

(2) ウシ及びヒト由来 O157 株における病原遺伝子の保有状況なら  
びに志賀毒素産生とファージ関連遺伝子との相関性について

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 はウシから多数分離されるが、それらがどの程度、ヒトへの感染源となっているかについては明らかではない。本研究では、はじめに O157 における主要な病原遺伝子 (*eaeA*, *EhxA*, *espP*, *katP*) の保有状況を調査することで、その可能性について検討した。ウシ、食品およびヒト由来株として 129 株、36 株および 66 株を供したところ、由来間の保有率に有意な差異は認められなかったが、検出された *eaeA* はいずれも  $\gamma$  型を示し、血清型 O157 における共通性が示された。

一方、志賀毒素遺伝子型別を行ったところ、ウシ由来株では *stx2c* 保有株が全体の 69.8% を占め、ヒト由来株の 30.3% に比べ明らかに高い値を示した。また、各由来株の毒素産生について比較した。Stx1 では、ヒト由来株はいずれも高値を示したが、ウシ由来株では多様な分布を示した。また、Stx2 の産生パターンは、ヒト由来株の中で集団事例由来株はいずれも高値を示したが、散发事例由来株およびウシ由来株では多様であった。ウシ由来株における Stx2 発現のエフェクターである、ファージ遺伝子の分布を明らかにしたところ、*Q* 遺伝子に毒素産生との相関性が認められ、毒素型別ならびに毒素産生マーカーとしての有用性が示唆された。

協力研究者

帯広畜産大学	牧野壮一
国立医薬品食品衛生研究所	山本茂貴
動物衛生研究所	中澤宗生

## A. 研究目的

ヒトの STEC 感染症は、主に糞便に汚染された食肉、未殺菌乳、野菜、水およびジュース等が原因となって引き起こされていることからウシを中心とした家畜についての調査が進められ、様々な動物より多くの血清型が分離されている。ヒトと異なり、本菌はウシに感染しても症状を呈さないため、これらは健康保菌動物として、ヒトへの感染伝播を果たしていると考えられている。実際にこうした調査によって 3 割近いウシが STEC を保持していることも報告されており、家畜を中心とした各種動物がヒトへの STEC 感染に関与していることは確かである。しかしながら、先の報告にあるとおり、ウシより分離される O157 菌株の多くは Stx2c 単独産生性であり、下痢などの症状を呈したヒト患者由来株に比べると、ウシのみがヒトへの感染源であるとはいえず、ウシ由来株の保有する O157 株の全てがヒトに感染性を有するかについても明らかな証拠はないのが現状である。

O157 以外の血清型に属する STEC 株の毒素産生性については詳細に検討されており、ウシ由来 STEC 株の中にはヒト由来株、特に HUS を発症した患者由来 STEC 株に比べ、有意に低い値を示す株が多数存在している。このことは、ウシの保有する O157 の多様性を物語っており、ウシからの O157 汚染拡大を予防する意味からも、本菌の制

御をどのように行うべきかという食品衛生へ疫学的な見地から科学的根拠を確立する必要があるといえる。

本研究ではウシより分離された STEC O157 菌株の各種病原因子の保有状況を明らかにすることで、菌株間の遺伝的関連性について検討した。更に、ウシおよびヒト由来株について毒素産生性について比較するとともに、毒素遺伝子の発現に関与する関連因子との相関性について考察した。これにより、それぞれの保有する病原性についての評価を行い、リスク評価を行うための基礎資料とすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 菌株ならびに培地

本研究には、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 血清型 O157 に属するウシ由来 (129 株)、食肉由来株 (36 株)、ヒト由来株 (66 株、うち食中毒事例由来 (3 事例) より計 12 株含) を供した (表 1)。これら分離株の血清型の確認は、市販抗血清 (デンカ生研) を用いたスライド凝集反応により必要に応じて行った。

### 2. DNA 精製

L-broth 培養菌体より、QIAGEN DNA tissue kit (キアゲン) を用いて全 DNA を抽出し、PCR 鑄型サンプルとした。

### 3. PCR 法による病原遺伝子の検出

代表的な病原因子として知られている病

原遺伝子の保有状況について明らかにするため、*eaeA*, *ehxA*, *espP*, *katP*, *stx* 各遺伝子に対して特異的なプライマーセットを用い、PCRを行った。PCR反応溶液は、鋳型DNA 1 ul に対して、プライマー(20 pmol) 1 ul, 10 x Ex Taq buffer 2.5 ul, dNTP 2 ul, Ex Taq 0.25 ul (タカラバイオ)を添加し、滅菌再蒸留水(DDW)で計 25 ul に調整した。

### 3. Stx 産生量の比較

分離菌株の Stx1 および Stx2 の定量については、Syncase broth 一夜培養液を L-broth 5ml 中で OD<sub>600</sub> = 0.6 となるまで培養した。その後、最終濃度 200 ng/ml となるようにマイトマイシン C(和光純薬)を添加し、37°C にて 3 時間振とう培養後、超音波処理を行い、上清を Stx 測定用サンプルとした。測定には、逆受身ラテックス凝集反応法(VTEC-RPLA、デンカ生検)を用いた。

