

保育所関係者を対象とした腸管出血性大腸菌 O128 の スクリーニングと分離 ーリアルタイム PCR と免疫ビーズを用いた EHEC O128 の検出法ー

北橋智子¹⁾、奥島祥美¹⁾、吉原純子¹⁾、木原顕子¹⁾、都竹豊茂¹⁾、
三井良雄¹⁾、伊藤健一郎²⁾

1) 千葉市環境保健研究所 健康科学課 2) 国立感染症研究所

要 旨

平成 24 年 6 月、千葉市内で腸管出血性大腸菌 O128 の患者が発生した。患者が保育所に通う児童だったため、二次感染の有無を確認すべく、患者家族及び保育所関係者 127 名の検便を実施した。VT 遺伝子 (*vtx1*, *vtx2* 及び *vtx2f*) をターゲットにリアルタイム PCR でスクリーニングを行った。*vtx2f* 遺伝子陽性検体については、EHEC O128 が生化学的特徴がない大腸菌で選択培地がないため免疫ビーズ法で集菌・培養した。*vtx2f* 遺伝子陽性は 2 件 (患者陰性化確認便及び患者兄の便) で、共に EHEC O128 菌株を分離できた。スクリーニングで *vtx1,2* 遺伝子陽性検体 (保育所職員の便) が 1 件あり、O157・O26・O111 に対する免疫ビーズによる集菌を試みたが EHEC を分離することはできなかった。

多検体の患者便を検査するために、スクリーニングにはリアルタイム PCR を分離には免疫ビーズが有用であった。

1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (以下 EHEC とする) は下痢症の原因菌で、しばしば集団感染症を引き起し、ときに溶血性尿毒症症候群 (HUS) を併発し死亡例も報告されるため、社会的に重要な病原細菌である。分離される EHEC の O 抗原型は O157、O26 及び O111 の占める割合が多かったが、2000 年の 94%から 2010 年には 88%とその占める割合は少しずつ減っており、代わりに様々な O 抗原型が出現している¹⁾。EHEC の主要な病原因子はベロ毒素 (以下 VT とする) で、免疫学的に異なる VT1 及び VT2 に大別される。それぞれ塩基配列が異なる変異型が存在し、特に VT2 には多くの変異型が報告されている²⁾。

平成 24 年千葉市内で稀な変異型 (*vtx2f*) の EHEC O128 患者が発生した。その患者が発症後も保育所へ通所していたことから、二次感染の有無を確認するため保育所関係者を対象とした検査を実施したので、その概要を報告する。

2 発生概要

平成24年6月22日保健所にEHEC O128の患者 (2歳男児) が発生したとの情報が入り、調査が行われた。患者は保育所に通う児童で、6月17日に下痢を発症、6月18

日に医療機関を受診・検便したが6月21日まで保育所に通所、同夜に39℃の発熱、6月22日にEHEC陽性という検査結果が判明した。発症後も通所していたため、二次感染の有無を確認すべく、保育所を含む関係者の検便を実施した。

研究所は保健所に、検査には菌株が不可欠であることを説明の上、至急菌株の送付と菌株に関する情報の提供を依頼した。提供された情報によるとEHEC O128のVT型はRPLA法によりVT2と判定したとのことであった。

3 材料と方法

(1) 検体

6月25日から29日までの5日間に収集が行なわれた。内訳は、患者家族の便3検体、患者の陰性化確認用の便1検体、保育所職員の便49検体及び保育所児童の便74検体、計127検体である。また、6月26日に患者由来菌株EHEC O128を入手した。

(2) 検査法

2-1 検査のフロー[便の塗抹からリアルタイム PCR まで]

便を DHL に塗抹し 37℃、18~24 時間培養し、コロニースライプで得た菌体をアルカリ抽出 (2.5mM NaOH 100μl に懸濁、100℃、10 分加熱後、1M Tris・

HCl (7.0) 8μl を添加中和した遠心上清を DNA テンプレートとした) し、VT 遺伝子 (*vtx1*, *vtx2* 及び *vtx2f*) をターゲットにしたリアルタイム PCR を実施した。

2-2 検査フロー [リアルタイム PCR (*vtx2f*) が陽性の場合: EHEC O128 の検査方法 (図 1)] ①と②を並行して行った。

① 直接コロニー検索

DHL から 30 コロニーを病原大腸菌免疫血清「生研」O128 (デンカ生研) で試し凝集を実施、凝集が認められたコロニーについてリアルタイム PCR により *vtx2f* 遺伝子を確認した。

