

資 料

食中毒事例から分離された *Escherichia coli* O55 : H10 の
プラスミドプロファイルと RAPD (Random Amplified Polymorphic
DNA) プロファイルによる遺伝子学的解析
—原因施設の水由来株と患者由来株との関連性について—

Molecular Characterization of *Escherichia coli* O55 : H10 Isolated from
Food Poisoning Outbreak by Plasmid Profiles and RAPD
(Random Amplified Polymorphic DNA) Profiles

竹田 義弘 福田 伸治 小川 博美 水田 満里

YOSHIHIRO TAKEDA, SHINJI FUKUDA, HIROMI OGAWA and MARI MIZUTA

(Received Sep. 30, 1996)

はじめに

1996年3月に食中毒様症状を呈する患者11名中4名から *E. coli* O55 : H10 を分離した。本事例は岡山県内の飲食施設で発生した食中毒事件で、患者は複数の県に及んでいた。また、大分県の患者と岡山県内の原因施設の水からも同じ血清型の *E. coli* O55 : H10 が分離されていた。そこで今回、我々は、当センターが分離した *E. coli* O55 : H10 と、岡山県および大分県で分離された *E. coli* O55 : H10 の関連性を検討するため、両県から菌株の分与を受け、生化学的性状試験、毒素産生性試験、*invE*, *ipaH* および *eaeA* 遺伝子の検出試験、薬剤感受性試験の他に、プラスミドプロファイルと RAPD プロファイルによる遺伝子学的解析を行ったので報告する。

材料と方法

1. 供試菌株

供試菌株には、当センターが、岡山県内の原因施設で2月27日に昼食をとった患者から分離した *E. coli* O55 : H10 4株 (以下、広島株と略す) と、原因施設の水から分離された *E. coli* O55 : H10 1株 (岡山県保健環境センターより分与、以下、岡山株と略す) および原因施設で2月24日~25日に宿泊した大分県の患者から分離された *E. coli* O55 : H10 1株 (大分県衛生環境研究センターより分与、以下、大分株と略す) を使用した。また、その他に薬剤感受性試験、プラスミ

ドプロファイルおよび RAPD プロファイルの対照として、同じ O 抗原を有し、それぞれ由来の異なる *E. coli* O55 : H7 4株 (大分県衛生環境研究センターより分与) と、*E. coli* O157 : H7 1株、*E. coli* O157 : H45 1株、*E. coli* O26 : H11 1株、*E. coli* O6 : H16 1株および *E. coli* O111 : H-1 株、総計15株を使用した。

2. 生化学的性状試験、血清型別試験

E. coli の同定と20種類の生化学的性状試験を、IDテスト EB20 (日水製薬) を使用して、説明書に従って実施した。その他、オキシダーゼ試験と運動性試験を、それぞれチトクローム・オキシダーゼ試験用紙 (日水製薬) と SIM 確認培地 (日水製薬) を使用して行った。また、 β -D-glucuronidase 試験を、LIG 寒天培地 (極東製薬) を使用して行った。

O 抗原と H 抗原の血清型別試験は、市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を使用して常法通り行った。

3. 毒素産生性試験、*invE*, *ipaH* および *eaeA* 遺伝子の検出試験

被験菌のベロ毒素 (Verotoxin, 以下、VT と略す)、易熱性エンテロトキシン (heat-labile enterotoxin, 以下、LT と略す) および耐熱性エンテロトキシン (heat-stable enterotoxin, 以下、ST と略す) 産生性試験は、それぞれ市販の毒素検出用キット (デンカ生研) を使用する方法と PCR 法による VT, LT, STh (ヒト型 ST) および STp (ブタ型 ST) 遺伝子の検出を行った。また、PCR 法により *invE*, *ipaH* および *eaeA* 遺伝子の検出を

行った。PCR に使用するプライマーのうち *eaeA* 遺伝子の検出には、Bernard ら [1] の報告した B52 (5' - AGGCTTCGTCACAGTTG-3') と B53 (5' - CCATCGTCACCAGAGGA-3') のオリゴヌクレオチドを合成 (ライフテックオリエンタル) してプライマーとして使用した。その他は市販のプライマーセット (TaKaRa) を使用した。

