

称号及び氏名	博士（獣医学）嶋 謙介
学位授与の日付	平成18年3月31日
論文名	「志賀毒素ファージの多様性に基づく志賀毒素産生性大腸菌の分子疫学的解析法の開発とその応用」
論文審査委員	主査 山崎 伸二 副査 小崎 俊司 副査 倉園 久生

論文要旨

緒言

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli* STEC) は、血性下痢と激しい腹痛を主症状とする出血性大腸炎の原因となり、溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic uremic syndrome: HUS) や脳症などの、重篤な合併症の発症が大きな問題となっている。現在 STEC には約 200 種類の血清型が知られているが、世界的に見て O157:H7 の分離頻度が最も高く、かつ重症患者や集団事例から分離される多くはこの血清型で占められている。本菌が原因となった 1996 年の大阪府堺市における事例では患者約 8000 名、死者 3 名を出すまでに至り、世界で類を見ない大規模集団食中毒事例となった。1996 年以後も、大規模な集団事例こそ発生してはいないものの、毎年多数の散發事例が発生し、年間 3000 名前後の感染者が発生している。また、同一の感染源によって広域に散發事例が発生するという広域集団散發事例が新たな問題として浮上してきている。感染源や感染経路を早期に特定し、感染の拡大を防ぐことは、特に小児や高齢者において問題となっている HUS や脳症のリスクを軽減する上に於いて極めて重要である。感染源や感染経路の特定に、分子疫学解析法が大きな威力を発揮している。中でも、識別能力や再現性が高い Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) が濶用されている。しかし、PFGE にもさまざまな問題点が指摘され、迅速、簡便かつ精度の高い解析法の開発が望まれている。我々の研究グループは、STEC の最も主要な病原因子である志賀毒素 (Stx: Shiga toxin) をコードする Stx ファージのゲノム中に 6 ヶ所の特徴的な領域が存在していることを見いだした。本研究では、この 6 ヶ所の中で最も多様性が存在する region V を標的とした PCR-RFLP 法すなわち、PCR 産物を制限酵素で消化し、その Restriction fragment length polymorphism (RFLP) を解析する方法を開発し、PFGE の様々な問題点を克服できるかを試みた。

Stx フェージ中の *stx* 遺伝子上流に位置し、最も多様性が存在する region V 約 10 kb を増幅できるプライマーを設計し、Long and accurate (LA)-PCR を行った。PCR 産物を *Bgl*I もしくは *Eco*RV で消化し、RFLP を調べるために消化物をアガロースゲル電気泳動で解析した。*E. coli* C600 株を陰性コントロールとし、すでにゲノム構造が明らかとなっている 6 種類の Stx フェージが溶原化している菌株を陽性コントロールとした。陽性コントロールで期待される大きさの RFLP パターンが得られることを確認し、我が国や北米で患者及び家畜等から分離された STEC O157、204 株を選び PCR-RFLP を行った。その結果、解析した 204 株のうち、202 株で 8.2 kb から 14 kb の大きさの 1 本から 3 本のバンドが得られた。これらの 202 株の PCR 産物を *Bgl*I もしくは *Eco*RV で消化し、RFLP パターンを比較すると 24 タイプに分類することができた。さらに、24 タイプに分類した代表株と、それぞれのタイプに属する数株について、PFGE で解析し、PCR-RFLP の結果と比較したところ、時間的・地理的に一致して分離された菌株の場合、両者の結果には高い相関関係が見られた。また、PFGE の RFLP パターンは同一であるが、PCR-RFLP で異なるタイプの株も確認され、PFGE よりも識別度の高い場合も存在した。さらに、栃木県、兵庫県、愛知県、福岡県で起こった 4 つの異なる集団事例から単離され、国立感染症研究所において PFGE により単一株であると確認された STEC O157 をそれぞれ 10 株ずつ選び、本 PCR-RFLP 法にて解析した。その結果、栃木県、兵庫県、愛知県由来のそれぞれの 10 株は PCR-RFLP により同一のパターンを示したが、福岡県由来の 10 株は増幅産物が得られなかった。これらの結果から本 PCR-RFLP 法は PFGE と同等あるいはそれ以上の精度で解析できることが明らかとなった。一方、Stx フェージの region V にはさらに多様性が存在していることもわかり、本 PCR-RFLP 法も改良の余地があることが示唆された。

第2章 牛の腸管通過によって PFGE の RFLP パターンが変化した腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli* EHEC) に対する PCR-RFLP の評価