② 免疫ビーズ法の後にコロニー検索

DHL からスワイプによりノボビオシン加 mEC 培地 (以下 N-mEC) で 42℃、20~24 時間増菌後、増菌液 1ml に病原大腸菌免疫血清「生研」O128 を 20μl 加え 37℃、1 時間反応させた (途中 4 回混和)。更にビーズ (Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG、Invitrogen 製) 20μl を加え 37℃、1 時間反応させ (途中 4 回混和)、処方に従い洗浄、集菌し、平板培地 (DHL 及びクロモ O157) に塗抹した。平板培地上のコロニーについて病原大腸菌 O128 抗血清で試し凝集を実施、凝集が認められたコロニーについてリアルタイム PCR により *vtx2f* 遺伝子を確認し、陽性の菌株が得られた場合、確認検査 (IMViC、血清型別) に進め、菌の同定を行った。

同定した分離菌株と患者由来菌株については、リアルタイム PCR、PCR、LAMP 法及び RPLA 法を実施した。併せて、ExEC マルチプレックス PCR 及び EpAll マルチプレックス PCR (科学院細菌研修検査マニュアル) も実施した。

2-3 検査フロー [リアルタイム PCR (*vtx1* 及び *vtx2*) が陽性の場合: EHEC O157、O26 及び O111 の検査方法 (図 2)] ①と②を並行して行った。

① 直接コロニー検索法

DHL から 30 コロニーを LAMP 法により VT 遺伝子を確認した。

② 免疫ビーズ法後コロニー検索

DHL からスワイプにより N-mEC で 42℃、20~24 時間増菌後、増菌液 1ml に E.coli O157 用ビーズ (DynabeadsR anti-E.coli O157、Invitrogen 製) 20μl を加え 37℃、1 時間反応させ (途中 4 回混和)、処方に従い洗浄、集菌し、平板培地 (DHL、クロモ O157、STEC 及び CT-SMAC) に塗抹した。E.coli O26 及び O111 用ビーズも同様に使用した。

平板培地上のコロニーについて対応した病原大腸菌抗血清で試し凝集を実施、凝集が認められたコロニーについて LAMP 法により VT 遺伝子を確認した。

(3) 生化学的性状試験及び血清型別試験

生化学性状は常法に従って調べ、血清型は市販病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて調べた。

(4) リアルタイム PCR

vtx1 及び *vtx2* 遺伝子に関しては、厚生労働省通知 (平成 24 年 5 月 15 日食安監発 0515 第 1 号、以下通知法という) に従った。プローブについては *vtx1* と *vtx2* 遺伝子で蛍光を変えて作成することにより 1 穴で検出した。*vtx2f* 遺伝子に関しては前述マニュアル法を行った (Accession Number: AJ270998)。通知法に従い、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (AB) を使用し、反応条件は 50℃で 2 分、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、60℃で 1 分を 40 サイクル行った。

VT1-F	GGATAATTTGTTTGCAGTTGATGTC
VT1-R	CAAATCCTGTCACATATAAATTATTTCGT
VT1-P	VIC-CCGTAGATTATTAAACCGCCCTTCCTCTGGA-TAMRA
VT2-F	GGGCAGTTATTTTGTCTGTGGA
VT2-R	GAAAGTATTTTGTGCGGTATTAACGA
VT2-P	FAM-ATGTCTATCAGGCGCGTTTTGACCATCTT-TAMRA
VT2f-F	TCAGGGTGGTGTCTTCTGTTTC
VT2f-R	TCCATTATTAAACGGAGGTGGT
VT2f-P	FAM-TGTTAGAGGCCTTGATCCATATAGCGAGA-TAMRA

(5) PCR

① 市販の EHEC *vtx1* 遺伝子検出用 Primer Set EVT-1,2 及び *vtx2* 遺伝子検出用 Primer Set EVS-1,2 (共に TAKARA) を使用した。

