

表 4. 病原因子遺伝子保有率 (VT 遺伝子保有別 えびす食中毒由来 VS その他)

由来 (n)	病原因子遺伝子保有率 (%)								
	毒素関連		付着因子			III 型分泌装置関連			
	<i>subA</i>	<i>ehxA</i>	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>iha</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>	<i>tir</i>
えびす食中毒 VT+ (3) ^a	0	100	100	0	100	100	100	0	100
えびす食中毒 VT- (14) ^b	21.4	100	100	0	100	100	100	7.1	100
その他食中毒 VT+ (14) ^c	0	64.3	100	0	100	100	85.7	7.1	100
その他食中毒 VT- (19) ^d	36.8	5.3	5.3	0	5.3	5.3	5.3	10.5	5.3

^aえびす食中毒由来 VT 遺伝子保有株

^bえびす食中毒由来 VT 遺伝子非保有株

^cその他食中毒由来 VT 遺伝子保有株

^dその他食中毒由来 VT 遺伝子非保有株

表 5. 病原因子遺伝子保有率(えびす食中毒由来株)

由来地 域 (n)	病原因子遺伝子保有率 (%)														
	<i>stx</i> variants						毒素関連		付着因子			III 型分泌装置関連			
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i> <i>c</i>	<i>stx2</i> <i>d</i>	<i>stx2</i> <i>e</i>	<i>stx</i> <i>2f</i>	<i>sub</i> <i>A</i>	<i>ehx</i> <i>A</i>	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>iha</i>	<i>esp</i> <i>B</i>	<i>esp</i> <i>D</i>	<i>esp</i> <i>P</i>	<i>tir</i>
福井 (8)	0	12.5	0	0	0	0	37.5	100	100	0	100	100	100	0	100
石川 (1)	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	100	0	100
富山 (4)	0	50.0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	100	25.0	100
横浜 (4)	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	100	0	100

血清中の抗大腸菌 LPS 抗体価

研究協力者 磯部順子、木全恵子、嶋 智子、金谷潤一、綿引正則（富山県衛生研究所・細菌部）

研究要旨 腸管出血性大腸菌（EHEC）O111 による集団食中毒において、EHEC が分離されなかった HUS 発症者について、感染症法に基づき 3 類感染症と診断するため、血清中の抗大腸菌 LPS 抗体価を調べた。その結果、EHEC が分離されなかった患者 22 名中 HUS 発症者 12 名は、血清中の O111 に対する LPS 抗体価は 80 倍以上の陽性で、EHEC O111 感染症であると診断された。また、本事例は O111:H8 以外にも O157:H7 (VT1,2, VT1, VT2) が分離されているが、その分離された菌の血清型や毒素遺伝子型に関わらず、36/45 名の患者は O111 血清抗体価が高かった。血清抗体価の病日ごとの推移をみると、多くは 2~3 日目で上昇しはじめ、3 週間ほど高い値が続いた後下降し、40 日ころには陰性域になることが明らかになった。重症度別にみると、血清抗体価は HUS 発症者では高い傾向にあり、血便を示さない患者では低い傾向にあった。以上から、本事例において、腸管病変により強く関与したのは EHEC O157:H7 よりも O111:H8 であると考えられた。血清中の抗 LPS 抗体価測定は EHEC が分離されない患者の診断法として有用であり、感染症を早期に探知する方法のひとつとして地方衛生研究所に検査体制を整えておくことが望まれる。

A. 研究目的

2011 年 4 月に「焼肉酒家えびす」で発生した EHEC O111:H8 による集団食中毒は、死者 5 名、HUS 発症者 32 名の重症者を含む患者 181 名という極めて重大な事件になった。EHEC 感染症は感染症法の中で 3 類感染症と位置付けられるが、診断は患者便から EHEC が分離されるか、EHEC が分離されない場合は、HUS を発症している患者に限り、血清中の LPS 抗体価の上昇または便中の毒素を確認することとされている。

本事例では、患者から EHEC O111:H8 (VT2), O157:H7 (VT1,2, VT1, VT2) が分離されただけでなく、VT 遺伝子を保有しない大腸菌 O111:H8 (VT-) も多く分離された。一方、これらの大腸菌がまったく分離されない患者も多く認められ、富山県の患者では 126 名が 3 類感染症と診断されない状況であった。

そこで、本事例中の EHEC が分離されなかった HUS 発症者について、EHEC 感染症と診断することを目的として、患者血清中の抗大腸菌 LPS 抗体価（以下血清抗体価）を測定した。また、複数の血清型の EHEC に感染した場合に、その抗体価はどのような変動を示すか、さらにこれまでほとんど報告されていない EHEC O111 に対する血清抗体価はどのような変動を示すかについて、合わせて調査することを目的とした。

B. 研究方法

1. 血清検体

血清は、原因施設である「焼肉酒家えびす」の

チェーン店を利用し、県内医療機関を受診した患者から採血され、保管されていた 45 名分 177 検体である。これらのうち、EHEC が分離されなかった患者 22 名から採取された血清は 81 検体、うち HUS 発症者、HUS 非発症で血便を呈した患者からの血清はそれぞれ 12 名分 61 検体、4 名分 12 検体であった。一方、EHEC が分離された患者から採取された血清は 23 名分 96 検体で、うち HUS 発症者、HUS 非発症で血便を呈した患者からの血清はそれぞれ 14 名 56 検体、6 名 34 検体であった。

2. 菌株抗原

抗原として用いた菌株は、大腸菌血清群 O111 として本事例の患者便から分離された株 O111:H8 (VT2 : 当所保管菌株 No.E165) を用いた。大腸菌血清群 O157 として O111 群同様、本事例の患者分離株 O157:H7 (VT1,2 : E045-1) を用いた。大腸菌 O26:H11 (EC3273), O1:H6 (EC3061), O18:H7 (EC2922) については、過去に食中毒調査のために当所に搬入、保管されていた株である。EHEC O26 は、日本で報告される EHEC 感染症のうち、2 番目に多く分離されている。また、大腸菌血清群 O1, O18 は健康な人から多く分離される血清群の一つである。大腸菌血清群 O6 は、本事例の複数の患者便から分離された大腸菌で、別の項で関係研究分担者の報告「患者由来血便メタゲノム解析」から、便中に多く存在していたことが示唆された大腸菌である。

3. 血清中の抗大腸菌 LPS 抗体価測定法

血清抗体価は、国立感染症研究所細菌第一部から示されているプロトコールに準じて測定した。検査法の概略を次に示し、図1にフローチャートを示す。

① 血清の希釈系列作製：血清は、検査対象とする大腸菌1血清群につき6 μ lを、56°C30分、恒温水槽で非働化し、10,000 \times g、1分間遠心後、その上清を検査に供した。一方、96穴マイクロプレートの2~8穴目に25 μ lの滅菌生理食塩水（以下生食）をあらかじめ分注しておき、1穴目に生食で10倍希釈した非働化血清を50 μ l分注し、その25 μ lで2穴目以降8穴目まで段階希釈して、血清の希釈系列を作製した。また、一部、1回目の抗体価測定で高希釈倍率まで凝集した血清の再検査時には、この段階希釈を16穴まで行い、系列を作製した。なお、本調査においてマイクロプレートはU底タイプに変えて、V底タイプを用いた。

② 抗原液の作製：保管していた菌株をTSAで分離培養し、実体顕微鏡で確認したスムーズなコロニーを選択し、厚さ10mmのTSA培地に全面的に塗抹、35°C一晩培養した。この菌をすべて掻き取り、生食5mlに懸濁し、121°C1時間オートクレーブで滅菌を行なった。その後2,000 \times g、15分遠心し、上清を捨て、再度5mlの生食を加えて懸濁した。この遠心洗浄操作を2回行い、最後に200 \times g、5分遠心した上清に等量の2%ホルマリン加生食を加え、35°Cで1時間静置したものを抗原液とした。示されたプロトコールでは使用直前に生食で遠心洗浄し、濁度をMcFarland No.3となるよう調整するとあるが、本調査では、予備実験の結果、抗原液をMcFarland No.4 (4.0~4.5)として使用した。

③ 抗体価測定：①により準備した血清希釈系列に②で作製した抗原液を25 μ lずつ添加した。プレートに密着シールを貼り、プレートミキサーで充分混和した。52°Cで1時間静置したのち、25°Cで1晩静置した。判定は、凝集を認めた血清の最高希釈倍率が10倍以下を陰性、20倍、40倍を擬陽性、80倍以上を陽性とした。ただし、ここで示す希釈倍率とは、抗原液と等量混合する前の血清の希釈倍率である。

④ 抗原性の確認：作製した抗原が抗体と確実に凝集するかを確認するため、市販の大腸菌免疫抗血清（デンカ生研）を用いて、O抗原に対する抗体価を測定した。逆に、非特異凝集が認められないことを確認するため、異なる型の抗血清を用いて同様の操作をおこなった。

（倫理面への配慮）

本調査については、当所の研究倫理審査委員会において承認されている。

C. 結果

1. EHECが分離されなかった患者血清の抗体価

VT遺伝子を保有するO111:H8あるいはO157:H7のいずれも分離されなかった患者（表1:G-A）22名中、血清抗体が陽性と認められたのは16名（72.7%）で、これらのうち、HUSを発症した患者は12/12名（100%）であった。したがって、感染症法により、この患者12名は3類感染症と診断された。また、HUS非発症の患者のうち、血便を呈した患者3/4名（75.0%）がO111血清抗体陽性となったのに対し、血便を呈しなかった患者らは1/6（16.7%）とO111血清抗体の陽性率は低かった。