PCR は、以下のように行った。被検菌を L-broth 培地 [2] 5ml に接種し、37℃ で 15~20 時間振盪培養した。そして、培養菌液を滅菌蒸留水で 2 倍希釈してから 500 μ l をマイクロチューブにとり、5 分間煮沸して DNA を熱抽出し、12,000rpm にて 5 分間遠心した上清の 10 μ l をテンプレート DNA として使用した。反応液組成は、プライマー各 1 μ l, 10 \times Buffer (TaKaRa) 10 μ l, dNTPmix (2.5mol, TaKaRa) 8 μ l, Taq (5u/ μ l, TaKaRa) 0.5 μ l, 滅菌蒸留水 69.5 μ l とした。増幅は変性 94℃, 1 分, アニーリング 55℃ (*eaeA* は 51.9℃), 1 分 (*eaeA* は 2 分 24 秒), 伸長 72℃, 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。増幅後、反応液

の 10 μ l を TAE Buffer で調整した 2.0% アガロースゲルで電気泳動し、増幅されたバンドをエチジウムブロマイド染色して、トランスイルミネーターで観察した。

4. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、感性ディスク用培地-N (日水製薬) を使用し、セファロチン, アミカシン, カナマイシン, ストレプトマイシン, エリスロマイシン, クロラムフェニコール, コリスチン, ナリジクス酸, ホスホマイシンおよびオフロキサシンの 10 薬剤について、常法に従い 1 濃度ディスク法 (Sensi-Disk, BBL) により実施した。

5. プラスミドプロファイル

Kado らの方法 [2] に従って、以下のように行った。被検菌を L-broth 培地 5ml に接種し、37℃ で 15~20 時間振盪培養した。そして、培養菌液 1ml をマイクロチューブにとり 12,000rpm にて 3 分間遠心し、上清を取り除いた。菌体を TE Buffer 100 μ l に溶解し、lysing

表1 広島県, 岡山県および大分県で分離された *E. coli* O55:H10 の性状

性 状	広 島 株	岡 山 株	大 分 株
硫化水素	-	-	-
エスクリンの加水分解	-	-	-
PPA	-	-	-
インドール	+	+	+
VP反応	-	-	-
クエン酸塩の利用	-	-	-
アミノ酸:			
リジンデカルボキシラーゼ	+	+	+
アルギニンジヒドロラーゼ	-	-	-
オルニチンデカルボキシラーゼ	-	-	-
ONPG	+	+	+
尿素の加水分解	-	-	-
マロン酸塩の利用	-	-	-
炭水化物:			
アドニット	-	-	-
イノシット	-	-	-
ラフィノース	-	-	-
ラムノース	-	-	-
ソルビトール	+	+	+
サッカロース	-	-	-
マンニット	+	+	+
アラビノース	+	+	+
β -D-glucuronidase	+	+	+
オキシダーゼ	-	-	-
運動性	+	+	+

広島株: 患者由来株

岡山株: 原因施設の水由来株

大分株: 患者由来株

表2 広島県, 岡山県および大分県で分離された *E. coli* O55:H10と対照とした *E. coli* 株の薬剤感受性

薬 剤 名	<i>E. coli</i> 株														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
セファロチン	R	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	R	S	S
アミカシン	S	I	S	I	S	I	I	I	S	I	R	S	R	S	S
カナマイシン	S	I	I	I	I	I	I	R	I	I	R	I	R	I	R
ストレプトマイシン	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
エリスロマイシン	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
クロラムフェニコール	S	S	S	S	S	S	I	S	I	I	I	S	S	S	S
コリスチン	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	I	I
ナリジクス酸	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S
ホスホマイシン	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
オフロキサシン	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

E. coli 株の血清型

R: 耐性, I: 中間, S: 感受性

Lanes 1~6: O55:H10 (1~4: 広島株, 5: 岡山株, 6: 大分株)

7~10: O55:H7, 11: O157:H7, 12: O157:H45, 13: O26:H11, 14: O6:H16

15: O111:H-

solution (3%SDS, 50mM Tris (pH12.6), 2N NaOH) 200 μ lを加え, 60℃の水浴中で30~40分間溶菌させた. 溶菌液はフェノール:クロロホルム (1:1, vol/vol) 混液を300 μ l加えて100回転倒混和した後, 15,000rpmにて20分間遠心した. 上層の10 μ lをTAE Bufferで調整した0.7%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイド染色してから, トランスイルミネーターで観察し, 写真撮影を行った.

