

称号及び氏名	博士（獣医学）	杉本 典彦
学位授与の日付	平成23年3月31日	
論文名	志賀毒素産生性大腸菌 O157、O26 及び O111 に対する 簡便で迅速な分子疫学的解析法の開発	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	笹井 和美
	副査	三宅 眞実

## 論文要旨

### 緒言

志賀毒素産生性大腸菌（Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC）は、激しい腹痛と血便を主症状とする出血性大腸炎を引き起こし、さらに重篤化すると溶血性尿毒症症候群（Hemolytic uremic syndrome: HUS）や脳症を引き起こす。我が国では 1996 年の大阪府堺市における STEC O157:H7 による大規模集団食中毒事例が有名であるが、1996 年以後も、年間 3,000 名前後の感染者が発生している。また、集団事例は激減したものの同一の感染源による散発事例が異なる地域で発生する広域集団散発事例の発生が大きな問題となっている。近年、検出される STEC の O 群血清型のうち O157 は 6 割程度まで減少し、O26、O111 を含めた他の血清型の割合は増加傾向にあり、年間 500 例以上ある。それゆえ、O157 のみならず O26 や O111 を中心とした non-O157 の血清型を含めた STEC 感染症の対策が重要である。

STEC 感染症の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も極めて重要である。現在、感染源や感染経路の特定に用いられる分子疫学的解析法として、識別能力や再現性が高い Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) が繁用されている。しかしながら PFGE は様々な問題点が指摘され、簡便、迅速かつ精度の高い解析法の開発が望まれている。

STEC の主要な病原因子である志賀毒素（Shiga toxin: Stx）は、大きく 2 種類（Stx1 と Stx2）に分類され、両者共にラムダ様ファージ上にコードされている。我々の研究グループは *stx* ファージのゲノム上に 6 ケ所の特徴的な領域（Region I～VI）を見だし、*stx* 遺伝子上流に位置し、最

も多様性が存在する Region V を標的とした PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を開発し、STEC O157 の簡便かつ迅速な分子疫学的解析法として有用であることを報告した。しかしながら、特定の O157 株を用いて評価したものであり、様々な血清型を含み PFGE パターンの異なる株を用いた評価が重要である。そこで本研究では国立感染症研究所における PFGE 解析により、異なるクローンと同定された様々な血清型を含む STEC を用いて、既に開発した STEC の PCR-RFLP 法の評価を行い、O157 のみならず最近特に問題となっている O26 や O111 に対する STEC にも適応できるよう本 PCR-RFLP 法の改良を試みた。

## 第1章 *stx* ファージの Region V を標的とした PCR-RFLP 法の評価

我々が開発した Region V を標的とした PCR-RFLP 法を、国立感染症研究所から分与された PFGE パターンがすべて異なる O157 を含めた様々な O 群血清型の STEC 200 株 [O157: 100 株、O26: 50 株、O111: 10 株、その他の血清型 (O7、O8、O18、O28、O38、O41、O48、O63、O80、O81、O84、O91、O113、O115、O121、O128、O145、O153、O165、O169、O174、untypable): 40 株] を用いて評価した。

その結果、本 PCR で PCR 産物が得られた株数を血清型別で見ると、O157 で 100 株中 95 株 (95%)、O26 で 50 株中 48 株 (96%)、O111 で 10 株中 5 株 (50%)、他の血清型で 40 株中 19 株 (47.5%) であった。O157、O26 では PCR 産物が得られた割合は高かったものの、それ以外の血清型では約 50% とあまり高くなかった。また、PCR 産物の制限酵素消化物を電気泳動で解析した RFLP タイピングでは、O157 では 41、O26 では 8、O111 では 4、他の血清型では 17 タイプに分類された。

