

# マイトマイシンCによるEHECのstx産生性, 亜テルル酸カリウム感受性, 溶血性に関する疫学的検討

真子俊博<sup>1</sup>・尾崎延芳<sup>2</sup>

## A Study on STX Production, Terulate Sensitivity and Enterohemolysin Production of Enterohemorrhagic E.coli

Toshihiro MAKO and Nobuyoshi OZAKI

### 要旨

マイトマイシンCを添加することにより, EHECのStx産生性が著しく増加し, Stx 1では約10倍, Stx 2では約40倍産生量の向上が認められた。

EHEC株の溶血性はO157, O26, O111では95.9%に溶血を認めたが, それ以外の血清型, 型別不能株では65%であった。

亜テルル酸カリウム添加培地での発育性はO157, O26, O111は97.4%が良好な発育であったが, それ以外の血清型では64.7%が発育を抑制された。

EHEC保存各についてマイトマイシンCの刺激によるStx産生性を調査したところ, 著しく毒素の産生が高くなるグループ, あまり反応しないグループ, 全く反応を示さないグループに分類された。

**Key Words** : 腸管出血性大腸菌 enterohemolytic *Escherichia coli*, 酵素抗体法 Enzyme linked immunoassay, 型別不能 EHEC Oserotype untypable EHEC, 亜テルル酸カリウム potassium terulate sensitivity, マイトマイシンC MytomyisinC

### I はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検査は現在, O157 を主体とした検査となっており, 種々の増菌・分離培地が考案されている<sup>1)</sup>。しかし, O157 は EHEC の一つのセロタイプであるにすぎず, Stx を産生する大腸菌は現在多くの血清型に及んでいる<sup>2)</sup>。当所では EHEC 検索において直接分離培養法とCAYE培地による増菌後Stxの有無を調べて EHEC を検索する方法<sup>3)</sup>を併用している。

平成10年度から学校給食従事者の定期検便が月2回となり検体数が増加したため, Stxを検出する方法として多量検体処理が可能なEIA法を導入し, 毒素産生用培地にマイトマイシンCを添加したCAYE培地を用いたところ EHEC の検出率が高まり, さらに市販抗血清では型別で

きない株が多数分離された。そこで, 当所で保存している EHEC 株を用いてマイトマイシンCの添加によるStx量の影響と亜テルル酸カリウム感受性, エンテロヘモリジン血液寒天培地による溶血性を調査したので, その結果について報告する。

### II 材料および方法

#### 1) マイトマイシンC添加でのStx毒素検出方法

毒素産生用培地にはCAYE培地を用い, 培地に最終濃度100 $\mu$ l/LになるようにマイトマイシンCを加え, 検体接種後37 $^{\circ}$ Cで一夜振とう培養を行った。stxの毒素確認はノバパスペロ毒素EIAキット (バイオラッド) を用いて行った。検体接種量を2倍にし, さらに検体希釈液に最終濃度5,000単位になるようにポリミキシンBを加えてStx 1の検出を可能にした方法を用いた。吸光度0.15以上を陽性とし陽性検体ではCAYE培地よりPCR法にて毒

1. 福岡市保健環境研究所 微生物課(現所属:衛生化学部門)

2. 福岡市保健環境研究所 微生物部門

素遺伝子の確認を行った。

Stxの定量はCAYE培地 1 ml に最終濃度5,000単位になるようにポリミキシンBを加え, 37°Cに1時間放置後, 12,000rpm10分遠心して上清を試料とした。マイクロプレート上で倍々希釈しRPLA法(デンカ生研)でStx毒素の定量を行った。

2) 亜テルル酸カリウム感受性の検査方法

亜テルル酸カリウム感受性はソルビトールマッコンキ一培地に0.05mg/mlの亜テルル酸カリウムを加えた培地に画線培養し, 37°C一夜培養後発育の有無を調べた。

3) EHEC 株における溶血性の確認方法

溶血性はエンテロヘモリジン血液寒天培地(関東化学)を用い, 37°C一夜培養後に溶血性を確認した。完全溶血を示す株を溶血性を示す株とし, α溶血や弱い溶血を示す株では弱溶血性と判定した。