2分を1サイクルとして45サイクル行った. 増幅後, 反応液の10 μ lをTAE Bufferで調整した2.0%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイド染色してから, トランスイルミネーターで観察し, 写真撮影を行った. 増幅にはPROGRAMTEMP CONTROL SYSTEM PC 700 (アステック)を用いた.

結 果

6. RAPD プロファイル

Williamsら[3]の報告したRAPD法によってDNAの増幅パターンを比較した. PCRは, 以下のように行った. 被験菌をL-broth培地5mlに接種して, 37℃で15~20時間振盪培養し, 培養菌液1mlをマイクロチューブにとり12,000rpmにて3分間遠心した. そして, 上清を取り除いた後, 核酸抽出剤セパジーン (三光純薬) を使用して, 説明書に従ってDNAを抽出し, TE Bufferを1ml加えて希釈した液の10 μ lをテンプレートDNAとして使用した. プライマーには, 牧野[4]の報告したRAPD法に用いるプライマーのうちAP40 (5' -CCGCAGCCAA-3') とAP41 (5' -GCGATCCCCA-3') のオリゴヌクレオチドを合成 (ライフテックオリエンタル) して使用した. 反応液組成は, 20~30pmolに調整したプライマー1 μ l, 10 \times Buffer (TaKaRa) 10 μ l, dNTPmix (2.5mol, TaKaRa) 8 μ l, Taq (5u/ μ l, TaKaRa) 0.5 μ l, 滅菌蒸留水70.5 μ lとした. 増幅条件は牧野[4]に準じた. 但し, 増幅のサイクル回数は次の条件で行った. まず, 変性94℃, 5分, アニーリング36℃, 5分, 伸長72℃, 5分を1サイクルとして5サイクル行った. 続いて, 変性94℃, 1分, アニーリング36℃, 1分, 伸長72℃,

1. 生化学的性状

23種類の生化学的性状試験結果を表1に示した. 広島株, 岡山株および大分株はすべて同一の性状を示した.

2. 毒素産生性と *invE*, *ipaH* および *eaeA* 遺伝子の検出状況

毒素産生性試験と *invE*, *ipaH* および *eaeA* 遺伝子の検出試験の結果, 広島株, 岡山株および大分株からはいずれも, VT, LTおよびST産生性は認められなかった. また, *invE*, *ipaH* および *eaeA* 遺伝子も検出されなかった.

3. 薬剤感受性

被験15株の薬剤感受性試験結果を表2に示した. 広島株, 岡山株および大分株いずれもストレプトマイシン, エリスロマイシンに耐性を示し, ナリジクス酸, ホスホマイシンおよびオフロキサシンに感受性を示した. また, その他の薬剤もほぼ同一の感受性パターンを示した. しかし, 対照の *E. coli* 株にも類似した感受性パターンがみられ, 両者の違いは明瞭でなかった.

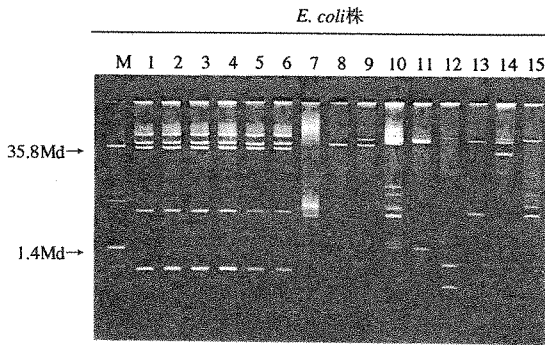


図1 広島県, 岡山県および大分県で分離された *E. coli* O55:H10 と, 対照とした *E. coli* 株のプラスミドプロファイル
E. coli 株の血清型
Lanes 1~6: O55 : H10 (1~4: 広島株, 5: 岡山株, 6: 大分株)
7~10: O55 : H7, 11: O157 : H7
12: O157 : H45, 13: O26 : H11
14: O6 : H16, 15: O111 : H-
M: Marker (*E. coli* V517)
Md: Megadalton