② ExEC マルチプレックス PCR

前述マニュアルに従った。プライマーは表 1 に示した。

③ EpAll マルチプレックス PCR

マニュアルに従った。プライマーは表 2 に示した。

(6) LAMP

市販の Loopamp ペロ毒素 (VT) タイピング試薬キット (栄研化学) を使用した。

(7) VT 産生試験

菌を CAYE 培地 2ml に接種、37℃、16~20 時間振盪培養後、ポリミキシン B を加え 37℃、45 分振盪させた遠心上清について、VTEC-RPLA (デンカ生研) を用いて RPLA 法により行った。

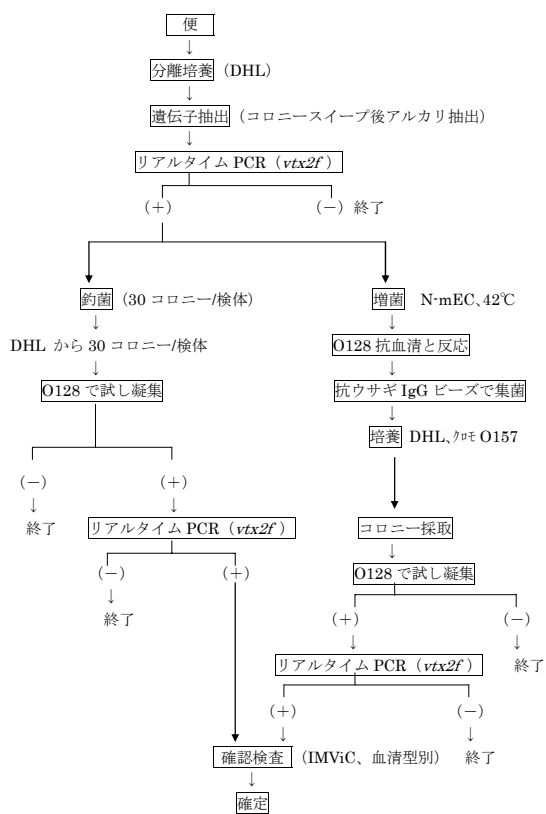


図 1. リアルタイム PCR で *vtx2f* が陽性の場合 (EHEC O128) の検査法

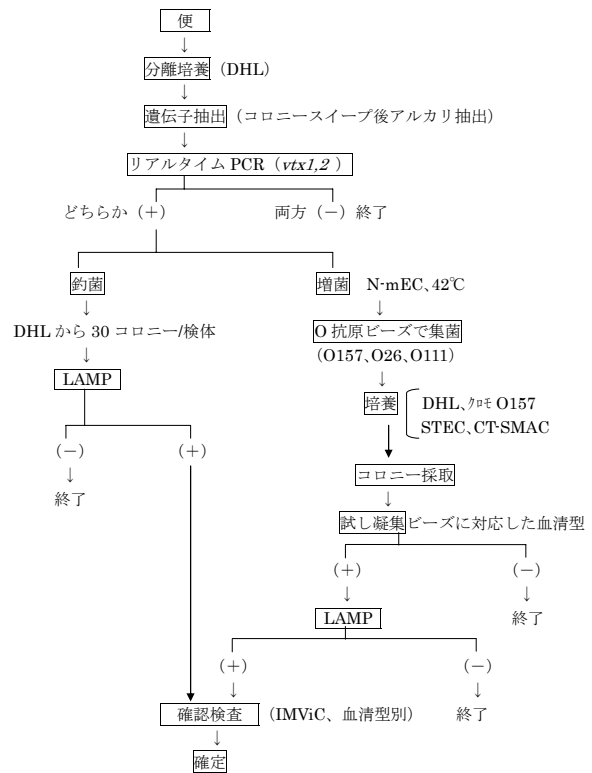


図 2. リアルタイム PCR で *vtx1* 及び *vtx2* が陽性の場合 (EHEC O157、O26 及び O111) の検査法

表 1. ExEC マルチプレックス PCR のプライマー配列

検出遺伝子	プライマー名	配列 (5'→3')	長さ(bp)
<i>invE</i>	I-1	ATATCTCTATTTCCAATCGCGT	379
	I-51	GGCGAGAAATTATATCCCG	
<i>vtx1</i>	mMK1-1	GAATTTACCTTAGACTTCTCGAC	234
	mMK1-2	TGTCACATATAAATTATTTTCGTTC	
<i>vtx2</i>	mMK2-1	GAGTTTACGATAGACTTTTCGAC	234
	mMK2-2	GGCCACATATAAATTATTTTGCTC	
<i>vtx2f</i>	stx2fk-S1	CAAAAGAGCTATGTTGATTC	296
	stx2fk-A1	ATGGAACAGTTATCACATC	