## C. 研究結果

### 1. 病原遺伝子群の保有状況

ヒト及びウシ由来 O157 株において、腸管上皮細胞への付着に関連する *eaeA* 遺伝子は 2 株のウシ由来株を除いては全てが保有しており、いずれも  $\gamma$  型であった(表 1)。また、病原性プラスミド pO157 上に座位する *EhxA* 遺伝子はウシ由来株 4 株、ヒト由来株 3 株をのぞいて、全てに共通に認められた。同じくプラスミド性の *katP* 遺伝子については、ヒト由来株では保菌者由来の 2 株を

除いて保有していたが、ウシ由来株では 4 株が陰性であったことに加え、異なるサイズの DNA 断片が増幅されるケースが 5 株で認められた(表 1)。*katP* 陰性であった保菌者由来の 2 株は、*espP* 遺伝子も陰性であったが、そのほかの株は *espP* 遺伝子を共通に保有していた。

2. 志賀毒素および関連因子の遺伝子型 PCR 法により、ウシ、ヒト、食肉およびその他食品由来株の *stx* 遺伝子型別を行った。結果として、ウシ由来株(129 株)では、*stx1* (+) が 6 株(4.7%)、*stx1* (+) および *stx2* (+) が 36 株(27.9%)、*stx2* (+) が 74 株(57.4%)、*stx* (-) が 3 株(2.3%)、食肉由来 26 株の内訳は、*stx1* + *stx2* が 9 株(34.6%)、*stx2* が 13 株(50.0%)であり、このうち食中毒事例由来 2 株はいずれも *stx1* + *stx2* であった。一方、ヒト由来株(66 株)の内訳は、*stx1* + *stx2* が 35 株(53.0%)、*stx2* が 28 株(42.4%)、*stx* (-) が 1 株(1.5%) であった(表 2)。また、食肉を除いた食品由来 10 株(レタス、和風キムチ、カブ浅漬、イクラ、菓子、黄金焼)のうち、8 株は *stx1* + *stx2* 株であったことから、ウシ以外からの感染ルートが優勢であることが推察された。

更に、*stx2* については変異型の型別を行った。ウシ由来株では、*stx1* + *stx2* を示す 36 株のうち、*stx2c* 陽性となったものが計 21 株(58.3%)を占め、*stx2* 単独産生株(65 株)においても、50 株(76.9%)を占めていた

(表 2)。食肉由来株では、*stx1*, *stx2* 両産生を示す 10 株のうち、3 株 (30.0%)、*stx2* 単独産生株 (13 株) では、9 株 (69.2%) が *stx2c* 型に分類された。一方、ヒト由来株における *stx2c* の割合は、*stx1*, *stx2* 両産生性では 35 株中 8 株 (22.9%)、*stx2* 単独産生株では 22 株中 6 株 (27.3%) と明らかに低い値を示した(表 2)。これらのことから、ヒト由来株の中でも特に *stx1* + *stx2* 産生性の株については、ウシに由来する可能性は低いと推察された。

### 3. Stx 産生の比較解析

ファージ誘導因子であるマイトマイシンは、Stx ファージの溶原化を引き起こし、結果として Stx 産生を促すことが知られている<sup>17)</sup>。本研究では、O157 の *in vivo* における病態を知るために、マイトマイシン C によるファージ誘導を行い、各由来株における Stx 産生の比較を行った。

ラテックス凝集反応により、ウシならびにヒト由来代表株の Stx 産生について検討したところ、Stx1 については、ヒト由来株はいずれも高い産生 (1:128) を示していたのに対し、ウシ由来および食肉由来株では、1:0~1:128 と多様であった(図 1)。また、変異型を含めた Stx2 についてみると、ヒト集団食中毒由来株はいずれも 1:128 以上の力価を示していたのに対し、ヒト散发事例由来株は、ウシ由来株と同様にその産生は一定ではなく、不均一ながらも相対的に低

値に集中した分布を示していた(図 2)。

Stx2c 産生のみについて比較することで、その分布はより詳細に区別された。すなわち、ウシ由来株の中で食中毒事例に関連していることの明らかな菌株(#H02E035)は、高い産生を示していたが、ウシ由来株全体における分布は不均一であり、ピークは 1:8 に局在していた(図 3)。これはヒト由来株におけるピークが 1:64 であるのに比べると明らかに低い傾向を示していた。

4. Stx 産生と *Q*<sub>933</sub> 及び *S*<sub>933</sub> 遺伝子の相関  
ウシ・ヒト由来代表株について、それぞれ Stx 産生と *Q* および *S* 配列との相関性を考察したところ、Stx1 産生はウシ由来株で多様 (1:0~1:128) であったが、1 株(#N34, Stx1=1:8)を除いて、いずれもファージ上の *Q*, *S* 配列を保有しており、直接的な相関性は認められなかった(表 3, 4)。

一方、Stx2 については、*Q* 配列が増幅されなかった株はいずれも 1:32 以下の Stx 産生を示していた。*Q* および *S* 配列が共に増幅されなかった全 10 株のうち、8 株では Stx2 産生が認められず、残り 2 株の Stx2 産生も 1:2 および 1:16 と低値であった。

