

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24406016

研究課題名(和文) アルゼンチンとタイでの腸管出血性大腸菌の流行状況と分離菌の性状及び我が国との比較

研究課題名(英文) Comparative analysis of prevalence of EHEC and their characterization between Argentina and Thailand

研究代表者

山崎 伸二 (Yamasaki, Shinji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：70221653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルゼンチンの患者、特にHUS患者から分離されたEHECは0157、0145でstx2aとstx2c、eae、astA遺伝子が陽性であった。牛からも同様の性状を有する菌が分離された。一方、タイでは患者から分離されたEHECの約75%がstx1、eae遺伝子陽性の0111あるいはeae陰性の0145で、牛から分離されたEHECの多くもeae遺伝子陰性の0145か7種類の主要なO血清型以外であった。アルゼンチンでHUS等重症患者が多い理由として、eaeやstx2a/stx2cに加えastA遺伝子も関係している可能性が考えられた。実際EAST1が乳飲みマウスで液体貯留を起こすことも確認した。

研究成果の概要(英文)：Characteristic of EHEC isolated from patient with diarrhea, particularly HUS patient in Argentina, was 0157 and 0145 with stx2a and/or stx2c, eae and astA genes. EHEC strains having similar characteristic were also isolated from cattle in Argentina. On the other hand, about 75% of EHEC strains isolated from patients with diarrhea in Thailand were stx1 and eae-positive 0111 and eae-negative 0145. A number of eae-negative 0145 and O serogroups other than the major 7 serogroups of EHEC such as 026, 0103, 0111, 0121, 0145, 0157, and 0165, were isolated from cattle in Thailand. The reason why EHEC strains in Argentina are associated with more severe complications such as HUS in comparison to those in Thailand may be due to the presence of astA gene in addition to stx2a and/or stx2c and eae in major O serogroups. Indeed, EAST1 chemically synthesized was shown to cause fluid accumulation in suckling mice.

研究分野：細菌学

キーワード：EHEC/STEC 大腸菌 HUS アルゼンチン タイ

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、牛等の反芻動物の腸管に生息していることから牛が人への感染源となる。人が感染すると水様下痢を、重症化すると血性下痢や出血性大腸炎のみならず、特に小児や老人では溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を発症し、死に至る場合もある。しかし、我が国を始めとする欧米では EHEC の集団食中毒や重症例が多数報告されているが、タイなどの熱帯・亜熱帯地方では牛から EHEC が分離されるものの下痢症患者からはほとんど分離されず、分離されても重症患者でなく水様下痢症患者からである。一方、アルゼンチンは、EHEC による下痢症患者が多く、世界で小児の HUS の発生率が最も高いことが知られている。

2. 研究の目的

なぜ、タイでは EHEC が牛から分離されるが、下痢症患者からあまり分離されず、重症患者でもないのか？一方、アルゼンチンでは、なぜ、HUS 等重症患者が多数発生するかについて、それぞれの国の牛、患者から分離される EHEC の細菌学的性状を比較することにより、重症化に関わる EHEC の特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 牛から EHEC の分離

アルゼンチンの 283 頭の牛から直腸スワブ検体を採取し、Tryptic Soy Broth (TSB) 培地で増菌培養後、志賀毒素 1 型 (*stx1*) と志賀毒素 2 型 (*stx2*) 遺伝子を増幅できるマルチプレックス PCR により *stx1* と *stx2* 遺伝子を検出した。PCR で *stx1* または *stx2* 遺伝子が陽性となった検体から MacConkey 寒天培地あるいはクロモアガー-STEPC で大腸菌を分離し、<sup>32</sup>P で標識した *stx* (1 と 2) 遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションにより *stx* 遺伝子を検出し、EHEC を分離した。

タイの 284 頭の牛からも同様の方法で EHEC を分離した。

(2) 患者検体から EHEC の分離

下痢症患者便から MacConkey 寒天培地を用いて EHEC を分離した。疑わしきコロニーを PCR 法で *stx1* あるいは *stx2* 遺伝子の有無を確認した。

(3) 分離菌の血清型

分離菌の O 血清型は、特異 O 抗血清による凝集反応、または EHEC で主要な 7 種類 (O26、O103、O111、O121、O145、O157、O165) の O 抗原遺伝子に特異的な PCR 法により決定した。

(4) *stx* 遺伝子型とサブタイプの決定

分離した EHEC を *stx1* 遺伝子と *stx2* 遺伝子を一度に検出できるマルチプレックス PCR 法で *stx* 遺伝子型を決定した。さらに *stx2*

遺伝子と同定されたものについてサブタイプ特異的 PCR により *stx2e*、*stx2f*、*stx2g* を決定し、*stx2a* から *stx2d* の 4 種類のサブタイプは、*stx2A* と *stx2B* 遺伝子の一部を増幅できる PCR 法で増幅し得られた PCR 産物の塩基配列を解析することにより決定した。