本 PCR による PCR の陽性率は O157 及び O26 では高かったものの、増幅領域は *stx* 遺伝子を含んでいないため、本 PCR 産物が *stx* プロファージ由来ではない可能性がある。そこで、これら増幅産物が *stx* プロファージ由来の特異的な産物かどうかを調べた。*stx* ファージの Region V を増幅できるフォワードプライマー (RV-F) と *stx1A* 及び *stx2A* 遺伝子内に結合できる 2 種類のリバースプライマー (Stx1-LA 及び Stx2-LA) を用いて PCR を行い、さらにリバースプライマーである RV-R の相補鎖に基づくフォワードプライマー (RV-RF) と Stx1-LA と Stx2-LA を用いて PCR を行った。両者の PCR 産物の有無及びサイズを調べ、得られた PCR 産物が *stx* プロファージ由来であるかどうかを検討した。その結果、O157 では *stx* プロファージ由来でない非特異な PCR 産物が 5 株で検出されたものの、PCR 産物が得られた 95 株全てで *stx* プロファージ由来の特異的な PCR 産物が得られた。O157 においては現 PCR プライマーでも比較的高い精度を有していたが、リバースプライマーとして Stx1-LA または Stx2-LA を用いることで、より高い精度で *stx* プロファージ由来の PCR 産物が得られた。一方、non-O157 では非特異な PCR 産物が、O26 で 48 株中 48 株 (100%)、O111 で 5 株中 3 株 (60%)、他の血清型では 19 株中 13 株 (68%) で検出され、non-O157 では本 PCR で必ずしも *stx* プロファージ由来の遺伝子断片を増幅しているわけではないことが分かった。さらに、O26 の *stx2* 及び O111 の *stx1* プロファージ由来の PCR 産物は全く検出されなかった。

このように、Region V に基づいた本 PCR-RFLP 法が STEC O157 株では簡便・迅速な DNA フィンガープリンティングに有用であったが、non-O157 では PCR の陽性率及び特異性に問題があることがわかった。

## 第2章 様々な *stx* ファージの Region V 上流領域の比較解析

Region V を標的とした既存のプライマーを用いた PCR において、O157 では *stx* プロファージ由来の特異的な PCR 産物が高い割合で得られたものの、O26 の *stx2* 及び O111 の *stx1* プロファージ由来の PCR 産物は全く得られなかった。そこで本章では、O26 由来の *stx2* ファージ O26 の全塩基配列を決定し、データベース上に登録されている O111 由来の *stx1* ファージ CP-1639 の塩基配列を基に、Region V 上流領域の塩基配列を比較解析した。さらに、フォワードプライマーの設計に適した保存性の高い領域を精査した。

*stx2* ファージ O26 の全塩基配列を解析した結果、78 個の ORF がコードされており、他の *stx* ファージ同様、ラムダ様ファージの構造をとっていた。この *stx2* ファージ O26 遺伝子と既に明らかとされている他の 22 種の *stx* ファージ遺伝子の塩基配列から RCR-RFLP のプライマーデザインに適した領域を比較解析したところ、*stx2* ファージ O26 の *stx2A* 遺伝子上流約 15 kb に位置する約 700 bp の塩基配列のみが保存されていることがわかった。この塩基配列は 23 種の *stx* ファージ中 18 種の *stx* ファージ遺伝子中で *stx1A* 及び *stx2A* 遺伝子上流 12~18 kb の位置に保存されており、ORF として exonuclease をコードする領域であった。しかしながら O111 由来の *stx1* ファージ CP-1639 では *stx2* ファージ O26 遺伝子と共通して保存されている領域は認められず、O26 の *stx2* ファージと O111 の *stx1* ファージに対する共通プライマーの設計は困難であると考えられた。

次に、CP-1639 ファージ遺伝子と他の *stx* ファージ遺伝子を比較解析したところ、CP-1639 ファージの *stx1A* 遺伝子上流約 11 kb に存在する hypothetical protein の一部 (ORF13) が、23 種の *stx* ファージ中 17 種の *stx* ファージ遺伝子で *stx1A* 及び *stx2A* 遺伝子上流 11~20 kb の領域で保存されていた。このように、全ての *stx* ファージ間で Region V を PCR で増幅できるプライマーの設計に適した共通領域を見い出すことができなかったが、既存プライマーである RV-F の結合領域以外に比較的保存されている領域が 2 か所 (exonuclease、ORF13) 存在した。これら保存領域からプライマーを設計し組み合わせることで、*stx* ファージ遺伝子の塩基配列情報が明らかとなっている 23 種類の *stx* ファージ中、計算上 20 種の *stx* ファージ (87%) で PCR 産物が得られると考えられた。