III 結果

1. 亜テルル酸カリウムの感受性

保存菌株 264 株の内、TS培地に良好に発育した株は 215 株 (81.4%)、弱い発育の株は 14 株 (5.3%)、発育の見られない株は 35 株 (13.3%) であった。表 1 に示したように O157, O111 はほとんどの株が TS培地に良好な発育を示したが、O26 では 3 株 (7.9%) が亜テルル酸カリウムに感受性であった。その他の血清型では O62, O128 が非感受性で、反対に O165 ではすべての株が感受性を示した。OUT株 39 株の亜テルル酸カリウムの感受性は約 70%が非感受性であったが 30.7%が感受性であった。その他、O91 では 17 株中 15 株 (88.3%) が感受性を示し、O157, O26, O111 以外の血清型では 57.1%が感受性であった。

2. EHEC の溶血性活性

表 2 に EHEC の溶血性について調べた結果を示した。エンテロヘモリジン血液寒天培地に画線・尖刺したのち 37°C 18 時間培養後、溶血性を判定したところ 294 株中

237 株 (83.4%) に溶血が認められた。血清型では O157, O26, O111 はそれぞれ 90%以上の溶血性を示したが、OUTでは 42.1%が非溶血であった。

3. マイトマイシンC添加によるstx定量値

当所保存株の EHEC について stx の産生性を調べた結果を Table 3 に示した。stx 1 では 1,280 倍にピークがみられ最低 32 倍, 最高 10,240 倍であった。

Table 1 Potassium terulate sensitivity of EHEC

serotype	TS	TS	TS
	growth	few	not growth
	215 (81.4%)	14 (5.3%)	35 (13.3%)
O 1 5 7	127 (98.4%)	2 (1.6%)	—
O 2 6	35 (92.1%)	—	3 (7.9%)
O 1 1 1	29 (100%)	—	—
O 9 1	2 (11.7%)	—	15 (88.3%)
O 1 0 3	4 (66.7%)	—	2 (33.3%)
O 6 2	1 (100%)	—	—
O 1 2 8	2 (100%)	—	—
O 1 6 5	—	—	3 (100%)
OUT	15 (38.4%)	12 (30.7%)	12 (30.7%)

Table 2 Enterohemolytic of EHEC by the Enterohemolysine blood culture medium

serotype	hemolytic	few hemolytic	no hemolytic
	(+++~+)	(±)	(-)
294	237 (83.4%)	8 (2.8%)	39 (13.7%)
O157	115 (92.0%)	7 (5.8%)	3 (2.4%)
O26	43 (97.7%)	—	1 (2.2%)
O111	28 (96.6%)	1 (3.4%)	—
OUT	22 (57.9%)	—	16 (42.1%)

Table 3 Stx produce of EHEC

希 釈 倍 率	2	20	32	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
VT1			1	4	7	9	11	14	10	1	2	
VT2	9	5	2	4	4	9	4	6	8	6	12	9