ある種の菌株が、人や牛の腸管を通過するだけで PFGE で得られる RFLP パターンが変化することが見いだされ、これをクローナルターンオーバーと呼んでいる。このクローナルターンオーバーによる RFLP パターンの変化が、菌の分子疫学的解析結果の解釈を複雑にする要因の一つとして問題となっている。そこで、約 2 ヶ月間、連続的に 3 頭の牛の糞便から回収され、PFGE により 4 グループに分類された EHEC O157:H7 と EHEC O157:H7 を牛に経口投与した後、再度糞便から EHEC O157:H7 を回収し、投与菌株と投与後に PFGE の RFLP パターンが変化した株を用いて PCR-RFLP で解析した。その結果、連続的に 3 頭の牛の糞便から回収され PFGE により 4 グループに分類された EHEC O157:H7 は、PCR-RFLP により同一パターンを示し、投与実験により牛の腸管を通過した後、PFGE による RFLP パターンが変化した菌株 (1-5 バンドの違い) においても、PCR-RFLP のパターンでは 1 株を除いて同一であった。PCR-RFLP のパターンが異なった株は、腸管通過の過程において Stx2 フェージが欠損したことが確認されており、Stx1 フェージ由来のバンドのみが増幅されたと結果と考えられた。以上の結果より、本 PCR-RFLP 法は、菌の腸管通過によるクローナルターンオーバーの影響を受けないことが明らかとなり、PFGE よりも優れた分子疫学的解析法であることが示唆された。

第3章 継代培養によって PFGE の RFLP パターンが変化した STEC に対する

PCR-RFLP の評価

第2章では、牛の腸管通過による *in vivo* でのクローナルターンオーバーの問題点について解析した。一方、実験室内での *in vitro* の条件下で菌株を継代する過程においても、PFGE による STEC の RFLP パターンが変化することが報告され問題となっている。本章では、本 PCR-RFLP 法がこの問題点を克服できるかを試みた。異なる STEC O157:H7 3 株を 37°C、3-4 日間隔で 25 週間、もしくは室温で 5 週間隔、25 週間継代培養し、10 回の継代ごとあるいは 5 週間ごとに 14 コロニーをランダムに選び、PCR-RFLP と PFGE の両方でそれぞれの RFLP パターンを解析した。その結果、3 菌株の STEC の PFGE による RFLP パターンは、菌の継代により大きく変化 (1-8 バンドの違い) したのに対し、PCR-RFLP ではパターンは全く変化しなかった。以上の結果より本 PCR-RFLP 法は継代培養による RFLP パターンの影響を受けないことが明らかとなり、PFGE よりも優れた分子疫学的解析法であると考えられた。

第4章 STEC 感染症が疑われた HUS 患者由来の下痢便を用いた PCR-RFLP による解析

患者検体や食品から菌を分離することが困難な場合があり、菌分離を絶対条件とする PFGE による解析には限界がある。一方、菌分離を行うことなく分子疫学的解析を行うことができれば、先の問題も解決し、さらにより迅速に結果を得ることもできる。そこで、本章では HUS 患者由来の下痢便を用いて、菌を分離することなく本 PCR-RFLP 法で分子疫学的解析を行うことが可能であるかを調べた。HUS 患者由来の下痢便からゲノム DNA を精製し、これを鋳型として本 PCR-RFLP 法で解析した。その結果 HUS 患者糞便から精製した DNA でも特異的な PCR 産物が得られ、その制限酵素消化により得られた RFLP パターンは、後に分離した STEC O157:H7 のそれと同一であった。また、結果を得るまでに要した時間は 16 時間と分離菌株を用いた場合の 4 日間と比べ大幅に短縮できた。以上の結果より、本 PCR-RFLP 法は菌を分離することなく、より迅速に正確に行える分子疫学的解析法であることが明らかとなった。

総括

本研究では、Stx フェージの多様性領域 region V を標的とした PCR-RFLP 法を開発し、PFGE の問題点を克服できるより簡便で迅速な STEC の分子疫学的解析法となりうることを示した。この方法の利点は