この患者グループの血清抗体価をみると（表2）、O111血清抗体価は160~5,120倍に分布し、なかでも320倍が7名ともっとも多く、ついで640倍が5名と多かった。これに対し、O157血清抗体価は \leq 10~80倍で、およそ半数にあたる10名が \leq 10で、陽性域の80倍以上を示したのは4名のみであった。患者個々の血清抗体価は示していないが、このグループの患者のうち、O111、O157どちらの血清抗体も陽性となったのは、3名のみで、その血清抗体価はO111で高かった。

2. EHECが分離された患者の血清抗体価

①EHEC O111:H8 (VT2) および O157:H7 (VT1,2, VT1, VT2) が分離された患者の血清抗体価（表1:G-B）

O111:H8 (VT2) のほかに O157:H7 の VT 遺伝子型 (VT1,2, VT1, VT2) のいずれかまたは複数の型が分離された患者は9名で、うちO111血清抗体が陽性となったのは8名（88.9%）であった。これら8名を症状でみると、HUS発症者が6/6名（100%）、HUS非発症で血便を呈した患者2/2名（100%）であった。血便を呈しなかった患者は1名で、その血清抗体価はO111、O157のどちらも \leq 10倍であった。これらの血清抗体価をみると（表2:G-B）、前述した1名を除き血清抗体価はO111が320~2,560倍、O157が \leq 10~640倍とO111が高く、O157血清抗体価は約半数の4名が \leq 10の陰性であった。このグループの患者のうち、O111、O157どちらの血清抗体も陽性となったのは4名、O111血清抗体のみ陽性であったのは4名、両血清抗体が陰性となったのは1名であった（データ未提示）。両血清群に陽性となった4名でもO111血清抗体価が高かった。どちらの血清抗体も陰性となった患者1名は喫食翌日に発症しているが、症状は腹痛と発熱のみと軽く、病日8日目まで受診はなかった。

②O111:H8 (VT2) のみ分離された患者の血清抗体価（表1:G-C）

O111:H8 (VT2) のみ分離された患者は11名、

うち、O111:H8 (VT-) も同時に分離されたのは6名であった。O111 血清抗体が陽性となったのは10/11名 (90.9%) で、その症状別の内訳は、HUS 発症者で7/8名 (87.5%)、HUS 非発症で血便のあった患者3/3名 (100%) であった。陰性となった1名は血便、HUS を発症し、死に至った患者でO111、O157 どちらの血清抗体価も ≤ 10 倍であった。この1名を除くグループの血清抗体価はO111が160~1,280倍、O157が ≤ 10 ~160倍とO111で高かった(表2)。このグループの患者からO157は分離されていないが、1名のみO157血清抗体が陽性となった。しかし、その血清抗体価は160倍で、O111血清抗体価640倍に比べると低かった。③O157:H7 (VT1,VT2,VT1,2)のみ分離された患者の血清抗体価(表2:G-D)

血清抗体価を測定した45名のうち、EHECとしてO157群のみ分離された患者は3名で、うち2名からは大腸菌O111:H8 (VT-)も分離された。O111血清抗体が陽性となったのはHUS非発症で血便を呈した2名で、どちらもO111血清抗体価は640倍であったが、O157血清抗体価はO111 (VT-)も分離された1名が160倍の陽性で、1名は40倍の擬陰性であった。残る1名はどちらの抗体価も10倍に凝集を認めなかった。O111群が分離されなかった1名はO111血清抗体価が640倍、O157血清抗体価は40倍であった。

3. 大腸菌群O1, O18, O26に対する血清抗体価

患者から分離されていない大腸菌群O1, O18, O26については、1名の血清がO1群に対し、血清抗体価20倍の擬陽性を示した以外は、測定したすべてが10倍以下の陰性となった。ほとんどの血清は10倍でまったく凝集しなかったのに対し、6/31名の血清はO1群に対して10倍で凝集した(データ未提示)。このことは、血清抗体価の測定に際し、10倍での凝集は、患者が現在感染している原因菌と関係なく凝集する可能性を示す非特異的なものであり、陽性とは判定できないことを示している。

4. 大腸菌O6群に対する血清抗体価

一部の患者から分離された大腸菌O6群に対する血清抗体価は、検査した36名すべてが陰性であった。この大腸菌O6群については、血便メタゲノム解析の結果から、患者便に多く存在していたと推定され、実際、患者便から容易に分離できたことから、おそらく患者らは大腸菌O6群を何らかの食品と一緒に摂取したものと考えられる。しかしながら、患者から分離された大腸菌O6群は既知の病原遺伝子を保有していないことが確認され、血清抗体価も上昇していないことから、この菌による腸管病変はなかったものと考えら

れた。

5. 病日ごとの抗体価の推移

患者の症状別に、発症日を0日とする発症からの経過日数(病日)ごとのO111抗体価の平均値の推移を図2に示した。ただし、HUS発症患者25名は、入院が長かったこともあり、もっとも多い人では12検体、最長55日目までの血清を含め、117検体の抗体価を平均し、HUS非発症の患者では血便が認められた患者10名の46血清、血便が認められない患者9名の14血清の抗体価を平均したものである。血清数が少ないが、全体として、抗体価は3日目あたりから上昇傾向を示し、25、26日ころから下降し始め、30日目には抗体価が低くなり、44日目には抗体価40倍の疑陽性領域となっている。この血清抗体価の変動は竹田らの報告(医学と薬学第38巻第5号989-995, 1997)と一致している。

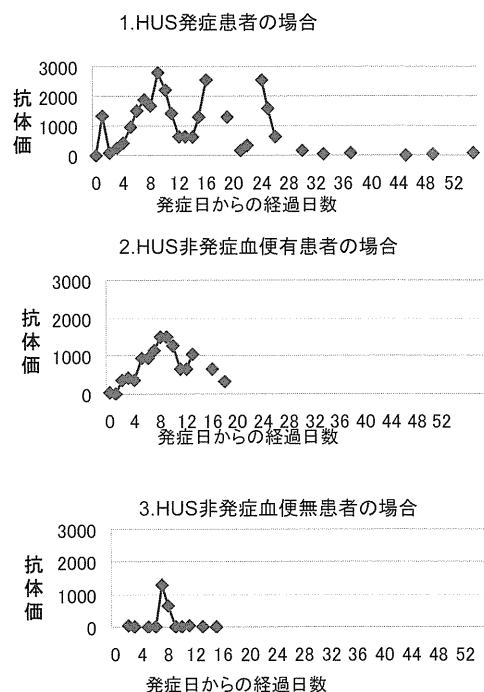


図2. 発症日からの病日別血清抗体価(平均値)の推移 X軸の病日は発症日を0日とした日数を示す。Y軸の抗体価は血清最高希釈倍数を示す。

6. 症状別血清抗体価

もっとも高い血清抗体価を、患者の症状(HUS:HUS発症者、血便:HUS非発症で血便を呈した患者、下痢:HUS非発症で血便を呈しなかった患者)別に示した(図3)。下痢の患者2名がO157血清抗体価40倍、O111血清抗体価 ≤ 10 倍を示したが、他の患者はO111血清抗体価がもっとも高かった。HUS発症者では、1名を除き、すべてが血清抗体価160倍以上で、もっとも高い

血清抗体価は 5,120 倍であった。この 1 名は 2-②で記述した死亡したが血清抗体価が ≤ 10 倍の患者である。HUS 非発症で血便があった患者は、1 名は血清抗体価 20 倍であったが、9 名は血清抗体価 320 倍以上で、もっとも高い患者では 1,280 倍であった。血清抗体価 20 倍となった患者の血清は、病日 5 日目にあたる 26 日に採血された 1 回分である。これに対し、下痢の患者では、血清抗体価は $\leq 10 \sim 640$ 倍とばらつきが見られたが、4/9 名が血清抗体価 ≤ 10 倍の陰性であった。血清抗体が陽性となったのは 2 名で、O111 血清抗体価は 320 倍と 640 倍であった。

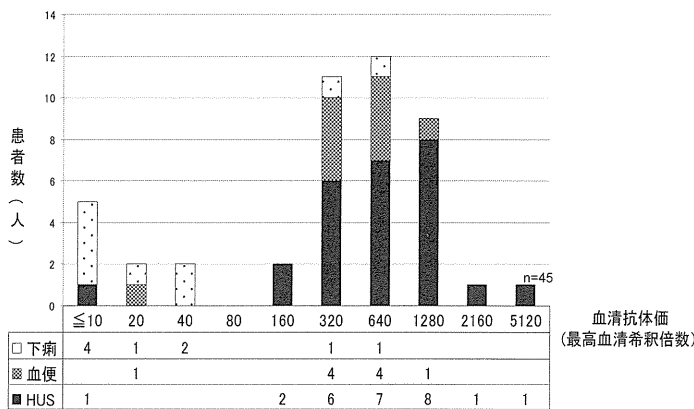


図3. 症状と血清抗体価
患者数は抗大腸菌LPSO111, O157抗体価のいずれか高い値で数えた。
下痢はHUS非発症者のうち血便のなかった患者を示す。血便とはHUS非発症者で血便のあった患者を示す。HUSはHUSを発症した患者を示す。

D. 考察

近年、EHEC 感染症は、焼肉店などでの発生数が増加していると報告されており、その原因食品として生食される牛肉や牛レバーが問題となっていた。そのような中で、‘ユッケ’といわれる生食用牛肉を原因とする食中毒事件が発生し、死亡者を含め多くの重症者が出たことで、あらためて EHEC の怖さを認識することとなった。重症者が多かったこと以外にも、本事例はこれまでにない特徴的な事柄が見られ、その中のひとつとして、多くの患者から EHEC が分離されなかったことが挙げられる。過去の事例においては、EHEC が分離されても、症状が全くない人（無症状病原体保有者）が存在することは周知のことである。しかしながら、症状、しかも HUS や脳症、そして死に至る患者からさえ、EHEC が分離されなかったことは、EHEC 感染症の診断において、また食中毒の場合には早期に探知、対応するという観点からも、きわめて重要な課題を提示した。発症菌