また、*stx2,2c* に関わらずウシ由来株には、ヒト由来株に比べて高い割合で *Q* 配列のみ増幅されない株が存在しており、食中毒事例由来株である H02E035 株を除いて、Stx2 産生は 1:8 以下であった(表 3, 5)。*stx2* 株で *Q*, *S* 配列が共に陰性の場合、

いずれも Stx2 は産生されなかったことから、*stx2c* フェージにおける *Q* および *S* 配列の多様性が示唆された。

#### 5. *Q* 配列と *stx* 型 / 産生の相関

*stx2* 保有株間では *Q* 遺伝子が毒素産生との間に顕著な相関性を有していたことから、次に明らかな毒素産生を有する *stx2c* 代表株と *stx2* 代表株 (EDL933 株) との DNA 配列を比較したところ、毒素遺伝子より上流領域のフェージゲノム上では大きく異なっており、*Q* 配列についても両株間での相関性は約 48.77% であった。

*Q*<sub>2851</sub>-*stx2c* 間を増幅するプライマーセットを構築し、PCR 増幅パターンと毒素産生との関連性について検証したところ、Stx2 に対して 32 倍以下の力価であった 29 株のうち、15 株では *Q*<sub>933W</sub>-*stx2* 配列が増幅されなかったが、このうち 7 株は *Q*<sub>2851</sub>-*stx2c* 配列が検出された。また、両者で検出されなかった 10 株については、1 株を除いて Stx2 は検出限界以下であった (表 3)。

#### D. 考察

外的環境に応じた病原因子の産生/調節は、細菌の病原性を知る上で最も特徴的な形質として捉えられる。これまでの研究により、マイトマイシン C をはじめとしたフェージ誘導を引き起こす因子によって志賀毒素産生を誘導することが知られているが、その研究対象はごく限ら

れた菌株であったり、多様な血清型の STEC を網羅的に解析するにとどまってきた。これらの知見は、STEC の中でも、血清型 O157 がヒトへ強い病原性を示していることを示してはいるが、O157 菌株間の多様性の評価には結びついていない。本研究では、STEC の中でもヒトにおける病態の重要性を鑑み、血清型 O157 のみをその対象として取り上げ、はじめに病原遺伝子の保有状況をヒト由来株と比較した。これまでに Attaching and effacing に関与する *eaeA* 遺伝子には多様な subtype が知られているが、O157 供試株がいずれも  $\gamma$  型であったこと (表 1) は、*eaeA* の血清型に対する高い特異性を示しているといえる。また、*katP* 遺伝子では PCR 増幅産物のサイズに差異を認めたと、その他の病原遺伝子の分布については同様に血清型 O157 にほぼ共通に分布していたことから、こうした主要病原遺伝子の保有性から O157 の病原性を直接的に評価することは困難と思われた。一方で、*stx* 遺伝子型に関する検討により、ウシ由来 *stx2* 陽性菌株において、変異型として検出されたのは *stx2c* が最も高く、*stx2* 全体の約 73.2 % (90/123) を占めていたが (表 2)、この結果はヒト由来株の 31.3% (20/64) に比べると著しく高く、これまでに示唆されているように、一部のサブグループがヒトへの直接

的な伝播により感染を生じるのであって、ウシの保有する O157 すべてがヒト O157 症の直接的な感染源とはならない可能性を支持しているといえる。

Stx 産生に関して、ヒト食中毒事例由来株ではいずれも高値を示したが、ウシ由来株ではマイトマイシン C によるファージ誘導後も Stx 産生が認められない複数の株を認めた。これらファージ変換誘導は *in vivo* における O157 株の病態を知る上で重要であり、一般的な病原遺伝子の保有状況の差異に比べ、より顕著にヒトおよびウシ由来 O157 株間における病原性の差異を直接的に示しているともいえる。ファージゲノム上に位置する *stx* 遺伝子は、同じくファージ上に位置する *Q* 因子および *S* 因子の制御を受ける。すなわち、*Q* 因子は *stx* の anti-terminator として、毒素遺伝子の転写を制御しており、*S* 因子はファージの溶原化を引き起こすのに必要とされている。*stx1* ファージで、*Q*、*S* 配列はほぼ共通に認められ、Stx1 産生との相関はなかったが (表 3)、この原因としては *Shigella dysenteriae* type1 の *stx1* と同様に defective phage 中に安定的に存在しているのかもしれない。もしそうであるならば、ファージ様遺伝子を保有しているものの、伝達されることはないと考えられる。Stx1 は Stx2 よりも早期に獲得さ

