2)。

(2) Stx遺伝子保有状況

EHEC O26 9株すべてがStx遺伝子を保有していた。また対照菌株である*E. coli* O26 8株は

Stx遺伝子を保有していなかった(表1, 2)。

(3) *eaeA*遺伝子保有状況

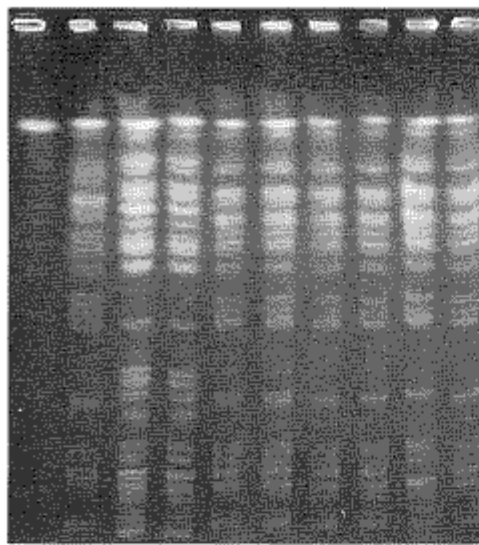
EHEC O26 9株すべてが*eaeA*遺伝子を保有していた。また対照菌株である*E. coli* O26 8株のうち5株が*eaeA*遺伝子を保有していた(表2)。

(4) PFGEによる解析

EHEC O26 9株(No. 1~9, 表2)について行ったところ、3事例において3種類のDNAパターンが認められた。また、2事例(No. 2, 3およびNo. 4~9)において分離された複数の菌株は、事例ごとに同一のDNAパターンを示した(表2, 図1)。

表2 供試菌株のラムノース分解能、*eaeA*遺伝子保有状況とPFGEによるDNAパターン

No.	血清型	ラムノース分解能	毒素型	<i>eaeA</i> 遺伝子	DNAパターン
1	O26:H-	-	Stx 1,2	+	A
2	O26:H11	-	Stx 1	+	B
3	O26:H11	-	Stx 1	+	B
4	O26:H11	-	Stx 1	+	C
5	O26:H11	-	Stx 1	+	C
6	O26:H11	-	Stx 1	+	C
7	O26:H11	-	Stx 1	+	C
8	O26:H11	-	Stx 1	+	C
9	O26:H11	-	Stx 1	+	C
10	O26:H17	+	-	+	-
11	O26:H42	+	-	-	-
12	O26:H-	+	-	+	-
13	O26:H20	+	-	-	-
14	O26:H-	-	-	+	-
15	O26:H-	+	-	+	-
16	O26:H11	-	-	+	-
17	O26:H7	+	-	-	-



M No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9
(M: 分子量マーカー)

図1 EHEC O26のPFGE像

5 考 察

今回、1997年に鳥取県で発生したEHEC O26感染症由来株9株のラムノース分解能と*eaeA*遺伝子保有状況を調査したところ、すべてがラムノース非分解で*eaeA*遺伝子を保有していた。対照として用いたEHEC以外の*E. coli* O26 8株では、2株がラムノース非分解であった。すなわち、*E. coli* O26についてはラムノースが非分解であれば、EHECの可能性が高くなるという結果であり、このことは文献2)の結果と一致する。疑陽性としてラムノース非分解のEHEC以外の*E. coli* O26が検出される可能性があるが、血清型O26によるEHEC感染症が発生したときのスクリーニング法としてラムノース分解能は役立つと考えられる。

また*eaeA*遺伝子は、腸管壁に付着し、微絨毛の消失、上皮細胞の変性、壊死などのAE病変形

成に関与する病原因子であり、腸管病原性大腸菌や多くのEHECが保有している⁴⁾。EHEC O26 9株は*eaeA*遺伝子を保有していたので、これが下痢症状の原因の一つであったと考えられる。

次に、EHEC O26 9株についてPFGEによる解析を行ったところ、3事例において3種類のDNAパターンが認められ、感染源は事例ごとに異なっていたと考えられた。また、2事例において分離された複数の菌株は、事例ごとに同一のDNAパターンを示したので、各事例における感染源は同一であると考えられた。

6 ま と め

- (1) 1997年に鳥取県で発生したEHEC O26感染症由来株9株は、ラムノース非分解で、*eaeA*遺伝子を保有していた。
- (2) 3事例における感染源は、事例ごとに異なっていると考えられた。
- (3) 2事例において分離された複数の菌株は、事例ごとに同一のDNAパターンを示した。

参 考 文 献

- 1) 病原微生物検出情報, 19, p.122~124 (1998).
- 2) 平成9年度厚生科学特別研究事業 地方衛生研究所の調査研究機能の強化に関する研究 研究報告書p.91~99.
- 3) 中澤宗生, 伊藤健一郎: ウシ由来ペロ毒素産生性大腸菌の幼若ウサギ感染実験, 感染症学雑誌, 69, p.772~776 (1995).
- 4) 塚本定三, 河合高生: 下痢症から分離した大腸菌の*eae*遺伝子と細胞付着性および血清型について, 感染症学雑誌, 69, p.85~90 (1995).