数が極めて少なく、ヒト-ヒト感染を起こすリスクの高い EHEC においては、EHEC に感染していることを探知できないことは、感染拡大につながる大きな問題である。

本事例において、測定した抗大腸菌 O111LPS 抗体価から、EHEC が分離されない HUS 発症者 12 名について、EHEC 感染症であると診断することができた。このことは O157 以外の血清群の場合にも、EHEC が分離されない場合に、血清中の抗大腸菌 LPS 抗体価の測定が、感染履歴を証明できる方法であることを示す。また、O111 に対する血清抗体価の変動は、これまで報告されている O157 に対する抗体価と同様に変動することが明らかとなった。さらに HUS 非発症で血便のあった患者においても、ほとんどで血清抗体は陽性となり、EHEC 感染を強く示す結果となった。すなわち、便から菌が分離された、されないに関わらず、血便や HUS など腸管内が菌の侵襲性を受けるような病態では、血清抗体価の測定が EHEC 感染を明らかにする方法のひとつになり得ることを意味する。しかしながら、血清採取日や個人の免疫力により血清抗体が陰性となる場合があり、その陰性結果が必ずしも EHEC 感染を否定するものではないことも改めて確認できた。加えて、VT 遺伝子が検出されない大腸菌 O111:H8 のみ分離された患者においてもその血清抗体が陽性となったことから、患者の腸管内に VT 産生性の菌が存在したと推定され、これは大腸菌 O111:H8 における VT2 と VT-の関連性を示す PFGE 等の結果に支持される。また、感染した大腸菌の血清型が複数であっても、それぞれの血清型別に血清抗体価が上昇することが明らかとなった。これについては EHEC 感染症においてはほとんど報告されていない。そして、メタゲノムの解析結果と合わせて考えると、それは腸管内の菌数を反映しているものと推定された。

E. 結論

本事例は複数の血清型の EHEC が原因となった食中毒であったが、より強く、より多くの人に病原性を示したのは EHEC O111:H8 (VT2) であったと考えられた。そして、血中の抗大腸菌 LPS 抗体価を測定する方法について、その有用性が示されたことから、地方衛生研究所などで対応できる体制を整えるべきと考える。ただし、近年、報告される EHEC の血清型は多様化しており、すべてに対応することは困難な状況となっている。より多くの血清型に対応し、安定した抗原性が確保される ELISA 法などのキットの開発が強く望まれる。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 磯部順子 焼肉チェーン店で発生した腸管出血性大腸菌 O111 による集団食中毒の概要 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2011,7,19 大阪市 (大阪北浜フォーラム)
- 2) 綿引正則 腸管出血性大腸菌の最近の知見について 平成 23 年高岡厚生センター管内職域管理栄養士等研修会 2011,7,21 富山県高岡市 (高岡総合庁舎)
- 3) 磯部順子 焼肉チェーン店を原因施設とする腸管出血性大腸菌による集団食中毒の概要 第 32 回日本食品微生物学会学術総会 2011,10,6-7 東京都 (東京都タワーホテル船堀)
- 4) 磯部順子 焼肉チェーン店を原因施設とする腸管出血性大腸菌による集団食中毒の概要 第 60 回九州地区獣医師大会 2011,10,30 長崎市 (長崎新聞ホール)
- 5) 磯部順子 富山県における EHEC 検査の実態 焼肉酒家えびすにおける集団食中毒事例の場合 第 38 回地方衛生研究所近畿支部細菌部会研究会 2011,11,2 神戸市 (神戸市勤労会館)
- 6) 磯部順子 2011EHEC 市中アウトブレイクについて 第 18 回中部地区微生物検査研究班宿泊研修会 2011,11,19 富山県 (ウイングウイング高岡)
- 7) 磯部順子 生食用食肉を原因とする腸管出血

性大腸菌による食中毒と検査 平成 23 年地域保健総合推進事業関東甲信越静岡ブロック専門家会議 2012,1,24 静岡市 (静岡県男女共同参加センター)

- 8) 磯部順子 富山県における O111 による集団食中毒事例での血清中の抗大腸菌 LPS 抗体価 平成 23 年度希少感染症診断技術研修会 2012,2,23 東京都新宿区 (国立感染症研究所戸山庁舎)
- 9) 磯部順子 腸管出血性大腸菌集団感染 2011 年富山 O111 大阪病院機能向上研究会 2012,3,10 大阪市 (大阪オーバルホール)
- 10) 綿引正則、磯部順子、木全恵子、嶋 智子、金谷潤一、山田三紀子、佐多徹太郎 志賀毒素産生性大腸菌 O111 による集団食中毒事例に関連した Stx2 プロファージの脱落現象の証拠 第 85 回日本細菌学会総会 2012,3,27 長崎市 (長崎ブリックホール)
- 11) 磯部順子、木全恵子、嶋智子、金谷潤一、綿引正則、佐多徹太郎 志賀毒素産生性大腸菌 O111 による集団食中毒事例を振り返って 第 85 回日本細菌学会総会 技術講習会 2012,3,27 長崎市 (長崎ブリックホール)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

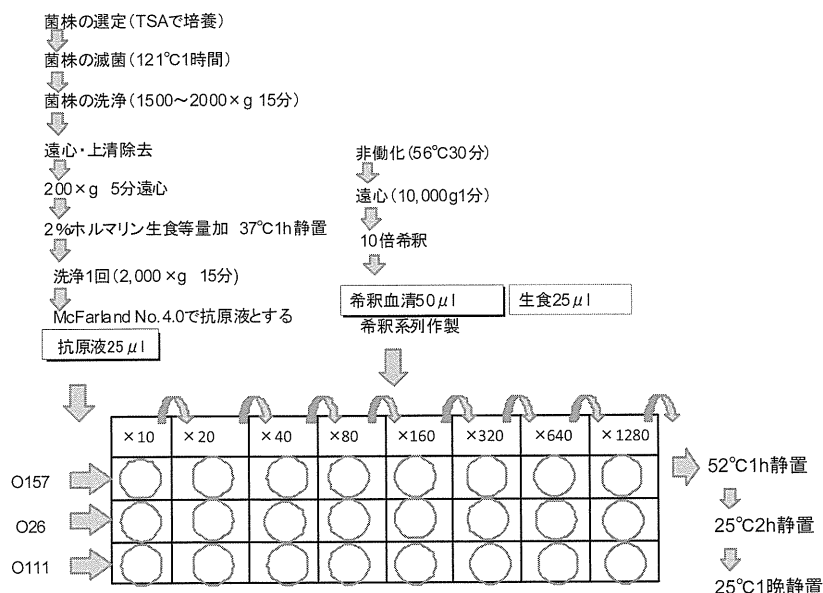


図1. マイクロプレート(V底)による血清抗体価の測定法

表1. 分離されたEHECのO血清群型別抗大腸菌O111LPS抗体陽性患者数

G ¹⁾	分離菌 EHEC ²⁾	抗体陽性患者 /検査患者数	溶血性尿毒症症候群 (HUS)	非溶血性尿毒症症候群	
				血便あり	血便なし
A	-	16/22 (72.7%)	12/12	3/4	1/6
B	O111& O157	8/9 (88.9%)	6/6	2/2	0/1
C	O111	10/11 (90.9%)	7/8	3/3	0/0
D	O157	2/3 (66.7%)	0/0	2/2	0/1
	計	36/45 (80.0%)	25/26 (96.2%)	10/11 (90.1%)	2/8 (25.0%)

1): 分離された菌のVT遺伝子の保有と血清群により患者をA~Dに分類した。A: VT遺伝子を保有する大腸菌が分離されなかった患者グループ。B: EHEC O111 (VT2)とO157 (VT1,2, VT1, VT2のいずれかまたは複数)の両血清群が分離された患者グループ。C: EHEC O111 (VT2)のみ分離され、EHEC O157は分離されなかった患者グループ。D: EHEC O157 (VT1,2またはVT1)が分離されたが、O111 (VT2)は分離されなかった患者グループ。

2): 分離されたEHECの血清群を示す。いずれのグループにも大腸菌O111 (VT-)のみ分離された患者を含む。

表2. 本事例における抗大腸菌LPS抗体価のO111とO157の比較

G ¹⁾	分離菌 EHEC	抗大腸菌 LPS抗体価	最高血清希釈濃度別患者数 ²⁾									
			≤10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
A	-	O111	4	2			1	7	5	2		1
		O157	10	3	5	4						
B	O111& O157	O111	1					2	2	3	1	
		O157	4	1		1	2		1			
C	O111	O111	1				1	2	3	4		
		O157	7	1	2		1					
D	O157	O111	1							2		
		O157	1		1		1					
	合計	O111	7	2			2	11	12	9	1	1
		O157	22	5	7	6	4		1			

1): 分離された菌のVT遺伝子の保有と血清群により患者をA~Dに分類した。A: VT遺伝子を保有する大腸菌が分離されなかった患者グループ。B: EHEC O111 (VT2)とO157 (VT1,2, VT1, VT2のいずれかまたは複数)の両血清群が分離された患者グループ。C: EHEC O111 (VT2)のみ分離され、EHEC O157は分離されなかった患者グループ。D: EHEC O157 (VT1,2またはVT1)が分離されたが、O111 (VT2)は分離されなかった患者グループ。