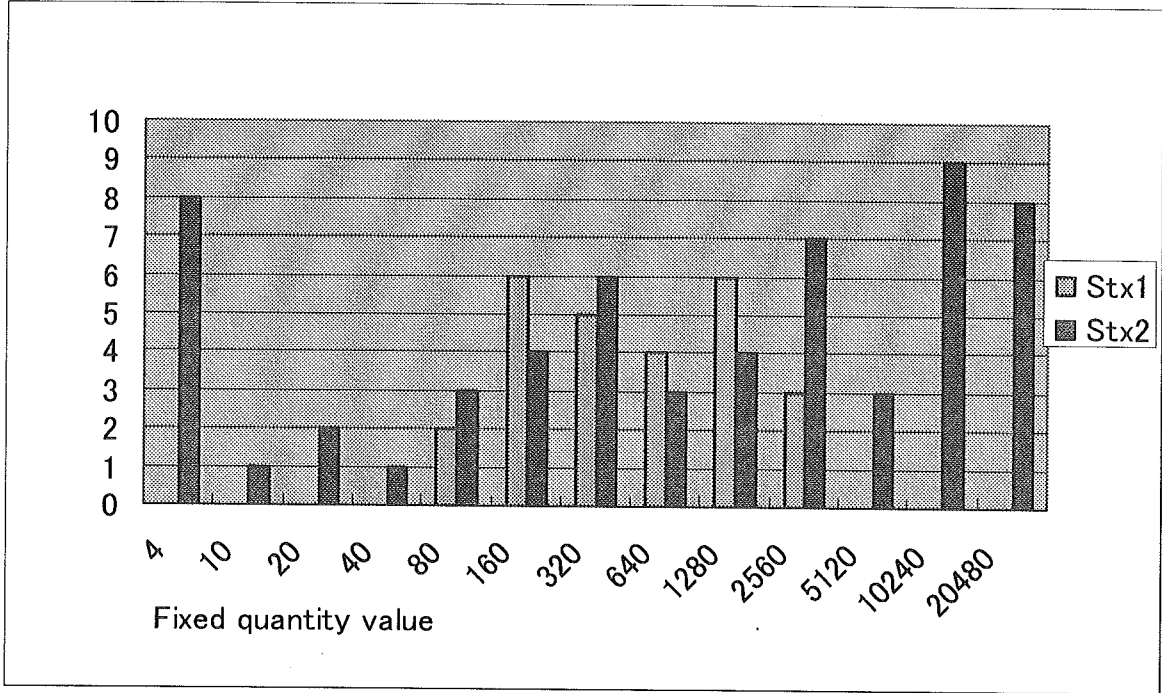


Fig. 1 Stx produce of EHEC

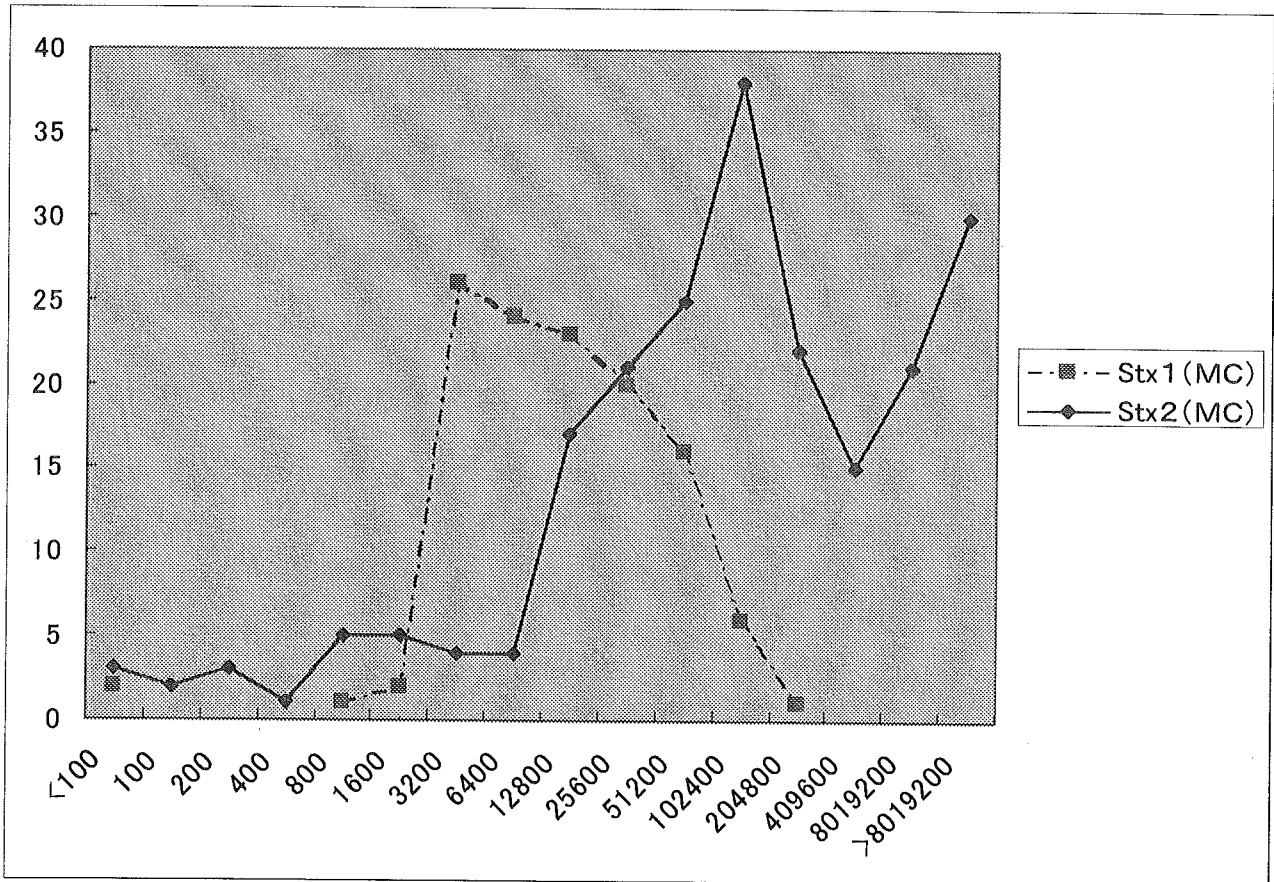


Fig. 2 Mitomycin C addition to Stx produce of EHEC

stx 2は最低2倍から20,480倍でStx 1より少し高いものの明瞭な差は見られなかった。

O157のStx産生をFig 1に示した。Stx 1では他の血清型の同様であったが、Stx 2は毒素産生が高くなる傾向であった。

Fig. 2にマイトマイシンCを添加したEHECのstx定量値を示した。多くの株がStxの産生が高くなり、Stx 1ではRPLA法による定量の平均値が1,280倍から12,800倍と10倍高くなり、Stx 2は平均値の5,120倍から204,800倍と約40倍高くなった。最高値もStx 1では1,0240倍から204,800倍に、Stx 2では20,480倍から8019,200倍とマイトマイシンC添加によりStxの有意な上昇を認めた。O157のstx定量値については他の血清型と同様な傾向であったが、検出限界以下の株やマイトマイシンCの影響を受けない株も見られた。

#### IV 考 察

平成10年より検体数増加に対処するためEIA法によるEHEC検査<sup>4)</sup>に変更したところ、それまで年間10例以下であった型別不能株が数倍となり、Stxを直接検出する方法の導入効果が現れてきた。

当所ではふん便からStxを直接検出する方法ではなく、増菌後EIA法を実施している。この方法では検査結果が一日遅れるものの増菌培地からの検査であることから、非特異率が極めて少くなり検出限界以下の菌数でも検出可能となると考えたからである。EIA法では多数の検体処理が可能である反面、非特異反応が高いと言われている。これらのリスクを回避するために、当所では増菌培養後に検査することを採用した。