れた外来性遺伝子であることが O157 の分子進化学研究により推察されているが、ファージ構造の変化が少ないという点からもその可能性が高い。

一方で、*stx2* ファージ産生に関しては、*Q*、*S* 配列との相関が認められた。*Q*<sub>933</sub> 配列が増幅されないにもかかわらず、1:128 以上の Stx2 産生を示した株が存在したが (#H02E035, #T51)、これらの *stx* 型は *stx2c* であることから、*stx2c* ファージ特異的な *Q* 配列 (*Q*<sub>2857</sub>) もまた強い毒素産生を誘導しうると考えられた。2004 年に Lejeune らは、933W ファージ由来の *Q* 配列を指標とした O157 の病原性評価に有用であると報告したところであるが、その後 Strauch らは *stx2c* ファージの単離に成功し、そのゲノム配列を報告した。我々はこの配列を元に *stx2c* ファージの *Q* 配列を特異的に検出するためのプライマーセットを構築し、PCR による毒素活性評価への応用性について検討した。また、*Q* および *S* 配列が陽性であるにもかかわらず Stx 産生が低い株も存在したが (#N36, #AS16)、これらは両遺伝子の発現変化が生じていると考えられる。いずれにしても、Stx2 産生の多様性ならびに PCR による Stx 近傍ファージ遺伝子の異なる増幅パターンは、*stx2* を保有するプロファージの多様性を裏付けているといえる。Octamer-based scanning 法を用いて tRNA 配列の相違から、ウシ由来 O157 株におけ

る Subpopulation の存在も確かに指摘されており、また LEE 関連因子の発現に関する比較から、ウシ由来株とヒト由来株の相同性の違いを示唆する報告もある。一方で、Stx2 フェージはその多様性が指摘されてはいるものの、これらの疫学的関連性については未だ明らかでない。HUS 発症患者より分離された STEC の Stx 産生性は、概して高く、ウシ由来 STEC 株における分布と一致しないことを報告されているが、その遺伝学的関連性については明らかではなかった。ウシ由来株におけるこうした多様性は、フェージゲノム上での遺伝子変換に基づく直接的な病原性という形質を意味していると考えられ、特に O157 の病原リスクを迅速に評価する必要のある検査機関等において、本研究で検討した PCR 法は有用と思われる。

#### E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

- 1) ウシ由来株とヒト由来株の間で、*eaeA*, *EhxA*, *espP*, *katP* 遺伝子の保有状況に有意な差異は認められず、ほぼ共通に保有していた。
- 2) 由来を問わず、血清型 O157 に属する分離株の *eaeA* サブタイプは  $\gamma$  型であっ

た。

3) *stx* 遺伝子型別の結果から、ウシ由来株での高い *stx2c* の保有率 (73.2%) が明らかとなり、それらの毒素産生は一部の株を除いて低値を示した。

4) 毒素遺伝子上流に位置する *Q* 遺伝子の保有は毒素遺伝子型およびその産生と相関しており、検出系への有用性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