2): 測定した抗大腸菌LPS O111, O157それぞれの血清抗体価のうち、もっとも高かった血清抗体価を示した。

細菌の分子生物学的性状解析、 既知病原因子の同定および細菌学的性状解析

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所・細菌第一部

研究協力者 伊豫田淳、三戸部治郎、寺嶋 淳、泉谷秀昌
(国立感染症研究所・細菌第一部)

研究要旨 富山県を中心に発生した腸管出血性大腸菌(EHEC)集団事例における分離菌の分子生物学的性状解析および既知病原因子の同定と、分離菌株の病原性状を明らかにすることを目的とした。富山県より分与された EHEC O111 菌株の Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法による解析を実施した。富山県で分離された EHEC O111 菌株の中で、*stx2* 遺伝子陽性株および *stx2* 陰性株は同一の MLVA 型を示し、EHEC O111 *stx2* 陰性株は EHEC O111 *stx2* 株から派生したクローンであることが示された。また、これまで国内で分離された EHEC O111 菌株との比較から類似の MLVA 型を持つ菌株は存在しなかった。本事例で分離された EHEC O111 *stx2* 株が他の EHEC O111 株あるいは EHEC O157 株と比較して、同程度の細胞付着性が示された。また、*stx2* 毒素産生性も他の菌株と比較して有意に高い結果は得られなかった。EHEC 菌株の *in vivo* での病原性評価は困難であり、現時点で今回の事例で重症化例が多数におよんだことを、菌側の毒性の強さで説明する細菌学的な解析結果は得られなかった。

A. 研究目的

富山県を中心に発生した腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 集団事例における分離菌の分子生物学的性状解析および既知病原因子の同定と、分離菌株の病原性状を明らかにすることを目的とした。

本事例で分離された EHEC の血清群 O111 株は、臨床分離 EHEC の中の 2% 程度を占める、比較的稀な血清群である。そのため、EHEC の中で分離頻度の高い血清群 O157 と比較して、菌株の性状に関する知見、または分子疫学解析の知見の蓄積は充分ではない。従って、事例調査に必要な菌株の同一性を示す分子タイピング法は複数の方法を組み合わせて行うことが重要となってくる。本研究では、Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法に加えて、Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法を用いて、菌株の同一性確認試験を行う必要があった。加えて、本事例においては EHEC の病原性に必須である志賀毒素 (Stx1 および Stx2、それぞれ VT1 および VT2 との呼称があるが、本報告書においては Stx を用いた) 遺伝子を持たない O111 株が有症事例から分離される例が多数あった。O111 志賀毒素非産生株は病原性を持たないと考えられる。しかしながら、実験室内での継代によって容易に毒素遺伝子が消失する EHEC 株が存在することも知られている。つまり、事例から分離される毒素産生株と非産生

株との比較解析も重要である場合がある。毒素遺伝子検索および PFGE 法においては、*stx2* 毒素遺伝子あるいはそれをコードするファージの脱落が予想される変化が認められていた。そこで、ファージ脱落の影響を受けないと考えられる MLVA 法において毒素産生株と非産生株との比較解析を行うことで両者の遺伝的関係を検討する必要があった。

本事例では多数の重症化症例が認められ、本事例の原因となった EHEC 菌株の病原性が高かった可能性がある。EHEC の病原性発揮には、腸管付着性と志賀毒素産生性が必須であると考えられる。EHEC は血清分類的には、多様な型に分類されるが、臨床検体から分離される EHEC の多くは、細胞付着因子として LEE 因子を保持している。また、毒素遺伝子として *stx1* および *stx2* 遺伝子のどちらか、あるいは両者を保有する。EHEC の病原性の強弱が存在することに関して、いまだ未確定なことが多く残されているが、一つには、細胞付着因子、あるいは志賀毒素の発現量が菌株によって異なり、病原性に影響を与えている可能性が存在する。さらには、これらの主要な病原因子以外の病原因子が病原性を修飾している可能性も存在する。

MLVA を用いた分子タイピング法を利用した菌株の性状解析と、毒素産生性、細胞付着性ならびに有機酸耐性における本事例由来株と他の O111

菌株との比較解析をおこなった。

B. 研究方法

MLVA 法

定法により各菌株の DNA を調製し、既報に従って 18 遺伝子座についてマルチプレックス ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により標的部分を増幅した。続けてシークエンサー泳動装置により PCR によって生じた DNA を分離し、増幅産物の大きさを測定した。測定値から各遺伝子座におけるタンデムリピートのリピート数を算出し、各菌株の MLVA 型を判定した (Microbiology and Immunology 2010; 54: 569-577)。

細胞付着性の評価

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地で培養した菌体 (1.5×10^7) を 1.5×10^5 個の HeLa 細胞へ 4 時間感染させ、アクチンおよび DNA をローダミンファロイジンおよび DAPI で染色し、顕微鏡観察を行った。用いた菌株は以下の通りである。

1. EHEC O157 Sakai 株
2. EHEC O157 clade8 株 (NIID No.061240)
3. EHEC O111 ゲノム参照株 (NIID No.011128)
4. EHEC O111 VT2+ (福井) (NIID No.110511)
5. EHEC O111 VT2+ (富山) (NIID No.110512)
6. EHEC O111 VT- (富山) (NIID No.110514)
7. VT2+ (NIID No.060005)
8. HUS VT1+VT2+ (NIID No.082426)

毒素産生量の評価

Reversed passive latex agglutination 法により毒素産生量を評価した。VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研株式会社)を用いた。2 ml LB 培地に菌体を接種し、37°Cで浸とう培養(対数増殖期後期まで)を行った。遠心後菌体をポリミキシン B (1 mg/ml PBS) で懸濁し、遠心上清を得た。得られた上清を 2 倍から 128 倍まで希釈し、感作ラテックス VT1 および VT2 と混合し、96 穴プレートで混合した。室温で数時間放置後判定した。判定は、コントロールラテックス[陰性コントロール]、精製 VT1, VT2 毒素[陽性コントロール]との反応性を比較することで行った。

リアルタイム PCR による VT2 遺伝子コピー数の定量

テンプレート 富山衛研から送付された PFGE 用プラグの一部 (5mm 角) からゲノム DNA を Wizard SV-Gel PCR clean up kit (Promega cat# A9281)を用いて精製し、100 μ l の精製水に溶解した。*stx2* 陰性のコントロールは細菌第一部で保存していた O111*stx2*(-)株 (NIID070043) の PFGE 用プラグから同様に精製した。検量線用サンプルと

して *stx2* 安定株である O111*stx2*(+) 富山株 (NIID110512) のゲノム DNA (22.5ng/ μ l) から 5 倍希釈系列を作製した。

内部標準 Cycleave PCR O157(VT1/VT2) Typing kit (Takara, cat.#CY222)を用いて *stx2* 遺伝子を定量した。内部標準として大腸菌群に共通な 6S-RNA をコードする *ssrS* 遺伝子を Taqman probe 法で検出した (Mitobe et al, 2008, J. Biol. Chem., 283, 5738-5747)。以下のプライマーとプローブを同一の反応系に加え *ssrS* 遺伝子の増幅が *stx2* 遺伝子の増幅に影響しないことを確認した。

*ssrS*82F : 5'-TCGGACGGACCGAGCAT-3', 250nM
*ssrS*147 : 5'-GACCCGATATTTTCATACCACAAGA-3', 250nM
*ssrS*100T:
5'-VIC-CTCACCAACCGCGGAGCGC-TAMRA-3', 125nM

リアルタイム PCR リアルタイム PCR は添付されている VT2 Primer/Probe Mix (配列は非公開)を用いて上記のテンプレートを 1 μ l、*ssrS* 遺伝子のプライマーとプローブを上記濃度で加え、全容量 25 μ l で行った。反応条件はキットの説明書に従い、ABI Prism 2000 にて 95°C 10 秒熱変性した後、95°C 5 秒、55°C 10 秒、72°C 34 秒のサイクルを 45 回行い *stx2* 遺伝子を FAM で、*ssrS* 遺伝子を VIC の蛍光で検出した。各遺伝子の希釈系列から検量線を作製し、サンプルに含まれる遺伝子の絶対量を定量した。次いで各テンプレートに含まれる DNA 量を *ssrS* 遺伝子でノーマライズし、*stx2* 安定株の *ssrS* 遺伝子に対する *stx2* 遺伝子のコピー数を 1 とすることでサンプルに含まれる *stx2* 遺伝子の相対量を決定した。

有機酸に対する耐性試験

2 ml LB 培地で 30°C一晩培養した菌株を、5ml の新しい LB 培地に 1/100 接種し 37°Cで 3 時間培養した。約 1×10^6 cfu に相当する菌液を 100 倍容量の D/L-乳酸 (0.1 M, pH2.0) に加え 24°C 10 分反応させたのち、その 0.1 μ l をりん酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.5) で中和した。元の菌液から 1,000 倍希釈した、約 1×10^3 cfu に相当する菌液を、LB プレート上にスポットし、37°Cで一晩培養し感受性を観察した。

(倫理面への配慮)

患者情報と分離菌の情報は、連結不可能な匿名化を行った。管理 PC のパスワード管理をしており、第三者は容易にアクセスできないようにしている。分離株についても管理区域で 3 重の鍵管理を行っており、厳密な情報管理を実施している。

C. 研究結果

MLVA 法による分子タイピング

これまで国内で分離された O111 菌株および本事例で分離された O111 菌株の MLVA 解析結果をもとに Minimum Spanning Tree を描いた。本事例で分離された菌株は、これまで分離された菌株とは異なる MLVA 型を示した (図 1)。また、事例由来株のうちほとんどの菌株は同一の MLVA-O111-A 型を示した。解析した 18 座位中 1 座位のみが異なる Single Locus Variant (SLV) が存在したが、MLVA-O111-A 型とクラスターを形成した (図 1)。さらに、*stx2* 遺伝子を持たない O111 菌株においても、MLVA-O111-A 型を示し O111 *stx2* (-) 株は *stx2* 遺伝子が脱落した同一クローンからの派生株であることが示唆された。