(5) 病原因子プロファイル

分離した EHEC について下痢原性大腸菌が保有する *stx* 以外の病原遺伝子 16 種類 (*eae*、*bfpA*、*EAF*、*hlyA*、*saa*、*lpfA*<sub>0113</sub>、*iha*、*eha*、*efaA1*、*est*、*elt*、*astA*、*Eagg*、*invE*、*cnf*、*cdt*) の全てあるいはその一部の分布についてコロニーハイブリダイゼーションによって解析した。

4. 研究成果

(1) アルゼンチンの牛からの EHEC の分離と分離菌の細菌学的性状解析

PCR 法により 283 頭の牛糞便から *stx* 遺伝子を検出し、90 検体で陽性となり、32% の陽性率であった。*stx* 遺伝子が陽性となった 90 検体から、45 株の EHEC が分離できた。45 株中 O157 (*eae+*) が 3 株、O145 (*eae+*) が 1 株、OUT で *eae* 遺伝子陽性が 1 株あった。予想に反して牛糞便中の EHEC 陽性率は 32% と高くなかった。一方、重症患者から分離されている O157 (*stx2*、*eae*、*astA+*) や O145 (*stx2*、*eae*、*astA+*) が、それぞれ 2 株、1 株分離された。

表 1. アルゼンチンの牛由来 EHEC の性状

O 血清型	株数	Stx 型	病原因子
O157	1	1/2a/2c	<i>eae</i> 、 <i>astA</i>
O157	1	2a/2c	<i>eae</i> 、 <i>astA</i>
O157	1	1	<i>eae</i>
O145	3	2a	<i>eae</i> 、 <i>astA</i>
O91	2	1/2a/2d	<i>saa</i> 、 <i>lpfA</i>
O8	1	1/2a	<i>saa</i> 、 <i>lpfA</i>
O8	1	2a/2d	<i>lpfA</i>
O116	1	2a/2d	Nothing
O153	1	1/2a/2d	<i>saa</i> 、 <i>lpfA</i>
O153	1	2a/2d	<i>lpfA</i>
O153	1	2c	<i>lpfA</i>
O rough	2	2a/2d	<i>lpfA</i>
O rough	1	2c	<i>lpfA</i>
O rough	1	1/2a/2d	<i>saa</i> 、 <i>lpfA</i>
O rough	1	2g	<i>eae</i>
O rough	1	2g	<i>lpfA</i> 、 <i>astA</i>
O rough	1	2g	<i>astA</i>
OUT	8	2c	<i>lpfA</i>
OUT	4	2a	<i>lpfA</i>
OUT	1	2b/2c/2g	<i>lpfA</i>
OUT	3	2a	<i>saa</i> 、 <i>lpfA</i>
OUT	1	1/2a/2c	<i>saa</i> 、 <i>lpfA</i>
OUT	1	1/2a	<i>saa</i> 、 <i>lpfA</i>
OUT	1	2g	<i>lpfA</i> 、 <i>astA</i>
OUT	1	1/2c	<i>lpfA</i>
OUT	1	1	<i>lpfA</i> 、 <i>astA</i>
OUT	1	1	<i>lpfA</i> 、 <i>hlyA</i>

一方、*stx2* のサブタイプとして *stx2a* と *stx2c* が多く検出されたが、*stx2d* や *stx2g* も検出された。

(2) タイの牛由来 EHEC の分離と分離菌の細菌学的性状

PCR 法により 284 頭の牛糞便から *stx* 遺伝子を検出し 168 検体で陽性となり、59%の陽性率であった。*stx* 遺伝子が陽性となった 168 検体から 40 株の EHEC が分離できた。

表 2-1. タイの牛由来 EHEC の性状

O 血清型	株数	Stx 型	病原因子
O157	2	2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O157	1	2d	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O145	9	2a	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	5	2c	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	5	2d	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	4	1	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	3	2a	Nothing
O145	1	2a/2c	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O103	2	1	<i>eae</i> , <i>astA</i>
OUT	2	1	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	1	2a/2d	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	1	2a	<i>eae</i> , <i>astA</i>