## 第3章 新規 PCR プライマーによる RCR-RFLP 法の評価

本章では、第 2 章で見出された *stx* ファージ間で保存されている領域からプライマーを新たに設計し、この新規 PCR プライマーを用いた PCR-RFLP 法の評価を行った。O26 の *stx1* プロファージ及び O111 の *stx2* プロファージについては、フォワードプライマーは RV-F、リバープライマーは *stx* プロファージに対する特異性を持たせるため第 1 章で設計した Stx1-LA 及び Stx2-LA を用いた。O26 の *stx2* プロファージのフォワードプライマーについては、exonuclease の ORF 内から O26-2F を設計した。O111 の *stx1* プロファージについては、ORF13 からフォワードプライマーとして O111-1F1 を設計した。また、O111-1F1 近傍には *IS629* があり O111-1F1 結合領域の欠損等が考えられたため、さらに、O111-1F1 上流約 3.0 kb に位置する ORF から異なるフォワードプライマーとして O111-1F2 も設計した。

これら新たに設計したプライマーによる PCR-RFLP 法を、第 1 章で用いた O26、50 株、O111、

10株を用いて評価した。その結果、PCR産物が得られた株数は、O26で50株中47株(94%) [Stx1陽性株50株中47株(94%)、Stx2陽性株2株中2株(100%) ]、O111で10株中10株(100%) [Stx1陽性株10株中10株(100%)、Stx2陽性株4株中4株(100%) ]であった。既存のRegion VプライマーではO26 *stx2*プロフェージ及びO111 *stx1*プロフェージ由来のPCR産物は得られなかったが、新規プライマーセットではO26 Stx2陽性株及びO111 Stx1陽性株全てにおいてPCR産物が得られた。これらPCR産物を *Bgl*I 或いは *Eco*RVによるRFLP解析を行ったところ、O26では *stx1*プロフェージ由来のPCR産物は5タイプ、*stx2*プロフェージ由来のPCR産物は2タイプに分類され、これらを組み合わせることで7タイプに分類された。同様に、O111では *stx1*プロフェージ由来のPCR産物は6タイプ、*stx2*プロフェージ由来のPCR産物は3タイプに分類され、これらを組み合わせることで7タイプに分類された。これらの結果から、O26とO111に関しては新たに設計したプライマーを用いたPCR-RFLPを行うことで、STEC O26及びO111のDNAフィンガープリンティングが簡便・迅速に行うことができた。

## 総括

1. 既存のRegion Vを増幅できるプライマーを用いてのPCR-RFLP法はSTEC O157では簡便・迅速なDNAフィンガープリンティング法としてある程度有用性があることが確認できたが、non-O157では陽性率及び特異性に問題があった。
2. *stx*ファージゲノム中で、*stx1A*及び*stx2A*遺伝子上流11~20 kbの領域内において、既存プライマーであるRV-Fの結合領域以外に、比較的保存されている領域を2か所(exonuclease及びORF13)見いだした。
3. 新規PCRプライマーを用いたRegion Vに基づくPCR-RFLP法では、O157のみならず、O26及びO111でも簡便・迅速なDNAフィンガープリンティング法として有用であった。

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、O26及びO111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、激しい腹痛と血便を主症状とする出血性大腸炎を引き起こす。患者は重篤化すると溶血性尿毒症症候群(Hemolytic uremic syndrome: HUS)や脳症を併発し死に至る場合もある。1996年、大阪府堺市において世界で類を見ない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。以後本菌による孤発集団事例は激減したものの、同一の感染源