1. PFGE のような高価で特殊な装置を必要としない。
2. 一度に多数のサンプルを解析できる。
3. PFGE のように強いデオキシリボヌクレアーゼ活性をもつ菌株や泳動中に発生するラジカルにより起こる DNA の分解により解析不可能な場合でも適用できる。
4. 異なる 2 つの研究所で RFLP の比較を行う場合に、ゲノム DNA のみの郵送で済み、BSL2 に属する STEC 菌株自身を郵送する必要がなく、より迅速により安全に対応できる。
5. 牛腸管通過や継代培養によるクローナルターンオーバーの影響を受けない。

6. 菌分離が必要ない。

しかし、本PCR-RFLPの問題点として、

1. 菌株が異なる時期や異なる地理的に離れた場所から単離された場合に、PFGEよりも識別能が劣る。
2. プライマー結合部に変異があり、LA-PCRによって増幅産物を得ることができなければこの方法を用いることができない。

以上のことから、本PCR-RFLP法はより簡便、迅速な分子疫学的解析法であり、PFGEと組み合わせることにより、より高い精度でSTEC O157のクローナリティーを解析することができ、獣医学、医学領域でSTECの新たな分子疫学的手法として貢献できると考える。

審査結果の要旨

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) は、血性の下痢と激しい腹痛を主症状とする出血性大腸炎の原因となり、溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic uremic syndrome: HUS) や脳症などの、重篤な合併症を併発することが大きな問題となっている。1996年、大阪府堺市において患者数約8000名、死者3名という世界で類を見ないSTEC O157:H7による大規模集団食中毒事例が発生し大きな社会問題となった。以後、集団事例数は激減したが、毎年約3000名の感染者があり、発生件数そのものは減少していない。また、同一の感染源による食中毒が広域に散発的に発生する広域集団散発事例が新たな問題となってきている。流行株や感染源を早期に特定し、感染の拡大を防ぐことは、特に小児や高齢者で問題となるHUSや脳症のリスクを軽減する上に於いて極めて重要である。流行株や感染源の特定に、分子疫学解析法が大きな威力を発揮している。中でも、識別能力や再現性が高いPulsed-field gel electrophoresis (PFGE) が繁用されている。しかし、PFGEにもさまざまな問題点が指摘され、迅速、簡便かつより精度の高い解析法の開発が望まれている。

本研究では、志賀毒素ファージゲノム中に見いだした多様性領域、region Vを標的としたPCR-RFLP、すなわち、PCR産物を制限酵素で消化し、そのRestriction fragment length polymorphism (RFLP) を解析する方法を開発し、PFGEの様々な問題点を克服できるかを調べることを目的とした。

第1章では、Region Vを標的としたPCR-RFLPを開発し、204株のSTECを用いて本PCR-RFLP法の評価を行った。204株のうち202株についてタイピング可能であり、24タイプに分類することができた。しかも、地理的、時間的に一致して分離した株では、PFGEと高い相関性が得られただけでなく、PFGEよりもPCR-RFLPの方が高い識別能を示す例もあった。さらに、我が国で発生した4つの異なる集団事例時に分離されたSTECで、既にPFGEで単一株であると確認された菌を用いて本PCR-RFLPの評価を行った結果、それぞれにおいて単一株であることを示すことができた。

第2章では、クローナルターンオーバー、すなわち牛の腸管を通過するだけでPFGEのPFLPパターンが変化したSTEC株を用いて、本PCR-RFLPの評価を行ったところ、本PCR-RFLPはクローナルターンオーバーの影響を受けず、STECの分子疫学的解析に適用できることを示した。

第3章では、実験室内でSTECを植継ぐ際に、単一株であってもPFGEのPFLPパターンが変化する場合があります、そのような株においても、本PCR-RFLPは、菌株の受継ぎによるPCR-RFLPパターンが変化することなく、STECの分子疫学的解析が行えることを示した。

第4章では、PCR-RFLPによってHUS患者由来の下痢便から菌を分離することなくSTECの分子疫学的解析が可能であることを示した。さらに、得られたRFLPパターンは、後に同じ下痢便から分離したSTECと同一であり、菌の分離を必須としない分子疫学的解析が可能であることを示した。

以上の結果は、PCR-RFLPに基づくSTECの分子疫学的解析法はPFGEにも勝るとも劣らない解像度を有することやPFGEに存在する多くの問題点を克服できることを示している。すなわち、PCR-RFLPは、特殊な機器を必要とせず、短時間にしかも一度に多数の検体を解析でき、クローナルターンオーバーの影響も受けず、菌の分離も必須としないことからPFGEよりも応用性が高く、獣医学の分野のみならず医学領域においても多大な貢献をされると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。