投稿準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

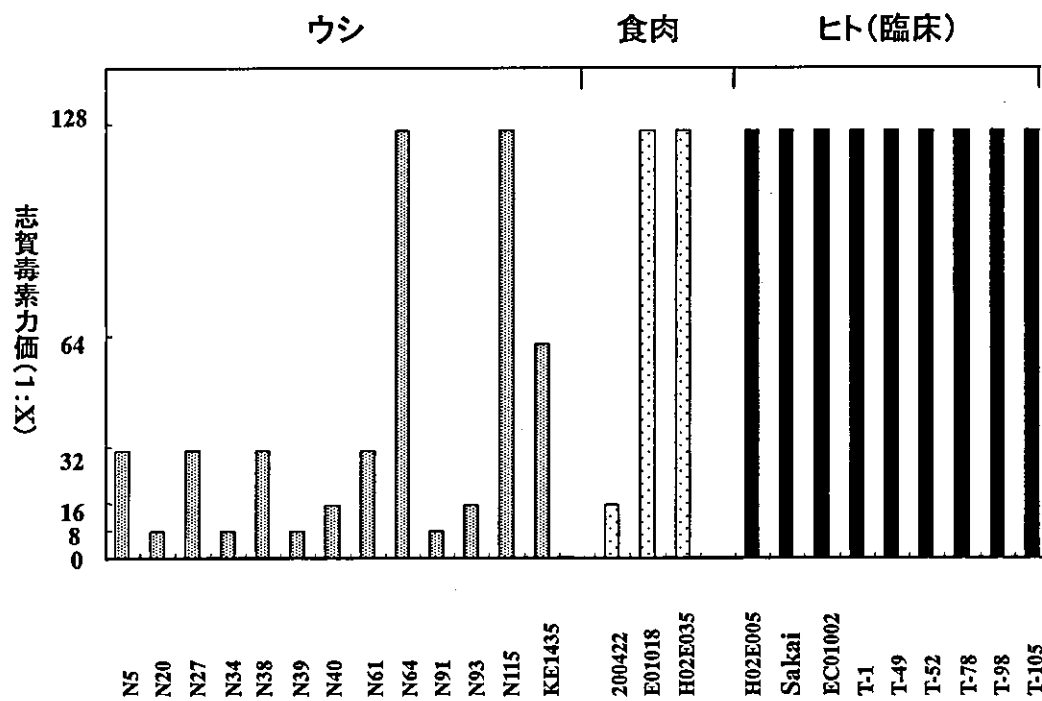


図1 ウシ、食肉、およびヒト由来代表株における Stx1 産生性の比較

ウシ糞便、食肉、ヒト(集団感染ならびに散発感染事例)由来 *stxI*+菌株について、ラテックス凝集反応を用いて総 Stx1 産生を比較した。



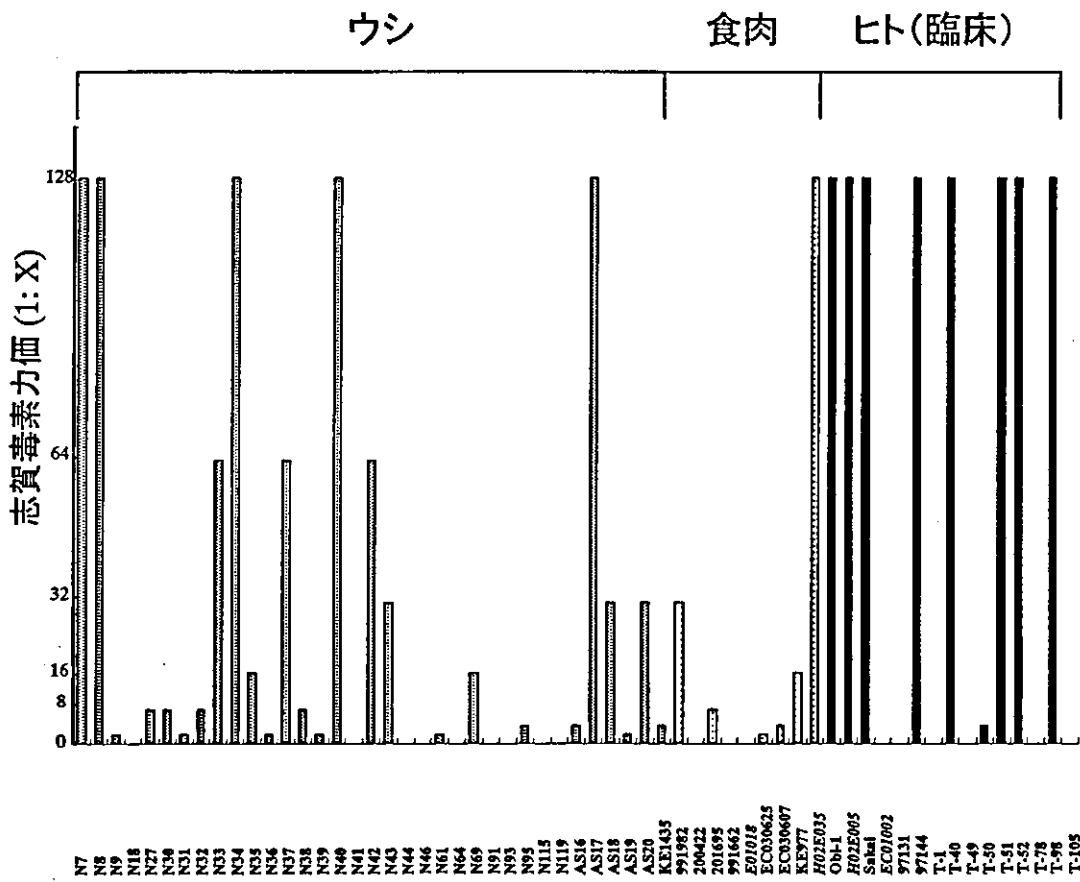


図1 ウシ、食肉、およびヒト由来代表株におけるStx1産生性の比較  
 ウシ糞便、食肉、ヒト(集団感染ならびに散发感染事例)由来stx2+菌株について、ラテックス凝集反応を用いて総Stx1産生を比較した。