<i>elt</i>	LT-11	CCCACCGGATCACCA	123
	LT-2	GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	
<i>estA1</i>	ST1a-s	GCAATTTTTTATTTCTGTATTATCTTT	179
	ST1a-as	GGATTACAACAAAGTTCACAG	
<i>estA2</i>	ST1b-s	TTTATTTTTCTTTCTGTATTGTCTTT	179
	ST1b-as	GGATTACAACACAATTTCACAG	

表 2. EpAll マルチプレックス PCR のプライマー配列

検出遺伝子	プライマー名	配 列 (5'→3')	長さ(bp)
<i>aggR</i>	aggRk-S4	GCGATACATTAAGACGCCTA	254
	aggRk-A4	AAAGAAGCTTACAGCCGATA	
<i>astA</i>	EASTOS1	GCCATCAACACAGTATATCCG	109
	EASTOAS2	CGCGAGTGACGGCTTTGTAG	
<i>eae</i>	mSK1	CCGGCACAAGCATAAGC	310
	eaekas-a	TGGCAAAATGATCTGCTG	
<i>afaD</i>	afaDks1	GGGAGTATAAGGAAGATGATGC	207
	afaDkas1	GTCCACCTGACGCTCA	

表 3. EHEC O128 の生化学性状

オキシ ダーゼ	TSI				LIM			VP	SC	ラク トース	ソルビ トール	キシ ロース	病原 遺伝子
	斜面	高層	H ₂ S	ガス	Lys	Ind	Mot						
—	+	+	—	+	+	—	+	—	—	+	+	+	<i>eae, astA</i>

*遅分解

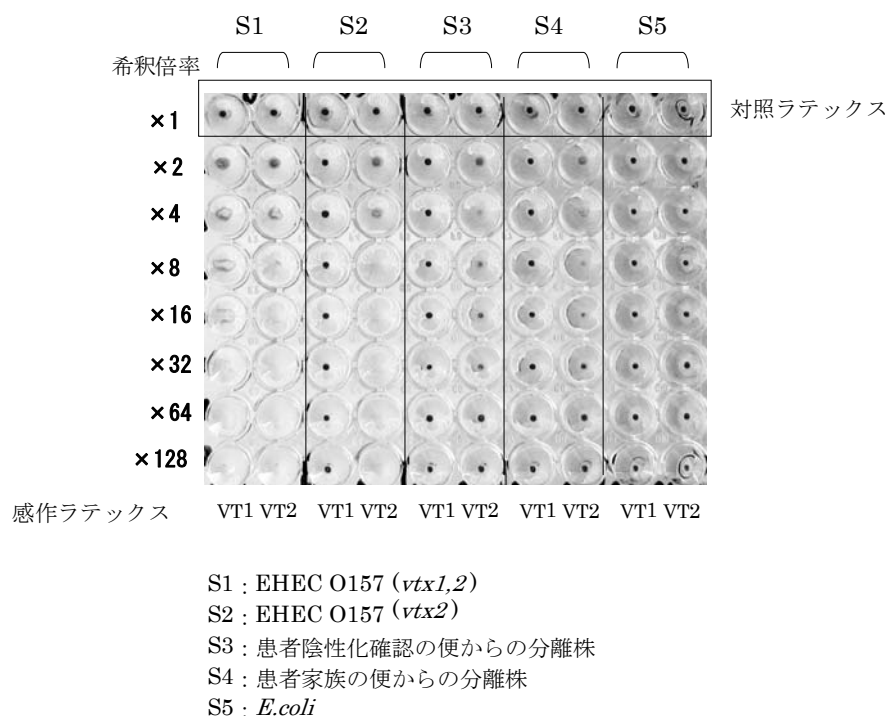
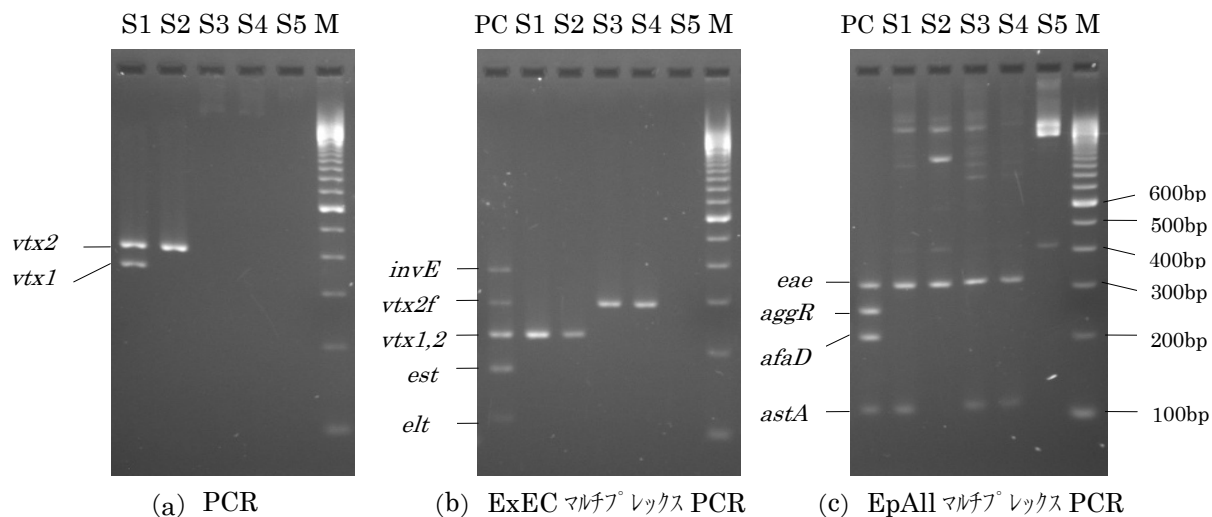