による食中毒が広域かつ散発的に発生する広域集団散発事例が大きな問題となっている。

STEC 感染症の発生及び拡大を防ぐためには、感染源や感染経路を早期に特定し、適切な対策を講じることが極めて重要である。現在、感染源や感染経路の特定に用いられる分子疫学的解析法としてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法がゴールドスタンダードとして用いられている。しかしながら PFGE にもいくつかの問題点があり、これを克服した解析法の開発が求められていた。我々の研究グループは、志賀毒素 (Stx) フェージのゲノム中の多様性領域である Region V を標的とした PCR-RFLP 法を開発し、STEC O157 の簡便かつ迅速な分子疫学的解析法として報告した。しかしながら、多様な STEC 株を用いた評価を行うこと、また、近年、増加傾向にある O26 や O111 にも適用可能であるかを検討することが重要課題であった。

本研究では、国立感染症研究所における PFGE 解析により、異なるクローンと同定された様々な血清型の STEC を用いて、本 PCR-RFLP 法の評価を行い、さらに STEC O157 のみならず O26 や O111 にも適用できるように本 PCR-RFLP 法の改良を試みた。以下はそれらの結果の概要である。

第1章では、我が国の 42 都道府県で分離され異なるクローンと同定された O157 100 株、O26 50 株、O111 10 株、non-O26/O111/O157 40 株を用いて本 PCR-RFLP の評価を行った。その結果、O157 では 95 株で PCR 産物が得られ 41 タイプに型別されたが、O26、O111、non-O26/O111/O157 ではそれぞれ 48 株、5 株、19 株から PCR 産物が得られ、8、4、17 タイプに型別された。以上の結果より、Region V の上流と下流に結合できる RV-F と RV-R プライマーを用いた現 PCR-RFLP 法は O157 に対してはある程度の解像度を有する、その他の O 群血清型に対しては PCR の陽性率、特異性や解像度に問題があり、PCR プライマーの再設計が必要であることが明らかになった。

第2章では、第1章の結果に基づき、non-O157 の STEC を対象とした新たな PCR プライマーを設計することを目的として、STEC O26 から Stx2 フェージを単離し全ゲノム配列を決定した。また、GeneBank に登録されている遺伝子情報から Stx1 及び Stx2 フェージのゲノム配列、特に Region V の配列を入手し、比較解析を行った。その結果、Stx2 フェージでは exonuclease、Stx1 フェージでは hypothetical protein の1つである ORF13 が比較的保存されており、これらの領域から Region V の上流に結合する新規プライマーが設計できることを見いだした。

第3章では、O157 に次いで重要な O 群血清型である O26 と O111 に適用できる新規 PCR プライマーを設計し、第1章で用いた O26 50 株と O111 10 株を用いて再評価を行った。その際、*stx1A* 遺伝子に結合する Stx1-LA プライマーと *stx2A* 遺伝子に結合する Stx2-LA プライマーを新規 PCR プライマーと組み合わせた。その結果、O26 の 47 株と O111 の 10 株で PCR 産物が得られ、O26、O111 とも 7 タイプに型別された。このプライマーの組み合わせで得られた結果は Stx フェージに特異的であり、O26 ではやや解像度が劣るものの、特異性、簡便性、迅速性を考慮すれば、本 PCR-RFLP 法は O26 や O111 に対しても適用できる分子疫学的解析法であると考えられた。

以上の結果は、既に開発した PCR-RFLP 法が O157 に対して適用可能な簡便で迅速な分子疫学的解析法であることを示すと同時に、Stx フェージの Region V の塩基配列の比較から新たに設計した PCR プライマーを用いることにより、O26 や O111 に対しても Region V を標的とした PCR-RFLP 法が適用可能

であることを示した。本 PCR-RFLP 法は PFGE より解像度が若干低下するが、簡便性、迅速性で優れた DNA フィンガープリンティング法であり、PFGE を組み合わせることにより、STEC O157、O26 や O111 などの分子疫学的解析に大きく貢献することが期待できる。これらの研究成果は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。