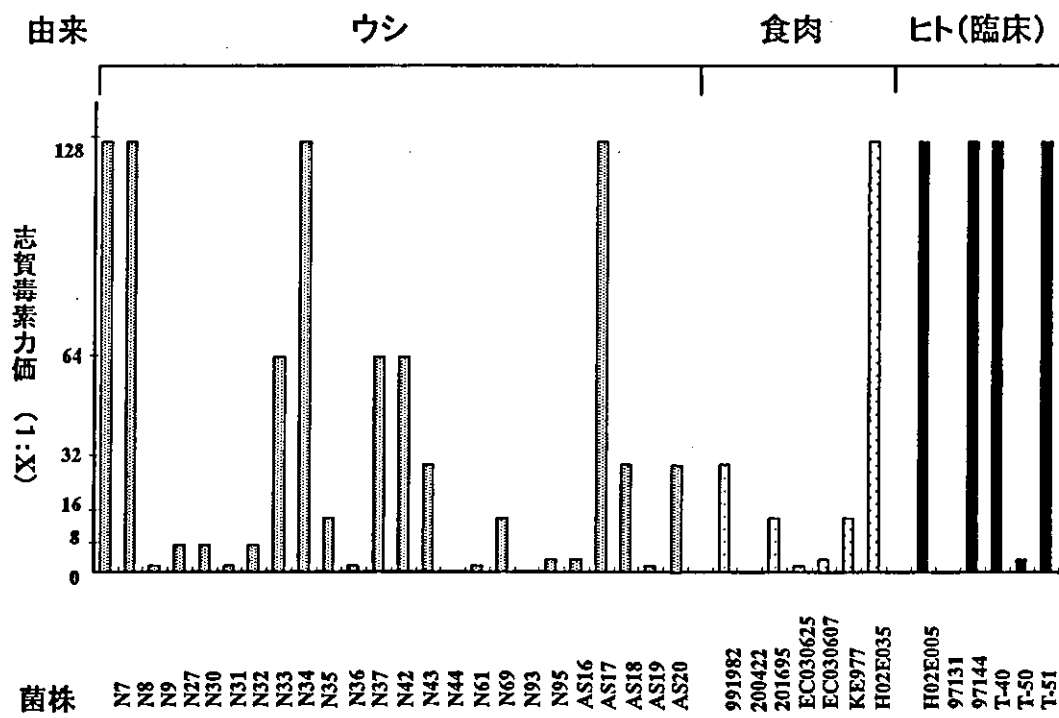


図3 ウシ、食肉、およびヒト由来代表株における Stx2c 産生の比較

表 1 O157 供試菌株における病原遺伝子の保有状況

由来	菌株数	各種病原遺伝子(陽性数)			
		<i>eaeA</i>	<i>EhxA</i>	<i>espP</i>	<i>katP</i>
ウシ	129	127	125	129	125*
食品	36	36	36	36	36
ヒト	66	66	63	64	64
計	231	229	224	229	225

PCRにより検出された各遺伝子の陽性数を表示した。

\* 異なる増幅サイズを示した5株を含む

表 2 O157 供試菌株における *stx* 遺伝子型

由来	菌株数*	<i>stx</i> 遺伝子型 (%)						
		1	2	2c	1, 2	2, 2c	1, 2c	1, 2, 2c
ウシ	129	6 (4.7)	15 (11.6)	50 (38.8)	15 (11.6)	19 (14.7)	17 (13.2)	4 (3.1)
食品	36	2 (5.6)	4 (11.1)	9 (25.0)	12 (33.3)	4 (11.1)	2 (5.6)	3 (8.3)
うち食肉	26	0 (0)	4 (15.4)	9 (34.6)	6 (23.1)	4 (15.4)	2 (7.7)	1 (3.8)
ヒト	66	2 (3.0)	16 (24.2)	6 (9.1)	27 (40.9)	6 (9.1)	6 (9.1)	2 (3.0)
計	231	10 (4.3)	35 (15.2)	55 (24.2)	54 (23.8)	29 (12.6)	25 (10.8)	9 (3.9)

\* ウシ, 食品, ヒト由来株には, *stx* 陰性株がそれぞれ 3, 0, 1 株含まれる。

表 3 O157 代表株における Stx 産生と *Q,S* 遺伝子の保有状況

O157 菌株	<i>stx</i>	<i>stx</i> -flanking genes					毒素産生 (1: x)	
		<i>Q-stx1</i>	<i>stx1-s</i>	<i>Q<sub>933</sub>-stx2</i>	<i>Q<sub>2851</sub>-stx2c</i>	<i>stx2-S<sub>933</sub></i>	Stx1	Stx2
ウシ由来								
N5	1	+	+	ND	ND	ND	32	ND
N7	2c	ND	ND	+	+	+	ND	128
N8	2c	ND	ND	+	+	+	ND	128
N9	2c	ND	ND	-	+	+	ND	2
N18	2	ND	ND	-	-	-	ND	-
N20	1	+	+	ND	ND	ND	8	ND
N27	1, 2c	+	+	+	+	+	32	8
N28	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
N29	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
N30	2c	ND	ND	-	+	+	-	8
N31	2c	ND	ND	+	+	+	-	2
N32	2c	ND	ND	-	+	+		8
N33	2c	ND	ND	+	-	+	ND	64
N34	1, 2	+	-	+	-	+	8	128
N35	2c	ND	ND	+	+	+	ND	16
N36	2c	ND	ND	+	+	+	ND	2
N37	2c	ND	ND	+	+	+	ND	64
N38	1, 2	+	+	+	-	+	32	8
N39	1, 2	+	+	+	-	-	8	2
N40	1, 2	+	+	+	-	large	16	128
N41	2	ND	ND	+	-	large	ND	-
N42	2c	ND	ND	+	-	+	ND	64
N43	2, 2c	ND	ND	+	-	-	ND	32
N44	2, 2c	ND	ND	+	+	-	ND	-
N45	1	+	+	ND	ND	ND	-	ND
N46	2	ND	ND	-	-	+	ND	-
N61	1, 2, 2c	+	+	-	+	+	32	2
N64	1, 2	+	+	-	-	+	128	-
N69	2, 2c	ND	ND	-	+	-	ND	16
N74	2c	ND	ND	+	+	-	ND	2
N91	1, 2c	+	-	-	-	+	8	-
N93	1, 2c	+	+	-	+	+	16	-
N95	2c	ND	ND	-	+	+	ND	4
N99	1, 2c	+	+	+	+	large	-	-
N115	1, 2	+	+	-	?	-	128	-
N119	2	ND	ND	-	-	-	ND	-

(次頁へつづく)