表 2-2. タイの牛由来 EHEC の性状

O 血清型	株数	Stx 型	病原因子
O145	5	2c	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	4	1/2c/2d	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	4	2a/2c	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	3	2a	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	2	2c	<i>lpfA</i>
O145	2	2b	Nothing
O145	2	1	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
O145	1	1	<i>lpfA</i>
O145	1	2a/2b	Nothing
O145	1	2a/2d	Nothing
O145	1	2c/2d	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	6	2c	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	1	2a/2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
OUT	1	1/2d	<i>saa</i> , <i>lpfA</i> , <i>hlyA</i>
OUT	1	1/2a/2d	<i>lpfA</i>
OUT	1	1/2c/2d	<i>eae</i> , <i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	1	2d	<i>saa</i>
OUT	1	2g	<i>lpfA</i>
OUT	1	1/2a/2c	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	1	1/2a	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	1	2a/2b	Nothing
OUT	1	2d	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>
OUT	1	1	<i>lpfA</i>
OUT	1	2a/2c	<i>lpfA</i> , EAF, <i>astA</i>
OUT	1	2a	<i>lpfA</i> , EAF, <i>astA</i>

表 2-1 に示したように、タイの牛由来 EHEC の特徴として、ヒトへ重症化を引き起こす O157(*stx2*, *eae*, *astA*+) も存在したが、*stx* 遺伝子のサブタイプは *stx2a* でなく *stx2c* と *stx2d* であった。また、O145 が多数分離され

たが、*stx1*、*stx2a*、*stx2c*、*stx2d* 等、様々なサブタイプが見つかった。一方、全てで *eae* 遺伝子陰性であった。*eae* 遺伝子陽性の O103 も分離されたが、*stx1* 保有株であった。

さらに、牛から分離した EHEC 45 株についても同様に性状を調べたところ、半分以上の 26 株が O145 で、全てが *eae* 遺伝子陰性であった。また、*stx* 型も *stx1* や *stx2e* を除く *stx2a* から *stx2g* までの 6 種類のサブタイプの全てが検出された。

2 株で *eae* 遺伝子が陽性となったが、全ての株が EHEC で主要な 7 種類の O 血清型に型別されなかった。*astA* 遺伝子陽性株も OUT の 3 株のみであった。

(3) アルゼンチンの患者から分離された EHEC の細菌学的性状

アルゼンチンの患者から分離された EHEC 24 株 (HUS 患者の家族からの分離株 2 株を含む) は、O157、O145、O111 と EHEC の主要な O 血清型でかつ全て *eae* 遺伝子陽性であった。しかし、*stx* 型は、O157 と O145 が *stx2a* と *stx2c* の両方あるいはどちらかが陽性であったが、O111 は全て *stx1* 遺伝子のみ陽性であった。特に HUS 患者由来株は、*stx2a* と *stx2c* の両遺伝子陽性株が 90% を占めた。O111 の 1 株を除き患者由来株の全てで *astA* 遺伝子陽性であり、*astA* も重症化に関わっている可能性が考えられた。

表 3. アルゼンチンの患者由来 EHEC の細菌学的特徴

O 血清型/病型	株数	Stx 型	病原因子
O157/HUS	7	2a/2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O157/HUS (F)	1	2a/2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O157/BD	3	2a/2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O157/BD	1	2a	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O157/D	1	2a	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O157/NA	1	2a	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O145/HUS	2	2a/2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O145/HUS	1	2a	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O145/D	2	2a	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O145/D	1	2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O111/HUS (F)	1	1	<i>eae</i>
O111/BD	1	1	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O111/D	1	1	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O111/NA	1	1	<i>eae</i>

(F): HUS 患者の家族からの分離株  
NA: 不明

(4) タイの患者から分離された EHEC の細菌学的性状

タイの患者から分離された EHEC 13 株の O 血清型は、O111 が 7 株と最も多く、O157、O145 がそれぞれ 3 株であった。O145 以外は全て *eae*, *astA* 遺伝子が陽性であった。Stx 型は、O111 が全て *stx1* 遺伝子のみ陽性、O157 は *stx2c*、O145 は *stx1* と *stx2c* 遺伝子の両陽性であったが、重症患者由来株が保有する 1 つである *stx2a* は全てで陰性であった。牛由来

株で2株、患者由来株でEAF陽性となった株が1株あったが、EAF陽性となった意義については不明であり、今後解析して行く必要がある。

表4. タイの患者由来 EHEC の細菌学的特徴

O血清型	株数	Stx型	病原因子
O111/D	6	1	<i>eae</i> , <i>astA</i> , <i>lpfA</i>
O111/D	1	1	<i>eae</i> , EAF, <i>astA</i> , <i>lpfA</i>
O157/D	3	2c	<i>eae</i> , <i>astA</i>
O145/D	3	1/2c	<i>saa</i> , <i>lpfA</i>

#### (5) まとめ

重症患者が多数報告されているアルゼンチンで分離される EHEC の特徴として血清型は O157 と O145 で、病原因子としては *stx2a* と *stx2c*, *eae* と *astA* 陽性であった。また、牛からも同様の EHEC が分離された。