図 3. EHEC O128 の RPLA



PC : Positive Control
 S1 : EHEC O157 (*vtx1,2*)
 S2 : EHEC O157 (*vtx2*)
 S3 : 患者陰性化確認の便からの分離株
 S4 : 患者家族の便からの分離株
 S5 : *E.coli*

図 4. EHEC O128 の遺伝子検査

表 4. リアルタイム PCR (VT 遺伝子) の検査結果 (陽性検体数)

検 体	検査件数	VT 遺 伝 子			
		<i>vtx1,2</i>	<i>vtx1</i> のみ	<i>vtx2</i> のみ	<i>vtx2f</i>
保育所職員の便	49	1	—	—	—
保育所児童の便	74	—	—	—	—
患者家族の便	3	—	—	—	1
患者陰性化確認の便	1	—	—	—	1
合 計	127	1	—	—	2

4 結 果

(1) 患者由来 EHEC O128 株の生化学性状及び遺伝子検査結果

培地に培養した結果は、CT-SMAC 及び STEC 寒天培地には生えず、DHL で乳糖分解性、クロモ O157 で紺色を示し、生化学性状は一般的な大腸菌と同じであった (表 3)。RPLA は VT2 (16 倍) であった (図 3)。

リアルタイム PCR では、*vtx1* 及び *vtx2* 遺伝子 (—)、*vtx2f* 遺伝子 (+) であった。PCR では VT 遺伝子 (—) (図 4(a))、LAMP 法でも VT 遺伝子 (—) であった。また、ExEC マルチプレックス PCR では *vtx2f* 遺伝子が (+) (図 4(b))、EpAll マルチプレックス PCR では、*eae* 及び *astA* 遺伝子が (+) であった (図 4(c))。

(2) リアルタイム PCR (*vtx1*, *vtx2* 及び *vtx2f*) の検査結果

127 検体のリアルタイム PCR の結果は、*vtx1,2* 遺伝子陽性が 1 検体 (保育所職員の便)、*vtx2f* 遺伝子陽性が 2 検体 (患者陰性化確認の便、患者家族の便) であった (表 4)。

(3) *vtx2f* 遺伝子陽性検体の分離結果

vtx2f 陽性の 2 検体については、DHL から釣菌した各々 30 コロニー (方法 2-2①) は全て O128 抗血清に凝集しなかった。一方、増菌液を免疫ビーズにより集菌・培養した DHL、クロモ O157 上のコロニー (方法 2-2②) はともに O128 抗血清で凝集、リアルタイム PCR により *vtx2f* 遺伝子 (+)、確認検査を経て、2 検体とも EHEC O128 を分離することができた。