ウシ由来									
AS16	2c	ND	ND	+	-	+	ND	4	
AS17	2, 2c	ND	ND	+	+	+	ND	128	
AS18	2c	ND	ND	+	+	-	ND	32	
AS19	2c	ND	ND	-	+	-	ND	2	
AS20	1, 2c	ND	ND	-	-	+	ND	32	
KE1435	1, 2c	+	+	-	-	+	64	4	
食肉由来									
991982	2c	ND	ND	-	-	+	ND	32	
200422	1, 2, 2c	+	+	-	-	-	16	-	
201695	2c	ND	ND	-	small	+	ND	8	
991662	2	ND	ND	-	-	-	ND	-	
E01018 <sup>*1</sup>	1	+	+	ND	ND	ND	128	-	
EC030625	1, 2c	ND	ND	-	-	+	ND	2	
EC030609	2c	ND	ND	-	+	+	ND	4	
KE977	2c	ND	ND	-	+	+	ND	16	
H02E035 <sup>*2</sup>	1, 2c	+	+	-	+	+	128	128	
991739	2	ND	ND	-	-	-	ND	-	
ヒト臨床由来(集団事例)									
Obi-1	2	ND	ND	+	-	+	ND	128	
H02E005 <sup>*2</sup>	1, 2c	+	+	-	+	+	128	128	
Sakai	1, 2	+	+	+	-	+	128	128	
EC01002 <sup>*1</sup>	1	+	+	ND	ND	ND	128	-	
ヒト臨床由来(散発事例)									
97131	2, 2c	ND	ND	-	-	-	ND	-	
97144	2, 2c	ND	ND	+	+	+	ND	128	
T-1	1, 2	+	+	-	-	-	128	-	
T-40	2, 2c	ND	ND	+	+	+	ND	128	
T-49	1, 2	+	+	-	-	+	128	-	
T-50	2, 2c	ND	ND	+	+	+	ND	4	
T-51	2c	ND	ND	+	+	+	ND	128	
T-52	1, 2	+	+	+	-	+	128	128	
T-78	1, 2	+	+	+	-	large	128	-	
T-98	1, 2	+	+	+	-	+	128	128	
T-105	1	+	+	ND	ND	ND	128	-	
T-149	2	ND	ND	+	-	-	ND	-	
K-164	1, 2	+	+	+	-	large	128	-	
KSH-30	2	ND	ND	-	-	-	ND	-	

ND, Not determined

\*、集団食中毒事例において、食品・患者双方から分離された菌株をアスタリスクと共に番号で表示した。

表 4 Stx1 産生と  $Q_{933}$  および  $S_{933}$  遺伝子保有状況の比較

由来	毒素産生	菌株数	PCR による検出	
			$Q_{933}$	$S_{933}$
ウシ	4 倍以下	1	1 (100)	1 (100)
	8~32 倍	10	10 (100)	8 (80)
	64~128 倍	3	3 (100)	3 (100)
ヒト	64~128 倍	9	9 (100)	9 (100)
食肉	8~32 倍	1	1 (100)	1 (100)
	64~128 倍	2	2 (100)	2 (100)

( ) 内は%

表 5 Stx2 産生と  $Q_{933}$  および  $S_{933}$  遺伝子保有状況の比較

由来	毒素産生	菌株数	PCR による検出	
			$Q_{933}$	$S_{933}$
ウシ	4 倍以下	17	7 (41)	13 (77)
	8~32 倍	9	5 (56)	6 (67)
	64~128 倍	8	8 (100)	8 (100)
ヒト	4 倍以下	9	4 (44)	4 (44)
	64~128 倍	9	8 (89)	9 (100)
食肉	4 倍以下	6	0 (0)	3 (50)
	8~32 倍	3	0 (0)	3 (100)
	64~128 倍	3	2 (67)	3 (100)

( ) 内は%



### (3) ウシ由来 O157 における ETT2 遺伝子領域の分布

#### 研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 のゲノムが解読された後、LEE と呼ばれる Pathogenicity island に続き、*E. coli* Type III Secretion System 2 (ETT2) と命名された PI の存在が明らかにされた。ETT2 は多くの腸管出血性大腸菌に認められ、血清型 O157 も同様にほぼ共通に保有しているが、以前の研究において、ウシ由来株には一部の欠失もしくは変異の可能性を示唆するデータを得ていた。このことから、多検体のウシ由来株における分布を明らかにするため、調査を行った。PCR により、ウシ由来の 4 株を除いては、いずれの領域も増幅されたことから、少なくとも、ETT2 は由来を問わず、血清型 O157 にはほぼ共通に認められる遺伝子群であることが明らかとなった。また、サザンブロットでは陽性ながらも弱い応答を示す複数の株が認められたことから、これらのうちウシ由来代表株について DNA 配列を決定した。その結果、ヒト由来代表株である EDL933 株と 1 塩基に差異が認められた。