ふん便からの直接Stxの検査ではふん便成分による非特異反応が多く、希釈や吸収操作が必要となる。そこで、著者らは一旦、増菌培地で増菌する方法を採用した。約6万件の検査を実施したが非特異率は0.6%と低くルーチンに支障がなく、しかも多検体処理が可能なることからEHEC検査に最適な方法と考えられる。

また、EIA法では検出感度を上げることが可能で、現在毒素産生用培地にマイトマイシンCを添加してStxの産生を高めている。CAYE培地に200  $\mu$  MLのマイトマイシンCを添加することによりStxの産生がきわめて高くなることを確認した。そこで、EIA法の検査に応用したところ少ない菌数においてもStxの確認が可能となった。RPLA法で力価を比較したところ、数十倍から数千倍と高くなり、マイトマイシンC添加により微量の菌からでもStxの検出が可能になったものと考えられる。

しかし、一方で菌数の極めて少ない検体からもStxの

検出ができる反面、菌の分離が困難な場合が出てきた。O157, O26, O111のような選択分離培地があるEHECでは比較的菌の検出は可能であるが、選択分離培地が使用できないEHECでは数百コロニー中1個ほどの菌の単離は困難である。実際の検査においてEIAのOD値が高い値を示しながら菌の検出ができなかった例を経験している。

EHECの分離培地はTS培地、クロモアガー、O157:H7-ID培地、エンテロヘモリジン血液培地の4種類を用いているが、TS培地以外は選択制が極めて弱い。TS培地はソルビトールマッコニー寒天培地に亜テルル酸カリウムを0.05%加えたものである(自製)。CT-Smac培地とほとんど遜色なくO157, O26, O111なども良好に発育する。今回、TS培地を用いてEHECの発育性を調査したところ、O157, O26, O111などはいずれも95%以上の発育性を示したがその他の血清型、OUTは57%が発育を抑制された。このことから、EHECの検索には抑制力の弱い分離培地の併用が必要であろう。