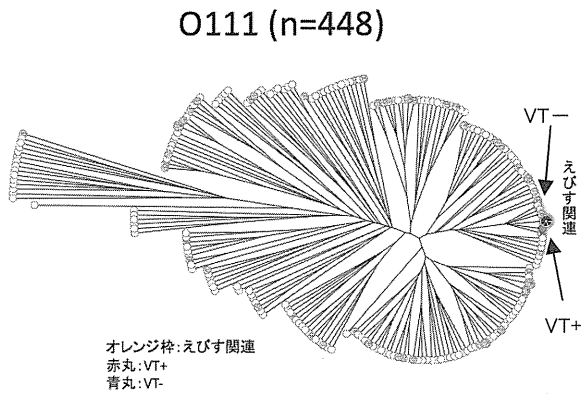


図 1

細胞付着性に関する評価

今回の事例から分離された菌株 (NIID No.110511、110512、110514) の細胞付着能、マイクロコロニー形成能を調べるために、HeLa 細胞への感染実験を行った。

本事例株は HeLa 細胞付着能を示し、またマイクロコロニーを形成することが認められた (図 2)。EHEC O157 Sakai 株、Clade 8 株との比較においても、細胞付着性、マイクロコロニー形成能に著しい差は認められなかった (図 2)。また、細胞侵入能も確認されなかった。

Bacterial attachment to and micro-colonies formation on HeLa cells

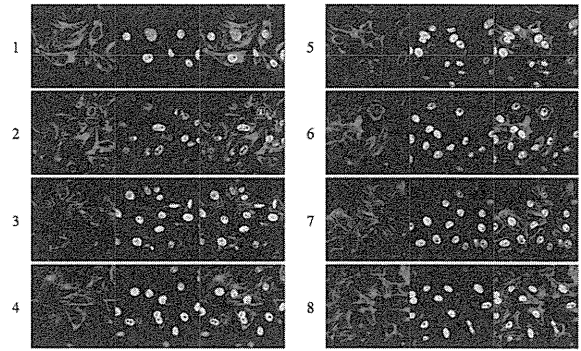


図 2

志賀毒素産生性に関する評価

一般に腸管出血性大腸菌感染症の重症化には Stx2 の産生量が関連していると考えられている。

RPLA analysis		
Strains	VT genotype	RPLA for VT2 (dilution)
O111 genome [BD]	VT1, VT2	32
110511 (Fukui) [HUS]	VT2	64
110512 (Toyama) [HUS]	VT2	64
110514 (Toyama) [HUS]	negative	-
110519 (Toyama) [HUS]	negative	-
072269 [D]	VT1, VT2	16
082426 [HUS]	VT1, VT2	16
090756 [HUS]	VT1, VT2	128
091558 [D]	VT1	-
O157 genome (Sakai)	VT1, VT2	128
O157 clade 8-1 [HUS]	VT2	64
O157 clade 8-2 [HUS]	VT2	128

表 1

本事例由来株の Stx2 毒素産生量と本事例の重症化率の高さが関連している可能性を確認するために、RPLA 法によって毒素産生量を検証した。

本事例由来株の菌体懸濁液の希釈系列検体では、最大 64 倍希釈で毒素陽性反応が認められた (表 1)。*stx2* 遺伝子陰性株においては、毒素陽性反応は認められなかった。本事例以外で分離された EHEC O111 ゲノム配列決定株 (O111_11128 株)、HUS 症例由来 EHEC O111 株 (082426, 090756 株)、EHEC O157 Sakai 株、EHEC O157 Clade 8 株における毒素陽性反応を示す最大希釈度数は 16-128 であった。このことから、本事例由来株が著しく毒素産生性が高いことを示すデータは得られなかった (表 1)。

有機酸に対する耐性試験

O157 ゲノム株は胃酸である塩酸に対しては耐性を示すが、比較的濃度 (50-100 mM) の乳酸に感受性があることが示されている。今回の事例で分離された O111 株の性状解析の一環として乳酸に対する感受性試験を行った。

100 mM 乳酸で 10 分間処理した O111 菌株と、O157 菌株の生存性を図 3 に示した。

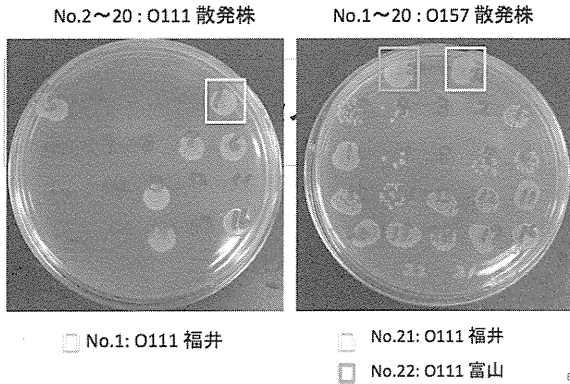


図3

今回の O111 分離株は 100 mM 乳酸で 10 分間処理に対しても生存することが示され、耐性度が高いことが示唆された。一方で、これまでに国内で分離された様々な EHEC O111 散発事例由来 19 株のうち 6 株のみが耐性を示し、13 株は感受性であった。同様に EHEC O157 散発事例由来 20 株の解析結果からは、3 株が感受性、7 株が低感受性、10 株が耐性を示した。

stx2 遺伝子コピー数の定量

本事例の特徴の一つとして、血清群 O111 の stx2 遺伝子陽性株と陰性株が分離されたことがあげられる。しかしながら、それらは MLVA 法では同一のクローンの菌株であること、PFGE 法を用いた解析では 2 バンド違いの XbaI 切断パターンを示すこと、さらに XbaI 切断パターンの比較からは EHEC O111 stx2(+)株ゲノムに約 60-Kb の欠失がおきたことが推測された。また、EHEC O111 stx2 (+)株が継代等の実験室内での作業において、stx2 (-)株に変換することが観察されたとの情報を富山県衛生研究所から得ていた。そこで、stx2 の脱落頻度をリアルタイム PCR により検討することとした。

内部標準として大腸菌群に共通な 6S-RNA をコードする *ssrS* 遺伝子を用い、Cycleave PCR O157(VT1/VT2) Typing kit (Takara, cat.#CY222)を用いて stx2 遺伝子を定量した。stx2 安定株における *ssrS* 遺伝子に対する stx2 遺伝子のコピー数を 1 とすることでサンプルに含まれる stx2 遺伝子の相対量を決定した。継代後も全てのコロニーが stx2 (+)のものを stx2 安定株とした。

富山衛研から送付された EHEC O111 stx2 (+)株の中で、PFGE パターンが stx2 (-)のものとの区別が出来なかった菌株を stx2 が不安定な株の可能性があると考え、解析に用いた PFGE 用プラグの一部 (5mm 角)からゲノム DNA を抽出して解析した。図 4 に示す通り、プラグによって *ssrS* に対する stx2 の相対量は異なり、stx2 安定株と比較しておよそ 1/10 から 1/1,000 程度の値であった。プラグ作成時においても stx2 の欠失があることが示唆された。

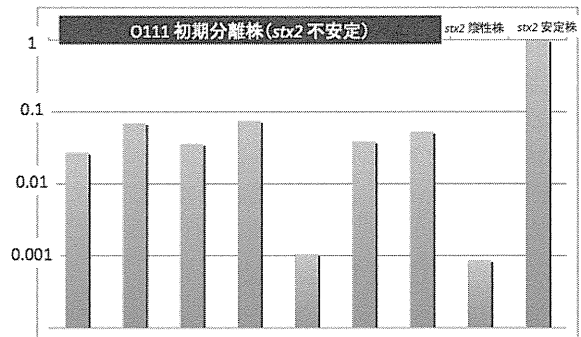


図4

stx2 ファージの全塩基配列決定法の確立

今回の事例で分離された EHEC O111 stx2(+)ゲノムから stx2 遺伝子の欠失が容易におこることを上記の実験で示した。これは stx2 ファージの脱落に伴うものであることが推測された。そこで stx2 ファージの不安定さをもたらす要因がファージゲノム上にあることを想定した。そのためには、不安定株からのファージゲノム情報を得る必要がある。そこで、まずは EHEC O111 stx2(+)に溶原化している stx2 ファージゲノムの全塩基配列を決定する実験系の確立を目指した。溶原化部位は tRNA 遺伝子 *argW* であることが本研究分担研究者である関塚らによって示唆された。そこで *argW* 遺伝子周辺領域で、多様な大腸菌において広く保存されている遺伝子 *yfdC* と *lacY* 遺伝子とを、さらに stx2 ファージを含む λ 様ファージに広く保存されている *lom* 遺伝子を利用し、long PCR において stx2 ファージゲノムを 3 分割して増幅させることに成功した。

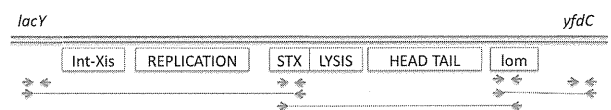


図5

関塚らによって進められていたゲノム全塩基配列作業から推測された配列を基に、240 本の配列決定用プライマーを作成した。増幅 PCR 産物をテンプレートに stx2 ファージゲノムの決定を行った。全長 58,138 bp が決定された。