協力研究者

帯広畜産大学

牧野壮一

国立医薬品食品衛生研究所 五十君静信

## A. 研究目的

これまでに家畜を含めた動物からの O157 の分離を行い、その遺伝学的性状として病原因子の保有状況を明らかにしてきた<sup>4)</sup>。これらの研究成果は動物からの感染を指摘する上で重要であり、動物由来感染症としての本菌の存在を注視させてきた。一方で、病原性に関する基礎研究も進行しており、ゲノムの完全解読は様々な遺伝子の機能解析の幅を広げ、病原因子との関連を含め広く行われている<sup>2)</sup>。本菌は腸管上皮細胞に attaching-and-effacing (A/E) lesions を形成することで微絨毛に局所的な破壊をもたらし宿主細胞へ接着するが、この A/E lesions に関わる全遺伝子は locus for enterocyte effacement (LEE) と呼ばれる Pathogenicity Island に座位し、Intimin や Tir (Traslocated Intimin Receptor) 等の 3 型分泌機構に関与する構造遺伝子を含んでいる<sup>5)</sup>。3 型分泌機構は多くの病原細菌で認められ<sup>1)</sup>、何れも病原関連因子として関与していることから、*E. coli* Type III Secretion System 2 (ETT2) についても同様に病原性への関与が推察されるが、その機能および分布は不明であった。本研究では、ETT2 に焦点を絞り、その分布を明らかにすることで、その病原性を分子遺伝学的に捉え、ウシに由来す

る O157 の病原性評価へとつながる科学的根拠を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 菌株

本研究では先項で述べた、ウシ、食品、およびヒト由来株計 231 株を供した。

### 2. DNA 抽出および PCR

先項の方法により抽出した全 DNA を鋳型として、ETT2 の 3 領域 (L、C、D)<sup>3)</sup> の各配列を PCR により増幅させた。PCR 産物は電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色により検出を行った。

### 3. サザンブロット

全 DNA をナイロンメンブレンに転写後、UV 固定を行い、予め DIG 標識した、ETT2-C プロブを用いて、ハイブリダイズさせた (ロッシュ)。検出は化学発光法により行った。

### 4. シークエンス

ETT2-C 領域の DNA 配列を決定するため、PCR 産物を Big Dye Terminator (アプライドバイオシステムズ) を用いて標識反応を行い、脱塩精製を行った後、ABI 310 DNA Sequencer により、検出を行った。得られた配列の比較は、Blast 検索により行い、Genetics-Mac ver.9.0 によ

りアライメント解析を行った。

## C. 研究成果

### 1. ETT2-C 領域の保有状況

PCRによりウシ・食品・ヒト由来株合計 231 株について、ETT2 配列の保有状況を調査したところ、L(6.6 kb), D(2.6 kb), C(5.5 kb)の各断片はほぼ共通に認められたが、C 領域については、3 株で検出されなかった (表 1)。

これらの株とヒト由来代表株について、C 領域特異的なプローブを用いてサザンブロットを行った。その結果、ウシ・ヒト由来株双方で弱い検出を示す株が認められ (図 1)、その多様性が示唆された。

### 2. ウシ由来代表株の C 領域配列

実際に、サザンブロットで弱い応答を示したウシ由来代表 3 株について、C 領域の DNA 配列を決定したところ、ヒト由来代表株 (EDL933) と 99.9%の相同性を示していたものの、1 塩基が EDL933 株とは異なる配列を示していた。

## D. 考察

以前の研究<sup>30)</sup>において、ウシ由来 O157 代表株には C 領域が検出されないウシ由来株を認めたことから、本研究では多検

体を用いて、その分布状況を検討した。以前に検出されなかった株については同様の結果であったが、その他のウシ由来株のほぼ全ては、陽性を示した (表 1)。しかしながら、サザンブロットの結果には、検出結果に差異が認められたことから、C 領域特異的なプローブに対し、弱い応答を示したウシ由来代表株の DNA 配列を決定した。ヒト由来株とアライメント解析を行った結果、2 株の牛由来株は共通して、ヒト由来株と 1 塩基で異なる配列を示した。本遺伝子は、LEE 遺伝子群の発現に関与することが知られており<sup>6)</sup>、細胞付着能といった病原性にこの差異が関与しているかもしれない。

## E. 結論

1. ETT2 遺伝子群は由来にかかわらず、血清型 O157 に共通していることが示された。
2. サザンブロットの結果より、C 領域 (*eivA-F*)には菌株による多様性が存在していると推察された。
2. *eiv* 遺伝子群の一部で 1 塩基に多形性を示唆するデータを得た。

## F. 健康危険情報

なし

## G.研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実安心案登録

なし

### 3. その他

なし

## 引用文献リスト

1. Ghosh P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:771-95. Review.

2. Lukas M.W., Qi W., Lacher D.W., and Whittam T.S. 2005. Evolution of Genomic Content in the Stepwise Emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 187: 1783-1791.

3. Makino S., Tobe T., Asakura H., Watarai M., Ikeda T., Takeshi K., Sasakawa C. 2003.

Distribution of the secondary type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates among Shiga toxin-producing *E. coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2341-2347.

4. Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 34: 229-243. Review.

5. Kenny B. 2002. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 469-477. Review.

6. Zhang L., Chaudhuri R.R., Constantinidou C., Hobman J.L., Patel M.D., Jones A.C., Sarti D., Roe A.J., Vlisidou I., Shaw R.K., Falciani F., Stevens M.P., Gally D.L., Knutton S., Frankel G, Penn C.W., and Pallen M.J. 2004. Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 72: 7282-7293.