

パルスフィールドゲル電気泳動を用いた牛由来腸管出血性大腸菌 O157:H7 に関する分子疫学的研究

秋庭 正人

Molecular epidemiological study on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle using pulsed-field gel electrophoresis

Masato AKIBA

腸管出血性大腸菌 O157:H7 (O157) は、1982 年に米国において集団食中毒の原因と認識されて以来世界的な問題となり、わが国においても 1996 年に本菌による集団食中毒が多発した。北米やヨーロッパにおいては O157 保菌牛が人の感染源として重要視されているが、わが国においては人の集団感染に牛が直接関連した事例は報告されていない。一方、農林水産省が 1996 年に行った農場における O157 の浸潤調査では 0.62% の牛から本菌が分離されている。しかし、これら保菌牛の排菌数や排菌期間に関する情報は少なく、農場レベルでの本菌の動態は不明であることから、人の O157 感染症におけるわが国の牛群の重要性は依然として明らかでない。そこで本研究においては、農場における O157 の生態と伝播様式の解明を目的として一連の研究を行った。

1. わが国の牛から分離された O157 の遺伝子型別

農場レベルでの O157 の疫学的動態を明らかにするために必要な O157 型別法の評価を行った。23 県の家畜保健衛生所等で 77 頭の牛から分離した 77 株の O157 について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による型別、PCR 法による毒素遺伝子型別、ファージ型別を行った。また得られた PFGE 像を用いてクラスター解析を行い、PFGE 型と毒素遺伝子型、ファージ型との相関を調べた。これらの手法を用いて国立感染症研究所から分与を受けた人由来 11 株と牛由来株を比較した。

制限酵素 *Xba* を用いた PFGE では 77 株に 50 の異なる泳動像を認めた。ファージ型別では 15 の型が確認され、このうちファージ型 21 (16 株, 20.8%), 54 (16 株, 20.8%), および 34 (11 株, 14.3%) が優勢であった。また 77 株中 75 株 (97.4%) は *stx1* および *stx2* のいずれかの

遺伝子を保有しており、28 株 (36.4%) は両遺伝子保有菌、43 株 (55.8%) は *stx2* 単独保有菌であった。

識別力の指標であるシンプソンの D 値は PFGE 型別で 0.987、ファージ型別で 0.884、すなわち 77 株からランダムに 2 株を選んだとき、それらが異なる型に属する確率が PFGE で 98.7%、ファージ型別で 88.4% と算出された。したがって、わが国の牛由来 O157 型別法としては PFGE が識別力の点で優れており、疫学解析上の有力なツールとして使用可能であると考えられた。一方、PFGE 像を用いてクラスター解析を実施したところ、PFGE 型と毒素遺伝子型には相関が認められたが、PFGE 型とファージ型とは関連性が低かった。したがって牛由来 O157 型別法として PFGE を標準的な方法として用い、ファージ型別を併用することによって、より詳細な疫学的知見を得ることができるものと考えられた。

また牛由来 77 株中 1 株は 2 種類の制限酵素 (*Xba*, *Bln*) を用いた PFGE、毒素遺伝子型別、ファージ型別のいずれの手法を用いても人の集団感染株と識別不能であった。これは、欧米と同様にわが国においても牛が人への感染源となっている可能性を示唆する成績と考えられた。

2. 自然感染牛における O157 の排菌パターンと分離菌の遺伝子型の変化

農場における本菌の排菌数、排菌期間を究明するために、1 農場における保菌牛 7 頭について経時的に糞便からの菌分離を行い、分離菌の毒素遺伝子型や PFGE 像を調べた。7 頭中 1 頭において 2 ヶ月以上の持続的排菌が、3 頭において 2 ヶ月前後の間欠的排菌がそれぞれ認められ、この間の排菌数は糞便 1g 当たり 43 個以下と推定された。

分離菌46株をPFGEで解析したところ、*Xba* で4型、*Bln* で6型、*Spe* で4型に区分することができ、さらにこの組み合わせで、46株を9つのサブタイプに区分することができた。1菌株を除くと、各制限酵素で検出できた異なるバンドの数は3本以下であり、これら菌株の近縁度が高いことが示された。