D. 考察

本事例では *stx2* 陽性の血清群 O111 大腸菌株が分離された。同時に血清群 O111 大腸菌 *stx2* 陰性株が分離された。これらの菌株の遺伝的類似度を検証するために、MLVA 法を用いて解析を行った。少数の多型性を持つ菌株が存在したが、*stx2* 遺伝子の有無にかかわらず、同一の MLVA 型を示す菌株が多数をしめた。このことは、今回の事例で分離された血清群 O111 菌株は遺伝的に単一の集団であることが示唆された。

PFGE 法でも同様の結果が得られているが、*stx2* 遺伝子の有無によって PFGE パターンは異なる。より詳細で確実な解析を行うためには PFGE および MLVA 法による解析を行い多角的に検証することが有効であると考えられた。

本事例で分離された EHEC O111 菌株の細菌学的性状解析を行った結果、他の事例における O111 菌株あるいは O157 菌株との細胞付着性、毒素産生性に大きな差は認められなかった。*stx2* 遺伝子の相対的コピー数の解析から、実験室内の環境において分離された当初の株は *stx2* 遺伝子の欠失 (*stx2* フェージの脱落に伴う) が起きることが推測された。当研究所に分与された今回の事例分離株 EHEC O111 *stx2* はいずれも既に *stx2* 遺伝子の欠失が認められない安定株であった。つまり、我々の解析結果は安定株における性状であり、実際の *in vivo* での性状を反映していない可能性がある。毒素産生量に関しては、我々の *in vitro* における毒素産生量の評価は、*stx2* フェージの安定化によって正に影響している可能性が存在する。つまり、菌集団内における毒素遺伝子を保持した菌細胞数の比率が高まること、見かけ上毒素産生量を高く評価することに繋がる。一方、逆に負の影響の可能性も否定できない。*stx2* 遺伝子発現量は溶源化フェージの誘導によって増大することが知られている。つまり、フェージの不安定さが *stx2* 遺伝子発現量を増大させている可能性がある。*in vivo* における *stx2* 遺伝子発現量を正確に知ることは困難であるが、少なくとも *stx2* 遺伝子の相対的コピー数解析のデータをもとに解析サンプルの *stx2* フェージの安定性を評価することは重要であると考える。また、同時に *stx2* フェージ不安定株のフェージゲノムの全塩基配列の決定と、安定株におけるフェージゲノム塩基配列とを比較することも残された課題である。今回、Long PCR でフェージゲノムが増幅可能であることが示された。*stx2* フェージ不安定株の選定し、配列決定し比較解析する予定である。

有機酸抵抗性が今回の集団事例の特性の一つと考えられる。しかしながら、有機酸抵抗性のメカニズムはいまだ十分に明らかにされていない。本事例の O111 分離株の有機酸抵抗性メカニズム

を明らかにするとともに、その病原性に与える影響を検討することも今後の課題となる。

E. 結論

複数の分子タイピングを併用することで、本事例から分離された血清群 O111 菌株の遺伝的類似性が示された。また、重要な病原因子である *Stx2* 毒素遺伝子の容易に欠失する可能性を示唆するデータを得た。他の菌株との *in vitro* での性状比較から、強毒性である可能性を示唆するデータは得られなかった。EHEC 菌株の *in vivo* での病原性評価は困難である。現時点で今回の事例で重症化例が多数におよんだことを、菌側の毒性の強さで説明する細菌学的な解析結果は得られなかった。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、大西 真 腸管出血性大腸菌感染症の最近の動向 食品衛生研究 61、7-15、2011
- 2) 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、大西 真、渡辺治雄 腸管出血性大腸菌サーベイランス 感染症サーベイランス—その役割と展望 臨床と微生物 38、59-63、2011
- 3) 寺嶋 淳 質疑応答 腸管出血性大腸菌の血清型と毒性 日本医事新報 4555、64-65、2011
- 4) 寺嶋 淳 生食と腸管出血性大腸菌 特集 生食のリスク 公衆衛生 76 巻、19-23、2012

2. 学会発表

- 1) 井口 純、伊豫田淳、勢戸和子、大西 真 既存の血清型では分類できない腸管出血性大腸菌の解析 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2011,7 大阪
- 2) 伊豫田淳 緊急セミナー：腸管出血性大腸菌の今、「非典型的な腸管出血性大腸菌が保有する病原因子の解析」日本細菌学会関東支部・ICD 制度協議会共催 2011,8 東京
- 3) Iyoda S.: Regulatory interactions of genes encoding protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Symposium BA-4 "Bacterial Gene Regulatory System" International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress (第 84 回日本細菌学会総会共同開催), Sapporo, Japan, September, 2011.
- 4) 石原朋子、三浦雅史、伊豫田淳、泉谷秀昌、渡邊治雄、大西 真、寺嶋 淳 タイプ 3 エフ

ェクターEspO1-2 は、腸管出血性大腸菌の感染細胞内において EspM2 を介した RhoA 活性を制御する 第 94 回日本細菌学会関東支部総会 2011,10 東京

- 5) 大西 真 ドイツで問題となった腸管出血性大腸菌 O104 第 11 回人と動物の共通感染症研究会 2011,11 東京
- 6) 大西 真 グローバル化する腸管感染症 第 11 回 バイオセーフティ学会 2011,12 筑波
- 7) 大西 真 グローバル化する腸管感染—EHEC

O104 感染症— 第 2 3 回 岩手 Farm to Table フォーラム研究会 2012,2 盛岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ゲノム解析による系統解析と病原性因子の探索

研究分担者 関塚剛史 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

研究協力者 黒田 誠 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室)
竹内史比古 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室)

研究要旨 2011年に富山県、福井県および神奈川県で腸管出血性大腸菌(EHEC)血清型 O111 を中心とする重症化の傾向が高い集団食中毒事例が発生した。本事例分離菌株の特徴を俯瞰的かつ包括的にゲノムレベルで解明するため、過去に分離された O111 菌株も含めた、ゲノム配列情報による系統解析と比較解析を行った。本事例の大腸菌分離株は、O111 血清型の系統であることが分かった。また、本事例分離菌 3 株は、分離地域およびベロ毒素(verotoxin: VT)2 を有するファージ(VT2 ファージ)の有無に関わらず同一クローン由来であり、本事例以前に分離された他の O111 分離株とは同一ではなかった。VT2 ファージとそのゲノム挿入部位の比較解析の結果、HUS 発症株 3 株の VT2 ファージは O157 clade 8 の VT2 ファージに類似性が認められた。本事例分離菌株は 3 つのプラスミドを有し、それら完全長配列を決定したが、既知の病原性因子の存在は見いだせなかった。また、本事例の患者糞便検体中の実態を調べるため、患者糞便中の DNA を網羅配列解読にて解析した。供試した全患者検体は、非常に類似した細菌叢を構成していた。血清型と相関する遺伝情報を用いた系統解析の結果、本食中毒事例は大多数の血清型 O111 の大腸菌による事例であることを示唆していた。さらに、本事例は O111 と O157 の両方が分離されているが、患者糞便中の存在比率を定量的に解析したところ、O111 のほうが圧倒的に O157 よりも多く、主に O111 による事例であることが示唆された。

A. 研究目的

2011年4月に富山県、福井県および神奈川県で血清型 O111 を中心とする腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団食中毒が発生し、死亡者が出た。国内外において、従来の EHEC 感染症は O157 による発症が多く、本事例ほど重症かつ経過が遷延する例や死亡例が多い事は報告されていない。また、O111 による同様な事例は殆ど無く、詳細な解析が必要であった。

本研究では、本事例および過去に国内で分離された O111 の分離菌株のゲノム解析を行い、本事例の菌株が、どのような特徴を有するかをゲノムレベルで理解することを目的とした。また、本事例では、O111 以外に、O157 も患者検体から分離された。そこで我々は、糞便のメタゲノム解析を行い、本事例の EHEC 感染患者の腸管内の主要な EHEC を網羅解読配列から推定する事を試みた。更に、本事例の腸管内細菌叢と EHEC 感染症以外の細菌叢を比較し、EHEC 患者の腸管内の実態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. O111 分離菌株のゲノムシーケンス

本食中毒事例で分離された 3 株および 2006 年

から 2009 年までに国内各地で分離された 10 株の O111 を供試した(表 1)。分離培養された菌体は、溶菌後、フェノール・クロロホルム (PCI) 抽出を行い、ゲノム DNA を回収した。得られたゲノム DNA から genomic DNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)もしくは Nextera™ DNA Sample Prep Kit (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA)を用いて約 600-700 bp のインサート長の Illumina DNA ライブラリーを作製した。Illumina 社 Genome Analyzer Iix にて、13 株の O111 菌株の DNA ライブラリーをペアエンド解読し (81 mer を約 1,200 万本以上 x2)、解読リードを取得した。

2. 大腸菌のゲノム情報による分子系統分類解析

公共データベース (GenBank) から 30 株の完全長配列が決定している大腸菌のゲノム配列を入手した (表 2)。取得したゲノム配列から 40mer の疑似リードを作製した。完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム配列をレファレンス配列とし、イルミナ解読リードおよび疑似リードを maq v0.7.1 マッピングソフトにて比較解析し、single nucleotide polymorphism (SNP)を網羅的に抽出した。重複するプロファージ配列および染色体

のリピート配列上の SNP は、解析対象から除外した。各株で得られた SNPs アレルを連結して疑似配列を作製し、アライメント結果を最尤法 (RAxML を使用) にて系統樹作製を行った。

3. EHEC O111 および O157 のゲノム比較解析

O111 各株のイルミナ解読リードを abyss-pe (ABYSS) 1.3.1 にて *de novo assemble* を行い、contig を作製した。得られた contig から、GeneMarkS version 4.6b を用いて open reading frame (ORF) を抽出した。公共データベース (GenBank) から 18 株の O157 および O111:H-11128 株の完全長およびドラフトゲノム配列と ORF 情報を入手した (表 3)。O157 TW14359 株をレファレンス配列とし、31 株の ORF のアミノ酸配列を BLASTP 検索にて比較解析した。比較解析の図示化は、GView ソフトを用いた。