(4) *vtx1,2* 遺伝子陽性検体の分離結果

vtx1,2 陽性の 1 検体について、DHL から釣菌した 30 コロニー (方法 2-3①) は、全て LAMP 法により VT 遺伝子 (-) であった。増菌液を免疫ビーズ (EHEC O157 及び O26) により集菌・培養 (方法 2-3②) したコロニーは 2~3 コロニーしか生えず、全て対応した抗血清に凝集しなかった。免疫ビーズ (EHEC O111) により集菌・培養したコロニーは病原大腸菌 O111 抗血清で凝集したが、LAMP 法により VT 遺伝子 (-) であった。

5 考 察

今回分離された EHEC O128 は、生化学的性状が一般的な大腸菌と同じで選択培地がない。更に、既に報告されている *vtx2f* 遺伝子を持った EHEC 同様、VT 遺伝子のスクリーニングとしてよく利用されている LAMP 法、当所で常用していた市販プライマーによる PCR で検出できない菌株であった^{3,4,5)}。一方、RPLA は、対照とした EHEC O157 (VT1,2 及び VT2) に比べて力価は低いものの、凝集が認められ、VT2 を検出できた。VT の検出法として迅速性に優れている遺伝子検査に頼る傾向があるが、EHEC を見逃さないためには RPLA との併用が有効であると思われた。

また、当所では予め *vtx2f* を検出できる検査法 (ExEC マルチプレックス PCR) を導入していたことにより、早期に患者菌株が *vtx2f* 陽性であることが把握でき、リアルタイム PCR (*vtx2f*) 用プライマー及びプローブを発注することで迅速に検査結果を出すことができた。しかし、常用している市販の PCR 用プライマーを *vtx2f* 遺伝子が検出できる最新プライマーに変更しておかなかったことは反省すべきである。発生頻度の少ない感染症への対応に備えておく危機管理の重要性を

改めて認識した事例であった。

二次感染の有無を確認するためには多検体を迅速に検査する必要があり、その手法として、リアルタイム PCR は優れた方法であった。EHEC O128 の検査については、DHL から無作為に釣菌した 30 コロニーから EHEC O128 を分離することはできなかったが、O128 抗血清と反応させ免疫ビーズで集菌することにより培地上に生えたコロニーは、ほぼ全てが EHEC O128 であった。免疫ビーズ法による集菌は少量の菌を分離するのに優れた方法であった。

vtx1,2 遺伝子が陽性だった検体については、O 抗原型が不明であり免疫ビーズを利用できなかったため、EHEC の約 90% を占める O157、O26 及び O111 を試行したが、大腸菌 O157 及び O26 は分離できなかった。大腸菌 O111 については数十コロニー分離することができたが、いずれも VT 遺伝子はなかった。もしかしたら、富山のユッケ事例のように元は EHEC だったが、VT 遺伝子が落ちてしまったのかもしれない。菌株を国立感染症研究所で PFGE をして、全国の株と比較することにより、元は EHEC だった可能性を証明できるかもしれない。

なお、患児が感染した原因は特定できなかった。

本稿をまとめるにあたり、情報を提供してくださった千葉県保健所感染症対策課の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省食中毒発生統計(2009、2010)
- 2) Gehua Wang, Clifford G.Clark, Frank G.Rodgers: Detection in Escherichia coli of the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O157:H7 Serotype, and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 3613-3619
- 3) 山口仁孝, 山崎省吾, 野口英太郎: 小児下痢症患者より分離された志賀毒素産生大腸菌 O63 の病原分子解析, 長崎県衛生公害研究所報, 47 (2001)
- 4) 磯部順子, 木全恵子, 霜島正浩, 細呂木志保, 田中大祐, 刑部陽宅: 下痢患者からの *stx2f* 遺伝子保有志賀毒素産生性大腸菌 O128:HNM の分離, 感染症学雑誌, 78, 1000-1005 (2004)
- 5) 北川恵美子, 児玉洋江, 倉本早苗, 芦川俊彦, 橋本喜代一, 本庄峰夫, 山田恵子, 新川晶子: 変異型の志賀毒素 2 型産生遺伝子 (*stx2*) を保有する腸管出血性大腸菌に関する研究, 石川県保健環境センター研究報告, 46 (2009)