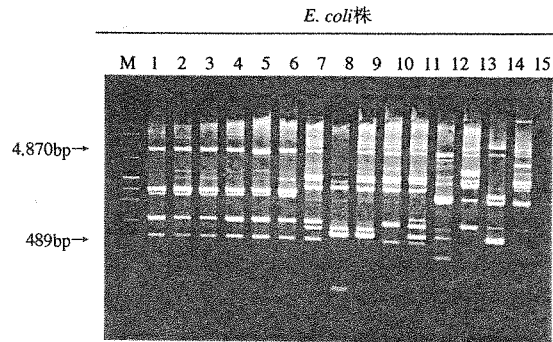


図3 広島県, 岡山県および大分県で分離された *E. coli* O55 : H10 と, 対照とした *E. coli* 株の, AP41 をプライマーに用いたときの RAPD プロファイル
E. coli 株の血清型
Lanes 1~6: O55 : H10 (1~4: 広島株, 5: 岡山株, 6: 大分株)
7~10: O55 : H7, 11: O157 : H7
12: O157 : H45, 13: O26 : H11
14: O6 : H16, 15: O111 : H-
M: Marker (DNA pHY Marker, TaKaRa)

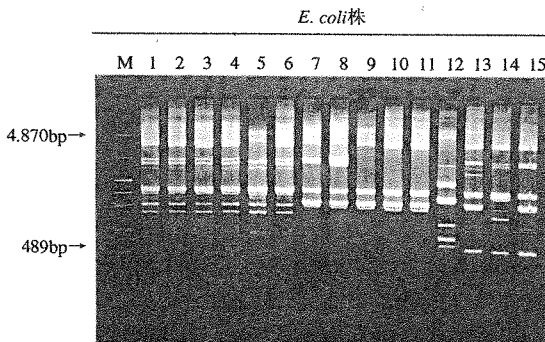


図2 広島県, 岡山県および大分県で分離された *E. coli* O55 : H10 と, 対照とした *E. coli* 株の, AP40 をプライマーに用いたときの RAPD プロファイル
E. coli 株の血清型
Lanes 1~6: O55 : H10 (1~4: 広島株, 5: 岡山株, 6: 大分株)
7~10: O55 : H7, 11: O157 : H7
12: O157 : H45, 13: O26 : H11
14: O6 : H16, 15: O111 : H-
M: Marker (DNA pHY Marker, TaKaRa)

間 (Lanes 7, 8 と Lanes 9, 10, 11) に類似したプロファイルが認められた。一方, AP41 のプライマーによる増幅では, それらはすべて異なるプロファイルを示し, RAPD 法に使用するプライマーの塩基配列によっては, 血清型や由来の異なる菌株間においても類似したプロファイルを示すことが認められた。

考 察

従来, 食中毒事件で分離された菌株間の相同性については, 血清型別, 生化学的性状, 生物型, 毒素産生性と毒素型および薬剤感受性などの生物学的指標による解析が行われてきた。しかし, これらの指標だけでは明確な菌株間の一致性を鑑別できない事例も認められた。そこで近年では, これらの指標に加え, プラスミドプロファイル, パルスフィールドゲル電気泳動法, RAPD プロファイルなどの遺伝子学的手法による解析が行われるようになり, 菌株間の相同性がより明確に鑑別できるようになってきた。このうちプラスミドプロファイルと RAPD プロファイルは手法的にも簡便で, 迅速に実施でき, 種々の菌種で疫学的解析に応用されている。我々もこれまで, コアグラウゼ IV 型 *Staphylococcus aureus* による食中毒事件[5]や, Hobbs 型別不能ウエルシュ菌による食中毒事件[6]においてその有用性を報告してきた。