4. 本事例分離菌株 O111 110512 株のプラスミド配列の確定

上記で作製した、本事例分離菌株 O111 110512 株の contig より plasmid 様配列を抽出し、それらのギャップクローリングをおこなった。プラスミドをギャップの無い complete 配列として確定後、GeneMarkS version 4.6b を用いて ORF を抽出した。得られたプラスミド配列および ORF を NCBI nt および nr データベースに対して BLASTN および BLASTP 検索し、比較解析を行った。結果の図示化は、IMC-GE ソフト (インシリコバイオロジー) を用いた。

5. 糞便検体の網羅解読解析

本事例の富山県患者 5 名の糞便検体を用いた (表 4)。比較対象として、成人健常者 1 名および EHEC 感染症ではない小児患者 8 名の糞便検体を供試した。100 mg の糞便を 10 ml の TE に懸濁し、lysozyme および achromopeptidase (精製品) にて酵素的に細菌の細胞壁を破壊後、sodium dodecyl sulfate にて懸濁液が透明になるまで混和し、細菌を溶菌した。溶菌後の検体は、proteinase K 処理および PCI 抽出を行い、除タンパクを行った。DNA をエタノール沈殿で回収し、更に QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN) にて糞便由来不純物を除去し、DNA を回収した。得られた DNA を用いて、上記手法と同様に Illumina DNA ライブラリーを作製し、解読リードを取得した。

全取得解読リードからヒトゲノム配列を削除するため、bwa (v0.6.1) を用いてヒト・リファレンス配列にマッピングし、マッピングしなかった解読リードを回収した。更に、ヒト・リファレンス配列に MEGABLAST 検索し、ヒト配列を可能な限り削除した。残った解読リードを NCBI nt デー

タベースに対し MEGABLAST 検索し、MEGAN (v4.61.7) にて類似性が見られた生物種ごとに分類した。

糞便検体中の大腸菌の系統分類およびその割合を解析するために、O111:H-11128 株のゲノム配列をレファレンス配列とし、全取得解読リードを maq v0.7.1 にてマッピングし、各検体の SNP 情報を抽出した。その後、大腸菌の各系統および株特異的な SNP を有する配列数を抽出し、それぞれの解読配列のカバー率を算出し、検体中の大腸菌各系統の割合を比較解析した。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出等を行った。患者配列を特定する作業は行われず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

C. 研究結果

1. 大腸菌のゲノム情報による分子系統分類解析

解読した大腸菌が、ゲノム配列情報からでも O111 血清型の系統であるかを確認するため、これまで全ゲノム情報が明らかとなっている大腸菌および今回解読した菌株のゲノム情報から SNP を抽出した。染色体上に存在するリピート領域 (ファージ領域、リボソームオペロン、パラログ遺伝子等) は、今回の解析で除いた。用いた 30 株の大腸菌で保存された領域は、約 5.4 Mb の染色体中、53.5% であった。その保存された領域中に、142,851 箇所 of 株固有の SNP を検出した。それら SNP を用いた系統解析の結果、各大腸菌は、腸管外病原性大腸菌 (ExPEC)、O157、非病原性実験株、O111 のクラスターに分かれた (図 1)。今回ゲノムシーケンシングを行った 13 株の大腸菌は、O111 のクラスターに分類され、ゲノム情報から見ても O111 血清型の系統であった。

O111 分離株のみの解析では、約 5.4 Mb 中の染色体で保存された領域は、85% (4,568,377 箇所) であり、その領域中に 2,073 箇所 of 株固有の SNP を検出した。それら SNP を用いて系統解析を行った結果、本事例分離菌 3 株は、これまで分離された O111 大腸菌とは異なるクラスターを形成し、2008 年に茨城で分離された溶血性尿毒症症候群 (HUS) 発症株とは異なるクラスターに位置した (図 2)。また、本事例分離菌 3 株は、分離地域の差異およびベロ毒素 VT2 の有無に関わらず同一であった。

2. EHEC O111 および O157 のゲノム比較解析

本事例分離菌株は、VT2 の有無に関わらず、同一な系統を示した。そこで、VT2 を有するファージ (VT2 ファージ) の挿入箇所を特定するため、

O111 の解読リードを *de novo assemble* にて contig を作製し、完全長ゲノム配列が明らかになっている O111 11128 株と比較を行った (図 3、表 5)。本事例分離株の VT2 陽性 110511 および 110512 株は、VT2 陰性 110514 株との比較により、*stx2* を含む VT2 フェージが tRNA^{Arg} (*argW*) の位置に挿入されていたことが明らかとなった (図 3)。また、110511 および 110512 株は、11128 株とは異なる位置に VT2 フェージが挿入されていた (図 3)。

EHEC O157 は、過去の報告から主に 3 つの Lineage および 8 つの clade に系統分類され、特に Lineage I/II の clade 8 は、他の系統よりも HUS 発症頻度が高い事が報告されている。本事例での EHEC O111 感染症は、HUS および脳症発症頻度がこれまでの O111 による事例よりも高い事が、疫学および臨床研究から示唆されている。そこで、EHEC O157 と O111 との染色体上の ORF 単位での比較を行った (図 4)。Lineage I/II の clade 8 である O157 TW14359 株と比較すると、O111 で共通して ORF が欠失若しくは TW14359 の ORF と相同性が低い箇所が多く認められた。一方、TW14359 株に於いても *argW* に VT2 フェージが挿入されており、そのフェージ構造は O157 clade 8 株間では高度に保存されていたが、O111 株間ではその領域において多様性を示した (図 4)。HUS を発症している本事例分離株 110511、110512 および 2008 年に茨城で分離された HUS 発症株 082426 は、TW14359 株の VT2 フェージ構造と部分的に類似しているが同一ではなく、三者のその構造は類似していた。

3. 本事例分離菌株 O111 110512 株のプラスミド配列の比較解析

本事例分離菌株のプラスミド上に特徴的な病原性因子が存在するかどうか確認するため、110512 株の 3 つの plasmid の完全長配列を決定した (図 5 および 6)。完全長配列が決定した pEBS512-1、pEBS512-2 および pEBS512-3 は、それぞれ 46,350 bp、6,674 bp および 5,424bp であった。pEBS512-1 は、*Salmonella enterica* serovar Enteritidis Sal550 株の plasmid pSE34 に類似した構造を持ち、その中に *E. coli* H22 株の plasmid MccC7-H22 に類似した配列が存在し、さらにその中に、新規領域が存在した (図 5)。その新規領域の近傍には、O157 clade 8 の 2 株、新生児髄膜炎発症株 S88 の有する plasmid 上の ORF とアミノ酸レベルで 99% の相同性を示した。pEBS512-2 は、O111 11128 株の持つ plasmid pO111_5 とほぼ同様な構造であった。pEBS512-3 は、*S. enterica* serovar Typhimurium の pSE-Kan および Bardo の pSeBardo-Kan と塩基配列レベルで 99% の相同性を示す箇所と *S. enterica* Enteritidis の pC に 95% の

相同性を示す箇所が存在した。しかしながら、今回配列決定した 3 つの plasmid 上には、これまで報告のある特徴的な病原性因子に高い相同性を有する ORF は認められなかった。

配列解読した O111 分離株 13 株と 11128 株に 3 つの plasmid が存在するかを比較した (表 6)。本事例分離株の 110511、110512 および 110514 では 3 つの plasmid が同様に存在していた。pEBS512-2 は、11128 株と 2006 年に福岡で分離された 061356 株には存在していたが、pEBS512-1 および pEBS512-3 は、本事例分離菌株以外からは検出されなかった。

4. 糞便検体の網羅解読解析

本事例の患者糞便検体 (n=5) に含まれる DNA の網羅解読を行った。供試した検体では、分離菌株の陽性および HUS 発症の有無が異なっている (表 4)。まず、各検体で検出された DNA の存在比率を算出した (図 7)。TIH004、TIH039 および TIH050 では、Bacteria 由来の配列が多く検出された。TIH036 および TIH092 は、大部分がヒト由来の配列であった (図 7)。全ての本事例の検体で、特徴的な腸管病原性のウイルスや寄生虫の配列は検出されなかった。検出された Bacteria 由来の配列を属レベルの割合で見ると、最優位菌は *Bacteroides* 属細菌であり、約 70–97% を占めていた。*Bacteroides* 属細菌の次に、*Escherichia* 属細菌が多く検出され、約 0.04–22.07% を占めていた。成人健常者糞便では、最優位菌は *Bifidobacterium* 属であり、約 45.8% であった。供試した本事例患者糞便検体の細菌叢は、全て類似した組成を示し、成人健常者糞便の細菌叢と比較すると、検出される細菌の組成が大きく異なっていた (図 7)。

大腸菌内の存在比率を見ると、本事例患者糞便検体では約 11.33–98.96% が O111 の系統に含まれる大腸菌であり、その存在比率に偏りがあった (図 8)。TIH092 検体は、分離菌株が不検出であったが、網羅配列解読の結果、O111 の系統に含まれる大腸菌が検出された。全ての本事例検体で、110511、110512 および 110514 株に特徴的な SNP を持つ配列が、最低 1 つは検出された。また、O157 の系統に含まれる大腸菌の割合は、検出限界以下もしくは 0.07–0.27% と非常に低率であり、O111 の検出率よりも明らかに低かった。一方、対照としたコントロール群 (成人健常者および EHEC 感染症を呈していない小児患者 8 名) では、EHEC O111 および O157 等の配列は殆ど検出されず、多種多様な大腸菌の系統が検出された。