一方、タイにおいては、患者から分離された EHEC の特徴として O111 で *stx1* 陽性菌が多く、*eae* 遺伝子陰性の O145 であった。牛から O157 が分離されているものの *stx2a* 陽性菌はなく *stx2c* または *stx2d* 陽性菌であった。さらに、*eae* 遺伝子陰性の O145 が多数分離された。一部の菌で Stx の産生量を調べたところ、アルゼンチンの株では 10-800 ng/mL であったのに対し、タイの株では 10-300 ng/mL と少なかった。また、化学合成した EAST1 が乳飲みマウスで腸管内液体貯留が認められた。EAST1 と Stx2 の両毒素が存在することが高病原性に関わっている可能性が考えられた。この点については今後さらに詳細に調べて行く必要がある。以上より、これら EHEC の O 血清型や病原因子プロファイルの違いがアルゼンチンでの高病原性、タイでの低病原性に関係している可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計5件)

1. R. A. Ombarak, A. Hinenoya, S. P. Awasthi, A. Shima, A.R. M. Elbagory, and S. Yamasaki. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **Int. J. Food Microbiol.**, 221: 69-76, 2016. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.009.
2. A. Shima, A. Hinenoya, W. Samosornsuk, S. Samosornsuk, N. Mungkornkaew, and S. Yamasaki. Prevalence of *Providencia* strains among patients with diarrhea and retail meats in Thailand. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 2015 Sep 11. [Epub ahead of print]
3. A. Hinenoya, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Ooka, T. Hayashi, T. Ramamurthy, S.M. Faruque and S. Yamasaki. Molecular characterization of

cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. **BMC Microbiol.**, 14(4):97, 2014. doi: 10.1186/1471-2180-14-97.

4. Kh. Kafshdouzan, T. S. Zahraei, B. F. Nayeri, O. Mafafgar, S. Yamasaki, A. Hinenoya, and Yasuda, N. Distribution of virulence associated genes in isolated *Escherichia coli* from avian colibacillosis. **Iran. J. Vet. Med.**, 7(1):1-6, 2013.
5. A. Shima, A. Hinenoya, M. Asakura, A. Nagita, and S. Yamasaki. Prevalence of *Providencia* strains among children with diarrhea in Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 65(11): 545-547, 2012. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/65/6/65\\_545/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/65/6/65_545/_pdf)

##### [学会発表](計6件)

1. 新井暢夫、畑中律敏、安田憲朋、日根野谷淳、山崎伸二：下痢症患者から分離された大腸菌が持つモザイク CDT の性状解析．第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23-25 日、大阪国際交流センター 大阪
2. 奥野健太郎、German A. Kopprio, Ruben J. Lara, 日根野谷淳、山崎伸二：アルゼンチンにおいて肉用牛から分離された志賀毒素産生性大腸菌の分子疫学的性状解析．神戸微生物科学協会 第 4 回産学連携事業研究発表会．2016 年 3 月 11 日、兵庫県民会館，神戸
3. 奥野健太郎、日根野谷淳、山崎伸二：アルゼンチンにおける肉用牛からの志賀毒素産生性大腸菌の分離と性状解析．第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2014 年 7 月 15 日-16 日、同志社大学、京都
4. 奥野健太郎、G. A. Kopprio, R. J. Lara, 日根野谷淳、山崎伸二：アルゼンチンで分離された志賀毒素産生性大腸菌の分子疫学的解析．第 66 回日本細菌学会関西支部総会 2013 年 11 月 16 日、阪大微研、大阪
5. 山崎伸二：2011 年ドイツ O104 集団感染事例 “A New STEC”、シンポジウム 第 9 回日本小児消化管感染症研究会 2013 年 2 月 9 日、北浜フォーラム(大阪証券取引所) 大阪
6. 山崎伸二：腸管出血性大腸菌：今後の課題、特別講演、第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2012 年 7 月 19 日-20 日、パーティーギャラリーイヤタカ、秋田

##### [図書](計3件)

6. 山崎伸二：食品媒介性感染症の国際化について、チャイルドヘルス(診断と治療社) 19 (4)：80(251-257), 2016
7. 山崎伸二：食品由来耐性菌の現状とヒトへの伝播、メディカル・テクノロジー(医歯薬出版) 41(6)：(138) 659-664, 2013.
8. 山崎伸二：簡易迅速検査法の重要性、微生物の簡易迅速検査法、(五十君静信、江崎

孝行、高鳥浩介、土戸哲明監修、テクノシステム) (792) 9-16, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/intpre/news/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 伸二 (YAMASAKI Shinji)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：7 0 2 2 1 6 5 3

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

日根野谷 淳 (HINENOYA Atsushi)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号：2 0 5 4 8 4 9 0

塚本 定三 (TSUKAMOTO Teizou)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科  
・客員研究員  
研究者番号：8 0 2 5 0 3 1 4