また、溶血性よりEHECを選択し効率的に検索する方法が報告されている<sup>6)</sup>。著者らが保存株を用いた実験ではO157, O26, O111などは92%以上が溶血を示すものの、それ以外特にOUTでは約40%の株に溶血を認めなかった。EHECの中にも溶血を示さない株が存在することを考えて検査を進める必要があると思われる。また、現在入手可能なEHECの溶血性を確認できる培地は2つのメーカーがあり、今回著者らは自然透過光で溶血性の確認ができるエンテロヘモリジン血液寒天培地を使用した。完全溶血から $\alpha \cdot \gamma$ 溶血を示す株もあり、すべての株が完全溶血を示さず溶血性のパターンに違いがあることが判明した。

当所ではEIA法の導入でEHECの検出率が高くなっているものの、EIA法で値が高くPCRでも遺伝子が確認されながら、菌の分離ができなかった例を数例経験している。TS培地などの選択培地に発育しない株では現在のところ選択性の弱い分離培地を用い、PCR法によりEHECの検索を進めている。OUTなどでもStx産生の高い株では少量の菌数でもEIA法が陽性となり、菌の検索は非常に困難を伴う。著者らは検体中に1/500個のEHECを経験したが、大変な労力や費用がかかることから、菌の分離が伴わない例や遺伝子のみが検出された場合の対策を考えていく必要があると考える。

EHECの毒素遺伝子はバクテリオファージの感染により挿入された遺伝子であるが、通常ファージは溶菌か溶原のサイクルをとる。EHECでは溶原化に進み、増殖とともに複製されて伝わっていく。Stx毒素は菌のゲノム上に挿入された1コピーのファージ由来stx毒素遺伝子より産生が起こっており、*In vitro*では菌数と毒素量は

比例関係にある。毒素産生のメカニズムについては最近色々明らかにされ、菌体内より小胞の形で菌体外へ放出されることが報告されている。しかし、実際の遺伝子上での合成過程や個々の遺伝子断片の働きについてはまだ完全には究明されていない。

マイトマイシンCの添加による Stx の増加ではマイトマイシンCの刺激により溶菌サイクルの状態であったファージが溶菌サイクルへと進み、菌体内でファージの増殖が始まる結果、ファージ= Stx 遺伝子の増加が毒素産生に直接的な働きをしているものと思われる。実際、マイトマイシンC添加 CAYE 培地では O157 は振とう培養にもかかわらず、菌数の増加は頭打ちで、無添加 CAYE 培地とは明らかに菌数が異なり菌数が少ない。実際の検体ではマイトマイシンCを添加した CAYE 培地から分離するより、直接検体より分離した場合のほうが菌の分離が高かった。これは、マイトマイシンCの刺激で湧出されたファージが次々と菌を溶菌させているため、時間の経過とともに EHEC が減少していくものと思われる。

このように、マイトマイシンCの添加により stx の産生は飛躍的に高まったが、一方でマイトマイシンCの刺激を受けない株も見られ、Stx の定量結果から EHEC は大きく3つのグループに分類できた。すなわち、マイトマイシンCによく反応してペロ毒度の産生が高くなる株、あまり反応しない株、刺激に全く変化を示さないグループである。マイトマイシンCの刺激によく反応するグループでは数百から数千倍と産生が高くなり 100  $\mu$  から 800  $\mu$  l/ml の Stx を産生するが、あまり反応しないグループでは数倍から数十倍程度の 3.0 から 50  $\mu$  /ml の産生量であった。一方、刺激に全く反応しない株では 0.8  $\mu$  /ml 以下で、遺伝子が存在するにもかかわらず Stx を全く産生しない株も見られた。

通常 EHEC 内の Stx 遺伝子は1コピーとされ産生量には明瞭な差は起きないはずである。にもかかわらず、刺激による Stx の産生に大きな差を認めたことは、遺伝子内に Stx の複製が行われない変化が起こっている場合とファージの溶菌サイクルが行われないことを意味していると思われる。Stx 遺伝子の変化としては最近明らかにされてきた挿入遺伝子 (IS) があり、一部の菌株を精査した結果 IS 遺伝子の挿入の可能性が示唆された。