今回, 我々は, 岡山県内の飲食施設で発生した食中毒事件で, 当センターが本県患者から分離した *E. coli* O55 : H10 と, 岡山県内の原因施設の水および大分県の患者から分離された *E. coli* O55 : H10 との関連性について検討を行った。その結果, 今回, 分離された *E.*

4. プラスミドプロファイル

被験 15 株のプラスミドプロファイルを図 1 に示した。広島株, 岡山株および大分株にはいずれも 5 個のプラスミドが認められ, そのプロファイルはすべて一致していた。一方, 対照の *E. coli* 株には, これらと同じプロファイルを示すものは認められなかった。

5. RAPD プロファイル

被験 15 株の AP40 と AP41 のプライマーによる RAPD プロファイルをそれぞれ図 2, 図 3 に示した。広島株, 岡山株および大分株のプロファイルはいずれも一致していた。一方, 対照の *E. coli* 株には, これらと同じプロファイルを示すものは認められなかった。しかし, AP40 のプライマーによる増幅では, 対照の *E. coli* 株

coli O55:H10 の血清型は、Vero 毒素産生性大腸菌 (Verotoxin-producing *E. coli*, VTEC) に該当[7]したが、3 県で分離された *E. coli* O55:H10 からは、いずれも VT 産生性は認められなかった。また、LT および ST 産生性もなく、*invE*、*ipaH* および *eaeA* 遺伝子も検出されなかった。そのため、分離株の病原因子については明らかでなかった。次いで、菌株間の性状をみると、広島株、岡山株および大分株の生化学的性状はすべて一致し、薬剤感受性パターンもほぼ同一であった。しかし、薬剤感受性パターンについては、対照の *E. coli* 株と顕著な相違はみられず、感受性パターンでは菌株間の相同性は判断できなかった。一方、プラスミドプロファイルでは、広島株、岡山株および大分株はすべてプラスミドを 5 個保有し、そのプロファイルは一致していた。また、使用した 2 種類のプライマーによる RAPD プロファイルについてもそれぞれ一致したプロファイルを示し、対照の *E. coli* 株とは明瞭な差異を示した。これらのことから 3 県で分離された *E. coli* O55:H10 は、すべて同一由来株であることが示唆された。そのため、プラスミドプロファイルと RAPD プロファイルによる解析は、菌株間の関連性を判断するには極めて有用であった。しかし、RAPD 法は使用するプライマーの塩基配列により、異なる菌株間においても類似したプロファイルを示すこともあり、菌株間の相同性を判断するには、複数のプライマーによる一貫性を検討することが重要と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、貴重な菌株を分与していただいた岡山県環境保健センターの中嶋洋先生、大分県衛生環境研究センターの測祐一先生に深謝いたします。

文 献

- [1] Bernard, C., Vinciane, P. and Jacques, M. (1996) : Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **12**, 3462-3465.
- [2] Kado, C. I. and Liu, S. T. (1981) : Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, **145**, 1365-1373.
- [3] Williams, J. G., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535.
- [4] 牧野 莊一 (1995) : RAPD-DNA フィンガープリンティング法—その原理と細菌学への応用—。モダンメディア, **41**, 186-194.
- [5] 竹田 義弘, 福田 伸治, 門田 達尚 (1995) : 広島県内で発生したコアグラゼ IV 型 *Staphylococcus aureus* による食中毒事例について。広島県保健環境センター研究報告, **3**, 21-26.
- [6] 福田 伸治, 竹田 義弘, 門田 達尚 (1995) : Hobbs 型別不能ウエルシュ菌食中毒における分離菌株の遺伝子学的方法による同一性の確認。広島県保健環境センター研究報告, **3**, 13-16.
- [7] 甲斐 明美, 工藤 泰雄 (1992) : 腸管出血性大腸菌の同定法 1. Vero 毒素の検出法。臨床検査, **36**, 1329-1333.