調査対象牛のうち持続的または間欠的排菌が認められた4頭中3頭において分離菌のサブタイプが時間の経過とともに変化する現象が認められた。特に保菌牛1頭においては、1週間おきに分離菌のサブタイプが変化した。これら分離菌は互いに近縁であることが示唆されたので、本現象は牛腸管内における遺伝的変異と優勢菌の交代を反映するものと推察された。

3. 実験感染牛におけるO157の排菌パターンと分離菌の遺伝子型の変化

自然感染牛で認められたO157分離菌の遺伝子型変化が実験的に再現できるか否か検討を加えた。事前に腸管出血性大腸菌陰性であることを確認した8週齢のホルスタイン去勢雄牛3頭を個別飼育し、うち2頭（No. 1, 2）に10⁸CFUのO157（*stx1*-、*stx2*+、*eaeA*+）を経口投与し、他の1頭（No. 3）は未投与対照とした。投与の翌日より計3頭の牛から毎日直腸便を採取し、O157を分離し、それをPFGEで解析した。

2頭の実験感染牛において、O157の排菌は投与後49日、50日後まで観察された。未投与対照牛からはO157は分離されなかった。自然感染牛における成績と合わせて考えると、O157は牛に対して病原菌としてよりも、大部分の非病原性大腸菌と同様の挙動を示し、その排菌は再感染がなければ2ヶ月前後で終了することが示唆された。

また分離菌401株の解析において、投与後2日目には両牛から変異菌が回収された。牛No.1では投与後32日目以降投与菌が回収不能となった。牛No.2では投与後38、42日目に投与菌は回収されなかったが、その後投与菌のみが回収された。各牛由来の変異菌に17種類および10種類のPFGE型が認められたが、両牛間で同じPFGE型を示す株は認められなかった。以上の成績から牛腸管内におけるO157のランダムな遺伝子型の変化と適応遺伝子型の増殖による優勢菌の交代を反映する現象が2頭の実験

感染牛で再現できたものと考えられた。

牛No.1から分離された株に90kbプラスミドの脱落を伴う変異菌が認められた。プラスミド脱落による変化を差し引くと、変異菌と投与菌のPFGE像の比較において、染色体DNAに由来する範囲で異なるバンド数は最大4本であった。このことから、PFGEを用いて牛由来O157の解析を行う場合、少なくとも異なるバンド数が4本までは疫学的関連を疑う必要があることが示唆された。

4. 日本および米国の牛から分離されたO157の疫学マーカーによる比較

グローバルな視点からの疫学的知見を得ることを目的として、わが国と米国における牛由来O157の比較を行った。国内の牛から分離された91株と米国内で牛から分離された415株をPFGE、PCR、あるいはファージタイピング等の手法によって比較したところ、日本の牛から分離された3株（JP37、JP88、JP102）は米国の牛から分離された株と高い相同性を示した。すなわちJP37株は1米国株と*Bln* を用いたPFGEで識別不能であり、*Xba*、*Spe* を用いたPFGEでは異なるバンド数が4本以下であった。またJP88株は1米国株と同じファージ型に属しており、上記3種の制限酵素を用いたPFGEで異なるバンド数は3本以下であった。さらにJP102株は1米国株と同じファージ型に属しており、上記3種の制限酵素を用いたPFGEで異なるバンド数は5本以下であった。以上の成績から本菌は共通の媒体を介して長い距離を伝播し、複数の大陸の牛群に広がる可能性が考えられた。

以上の研究より、わが国の牛由来O157型別法としてはPFGEが識別力の点で優れており、疫学解析上の有力なツールとして使用可能であることが明らかとなった。牛由来77株中1株は2種類の制限酵素を用いたPFGE、毒素遺伝子型別、ファージ型別のいずれの手法を用いてもヒトの集団感染株と識別不能であったこと、さらに牛の保菌期間が少なくとも50日以上であったことから、わが国においても牛が人への感染源となっている可能性が示唆された。また本研究において牛の腸管内でO157の遺伝子型の変化と優勢遺伝子型の交代現象が起こることを初めて明らかにした。さらにO157は共通の媒体を介して長い距離を伝播し、複数の大陸の牛群に広がる可能性が考えられた。