現在広く用いられている Stx 遺伝子を検出する PCR は短い断片の増幅を行っているが、長い断片を増幅する VT チェックレディー (東洋防) による PCR では stx 2 遺伝子の増幅が行われず、1.2kb 付近にバンドが形成されていた。Stx 2 バリエントは現在数種類が知られ<sup>7)</sup>、通常の PCR では3種類のバリエントしか検出できないが VT チェックレディー (東洋防) では長い断片を対象

にしているために Stx 2 遺伝子より大きな分子として捕らえられことがある。Kusumoto<sup>8)</sup> らは最近 IS 遺伝子の挿入がヒトの O157 にも起こっていることを明らかにしているが、当所で分離した株にもこの IS 遺伝子の挿入が考えられた。そこで、菌の精査を依頼したところ Stx 2 遺伝子の A サブユニットの終わりに IS1203V の挿入がシーケンスにより判明した。この IS1203V 挿入がどのような過程で挿入されたものかは現在のところ不明であるが、Stx 遺伝子にこの IS が挿入されていると Stx の複製がこの IS の所で止まり複製が行われない結果 Stx の産生が行われないのであろう。Insertion sequence (IS) は多くの原核、真核生物に存在する繰り返し遺伝子配列であり、IS タイピングによる分類や疫学調査に利用され始めている。大腸菌の IS 挿入はブタやウシより分離された O157 では明らかにされていたが、ヒトではごく最近明らかにされてきた<sup>7)</sup>。全国で数例のみであるが、マイトマイシンCの刺激にあまり反応しない株やまったく反応しない株があることから早急に、これらの株について IS 遺伝子の調査や病原性などの検討が必要と思われる。

現在までに判明した血清型および型別不能株の Stx 型などから、当所で確認された EHEC は 43 種類に分類できた。既存の血清型 5 種類を除くと EHEC の血清型は多くの型に分布していることになる。そこで、比較的分離頻度の高かった O91 の 16 株についてパルスフィールド電気泳動を行ったところ、集団発生事例の 4 株を除くとすべて異なる遺伝子パターンを示しており、これは以前より多くの血清型や型別不能株が分布や流行を示しているものと考えられた。O157 にかぎらず他の EHEC についても今後実態調査が必要であろうし、現在、O157 を中心に PFGE によるパルスネットの検討がなされているが、他の血清型および型別不能株についても、PFGE のデータバンク構築を構築していく必要があると考えられた。

## VI 文 献

- 1) 平松礼司, 他: 腸管出血性大腸菌 O26 の生化学的性状及びその選択分離培地に関する検討, 感染症誌, 73 (5), 407-413, 1999
- 2) 甲斐明美, 工藤泰雄: 下痢原性大腸菌 (腸管出血性大腸菌) の分類, 臨床と微生物, 38 (4), 493-497, 1991
- 3) 野村由美, 他: EIA 法による腸管出血性大腸菌 Vero 毒素検出法の有用性, 医学検査, 47 (6), 1048-1051, 1998 3) 野村由美, 他: EIA 法による腸管出血性大腸菌 Vero 毒素検出法の有用性, 医学

- 検査, 47 (6), 1048 - 1051, 1998
- 4) 除 明順, 他: 糞便から直接ベロトキシンあるいは腸管出血性大腸菌 O157 を検出するためのキットの評価, 感染症誌, 71 (11), 1120-1123, 1997
- 5) Beutin L, Zimmermann S, Gleier K: Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (Verocytotoxin) -producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed the VTEC-PRLA assay, J. Clin. Microbiol., 34(11), 2812 - 2814, 1996
- 2) 木村晋亮, 他: ベロ毒素産生性/腸管出血性大腸菌のスクリーニングに用いられる Beutin 血液寒天培地の基礎的検討, 感染症誌, 73 (4), 1999
- 7) 武田美文, 山崎伸二: 腸管出血性大腸菌と Vero 毒素, 臨床と微生物, 38 (4), 443-455, 1991
- 8) Kusumoto M, *et al*: Identification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* possessing insertionally inactivated shiga toxin gene, Microbiol. Immunol., 45(4), 319-322, 2001
- 9) Kusumoto M, *et al*: Reactivation of insertionally inactivated shiga toxin 2 genes of *Escherichia coli* O157:H7 caused by nonreplicative transposition of the insertion sequence, J. Biosci. Bioeng., 87(1), 96-96, 1999