D. 考察

大腸菌分離株のゲノム配列情報から、本事例分離株は、O111 血清型の系統であることが分かった

(図1)。さらに詳細に O111 内の分子系統解析を行い、本事例分離菌株は分離地域の差異および VT2 フェージの有無に関わらず3株で同一であることが分かった(フェージおよびリピート領域は解析対象外)(図2)。更に、3つの plasmid に於いても同一であった(表6)。他分担者による PFGE および MLVA の解析結果でも、本事例分離株は同一クローン由来である事が示唆されており、ゲノム情報を用いた分子疫学的解析でも同様な結果となった。それ故に、これら分離菌株3株は、同一の汚染源由来のクローンである事が強く示唆された。

O111 のフェージの挿入位置は、本事例分離株に特徴的なものでは無かった(表5)。しかしながら、HUS を発症している本事例分離株 110511、110512 および 2008 年に茨城で分離された HUS 発症株 082426 で、VT2 フェージの構造が類似していた(図4)。それらは、HUS 発症頻度の高い O157 clade 8 の VT2 フェージと構造が異なる領域が存在しているが、O111 における HUS 発症等の重症化に VT2 フェージの構造が重要である可能性が予測された。より詳細に理解する上でも、本事例分離株の完全長ゲノム配列の確定が必要だと思われる。

本事例分離株は、新規構造を有する pEBS512-1 および pEBS512-3 を保有し、過去に報告されている EHEC は保有していない(図5および6)。特徴的な病原因子に高い相同性を有する ORF は検出されなかった。pEBS512-1 には、高病原性の O157 clade 8 の2株および新生児髄膜炎発症分離株の plasmid に高い相同性を有する ORF が検出されたが、O157 clade 8 の分離株全てに保存されておらず、また、*in silico* による機能予測でも病原性を示唆する特徴的な機能ドメインは同定できなかった。現時点では、本事例の O111 において重症化を規定する要因は、plasmid である可能性は低いと予測される。

本事例患者糞便の網羅解析の結果、その細菌叢組成は患者間で共通しており、成人健常者のものとは大きく異なっていた(図7)。これまで、EHEC 感染患者の糞便細菌叢解析の報告は無く、この現象が本事例に特徴的なのか、EHEC 感染症に共通するかは不明である。しかしながら、ヒト個人間で大きく異なる腸内細菌叢が、本事例患者間で非常に類似していた知見は、大変興味深い。また、本事例患者中には、O111 がコントロール群よりも顕著に検出されており、EHEC が分離されていない検体でも O111 がその中に存在する事が示唆された(図8および表4)。更に、全ての本事例患者から、本事例分離菌株に特徴的な SNP を持つ配列が少なくとも1つは検出されており、網羅解読解析から見ても、全検体で同一な汚染源により感染

した可能性が予測された。供試した糞便検体から O157 が分離されているが、O157 由来の配列は、検出限界以下もしくは 0.07~0.27% と非常に低率であった(図8および表4)。他分担者による血清学的検査でも、本事例において O111 の血中抗体価は O157 のそれよりも高い事が明らかとなっており、本事例は主に O111 で生じた EHEC 感染症である事が糞便の網羅解読の結果からも強く示唆された。患者検体中の EHEC の分離は、その有無を判定するのに非常に重要であるが、異なる血清型の EHEC が複数混在する場合、それらの存在比率を明確にする必要が有る。本研究で行った、網羅解読による解析は、混在する EHEC の存在比率を明らかにする上で、非常に有用であると思われる。

E. 結論

本事例の分離株の特徴と、患者検体の特徴を俯瞰的かつ包括的に理解するために、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。本事例が何故これまでの EHEC 感染症よりも重症化するかを完全に解明するまでには至っていない。しかし、本研究で得られた下記の知見「① 本事例分離株は、本事例以前に分離された他 O111 分離株とは異なる」、「② 重症化に関与する要因が plasmid である可能性は低い」、「③ O111 の VT2 フェージ構造が少なからず HUS 発症等の重症化に関与する可能性がある」は、今後発生する恐れが有る O111 感染症の解析およびその重症化メカニズムの解明に非常に有用であると思われる。また、患者検体の特徴は、全検体で非常に類似しており、本事例の原因が、O111 である事が強く示唆された。EHEC 感染症での EHEC 以外の腸管内細菌の割合および動態を調べる事で、更にその感染症の理解にも繋がるとと思われる。本事例を更に理解する上でも、本事例分離菌株の完全長ゲノム配列を決定し、複数の O111 分離株の大規模なゲノム比較解析を行い、更に EHEC 感染患者糞便の網羅解読比較解析を行い、本事例の重要な特徴を抽出する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし
 2. 実用新案登録
 なし

3. その他
 なし

表1 本研究で用いたO111分離菌株

株名	性	備考	HUS発症の有無	VT1	VT2	入手先	
110511	M	集発(本事例)、死亡例	+	-	+	富山*	
110512	M	集発(本事例)、死亡例	+	-	+	富山	
110514	F	集発(本事例)	+	-	-	富山	
091558	M	散発	-	+	-	三重	
082426	M	散発	+	+	+	茨城	
072693	F	集発	-	+	-	宮崎	
072269	M	散発	-	+	+	福岡	
071207	M	集発	-	+	+	熊本	
061914	M	散発	-	+	-	神奈川	
061356	F	散発	-	-	+	福岡	
060538	M	散発	-	+	-	福岡	
060255	M	集発	-	+	+	山形	
060003	F	散発	-	-	+	鹿児島	
11128	不明	不明	完全長ゲノム配列決定株 (Ogura <i>et al.</i> , 2009)	-	+	+	不明

表2 本研究で用いた完全長ゲノム配列決定株

Strain name of <i>Escherichia coli</i>	Accession number	Feature	Serotype	genome size (bp)
UTI89	NC_007946.1	ExPEC	N/A	5,085,740
APEC O1	NC_008563.1	ExPEC	O1	5,082,024
S88	NC_011742.1	Meningitis isolate	O45:K1	5,032,267
ED1a	NC_011745.1	Avirulent strain	O81	5,209,547
CFT073	NC_004431.1	ExPEC	O8:K2:H1	5,231,427
536	NC_008253.1	ExPEC	O6:K15:H31	4,938,919
E2348/69	NC_011601.1	EPEC	O127:H6	4,965,552
SMS-3-5	NC_010498.1	Antibiotic resistant strain	N/A	5,068,388
IAI39	NC_011750.1	ExPEC	O7:K1	5,132,067
UMN026	NC_011751.1	ExPEC	O17:K52:H18	5,202,089
CB9615	NC_013941.1	EPEC	O55:H7	5,386,351
EC4115	NC_011353.1	EHEC	O157:H7	5,572,074
TW14359	NC_013008.1	EHEC	O157:H7	5,528,135
Sakai	NC_002695.1	EHEC	O157:H7	5,498,449
EDL933	NC_002655.2	EHEC	O157:H7	5,528,444
ATCC 8739	NC_010468.1	Avirulent strain	N/A	4,746,217
HS	NC_009800.1	Avirulent strain	O9	4,643,537
BL21-Gold(DE3)pLysS AG	NC_012947.1	laboratory strain	N/A	4,570,937
REL606	NC_012967.1	laboratory strain	N/A	4,629,811
K-12 substr. DH10B	NC_010473.1	laboratory strain	N/A	4,686,136
BW2952	NC_012759.1	laboratory strain	N/A	4,578,158
K-12 substr. W3110	AC_000091.1	laboratory strain	N/A	4,646,331
K-12 substr. MG1655	NC_000913.2	laboratory strain	N/A	4,639,674
12009	NC_013353.1	EHEC	O103:H2	5,449,313
E24377A	NC_009801.1	ETEC	O139:H28	4,979,618
IAI1	NC_011741.1	Avirulent strain	O8	4,700,559
SE11	NC_011415.1	Avirulent strain	O152:H28	4,887,514
55989	NC_011748.1	EAggEC	N/A	5,154,861
11368	NC_013361.1	EHEC	O26:H11	5,697,239
11128	NC_013364.1	EHEC	O111:H-	5,371,076

N/A: データベースに記載されておらず、詳細不明

表3 ゲノム比較解析に用いた大腸菌O157

Strain name of <i>E. coli</i> O157:H7	Accession number	Status	Lineage	clade
Sakai	NC_002695.1	complete	Lineage I	clade 1
EC4501	ABHT00000000	draft	Lineage I	clade 2
TW14588	ABKY00000000	draft	Lineage I	clade 2
EDL933	NC_002655.2	complete	Lineage I	clade 3
TW14359	NC_013008.1	complete	Lineage I/II	clade 8
EC508	ABHW00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4024	ABJT00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4042	ABHM00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4045	ABHL00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4076	ABHQ00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4113	ABHP00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4115	NC_011353.1	complete	Lineage I/II	clade 8
EC4196	ABHO00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4206	ABHK00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4401	ABHR00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
EC4486	ABHS00000000	draft	Lineage I/II	clade 8
FRIK2000	ACXO00000000	draft	Lineage II	
FRIK966	ACXN00000000	draft	Lineage II	

表4 網羅配列解読に供試した本事例糞便検体

検体番号	HUS	分離菌株
TIH004	+	O111:H- VT-
TIH036	-	O111:H- VT-
		O157:H7 VT1
		O157:H- VT12
TIH039	-	O111:H- VT2
		O111:H- VT-
		O157:H7 VT12
TIH050	-	O111:H- VT-
TIH092	+	菌不検出

図1. 全ゲノム情報を用いた大腸菌の SNP 系統解析

