

平成21年 5月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590455
 研究課題名（和文） PCR-RFLP 法による簡便・迅速な腸管出血性大腸菌の分子疫学的比較解析法の開発研究
 研究課題名（英文） Development of a simple and rapid PCR-RFLP for molecular epidemiologic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli*
 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
 70221653

研究成果の概要：

腸管出血性大腸菌に対する簡便・迅速な PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を国立感染症研究所において PFGE で異なるクローンとして型別された EHEC O157、O26、O111 及びその他の血清型を用いて評価した。その結果、O157 に対してはほぼ満足の得る結果が得られたが、その他の血清型では特異性に問題があり、新たなプライマーの設計が必要であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：疫学

1. 研究開始当初の背景

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は、特殊な機器と熟練を要するなどのデメリットもある。しかも一度に多検体を処理できないことから、堺市で発生したような集団事例が発生した場合感染源や感染経路の特定に迅速性が欠けるなどの問題もある。それゆえ、PFGE に代わるより簡便で迅速な分子疫学的解析法の開発が望まれていた。我々は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の志賀毒素 (Stx) フェージのゲノムを解析し、既に明らかとな

っていた Stx フェージゲノムの全塩基配列と比較し解析した。その結果、*stx* 遺伝子の upstream に最も多様性のある領域 (領域 V) を見いだし、この領域 V を PCR で増幅して制限酵素で切断し、切断断片の多系を比較するという PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を開発した (Shima et al., J. Clin. Microbiol., 42:5205-5213, 2004)。この PCR-RFLP 法は簡便で迅速に EHEC の分子疫学的解析が行えるだけでなく、EHEC の *in vivo* や *in vitro* におけるクローナルターンオーバーによる

PFGE パターンの変化に対しても影響を受けないという利点を有していた (Shima et al., FEMS Microbiol. Lett., 257: 124-131, 2006. Shima et al., J. Clin. Microbiol., 44: 3963-3968, 2006)。しかしながら、本 PCR-RFLP 法の評価は当研究室で保管していた限られた EHEC O157 と non-O157 の EHEC 株を用いたものであり、O157 では 204 株中 202 株で PCR 産物が得られ、24 タイプに分類できたが、non-O157 では、50 株について調べ PCR 産物が得られた割合は、約 50% 程度と低かった。そこで、本 PCR-RFLP 法を実際の現場で用いる為には、系統だった EHEC 株を用いて評価する必要があると考え、本実験を着手した。

2. 研究の目的

本研究では、国立感染症研究所 (感染研) との共同で、感染研における PFGE 解析で異なるクローンとして同定された EHEC 株を用いて、本 PCR-RFLP 法の評価を行うことを目的とした。また、さらなる塩基配列の解析及びデータベースにおける Stx フェージの塩基配列の情報を基に、新たな PCR-RFLP 法のプライマーを設計し、血清型にとらわれずより精度の高い PCR-RFLP 法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

感染研で PFGE により異なるクローンと型別された O157、100 株 (Stx1 単独陽性株、5 株、Stx2 単独陽性株、46 株、Stx1/Stx2 両陽性株、49 株)、O26、50 株 (Stx1 単独陽性株、48 株、Stx1/Stx2 両陽性株、2 株)、O111、10 株 (Stx1 単独陽性株、6 株、Stx1/Stx2 両陽性株、4 株)、それ以外の血清型 40 株 (Stx1 単独陽性株、20 株、Stx2 単独陽性株、14 株、Stx1/Stx2 両陽性株、6 株) について、既に報告したプロトコール (Shima et al., J. Clin. Microbiol., 42: 5205-5213, 2004) に従い、PCR-RFLP 法による解析を行った。得られた PCR 産物の特異性を確認するため、図 1 に示したように領域 V の下流の PCR プライマー (RV-R) と相補的な PCR プライマー (RV-RF) を設計し、Stx1A あるいは Stx2A と結合できる PCR プライマー (Stx1A-R 又は Stx2-R) を用いた PCR を行った。特異的な PCR 産物が得られなかった場合は、既に報告されている Stx フェージの領域 V に相当する領域から新たな PCR プライマーを設計し、PCR を行った。また、得られた PCR 産物の塩基配列を解析し、あるいは得られた塩基配列を基にさらに上流の塩基配列をゲノムウォーキング法により解析した。得られた塩基配列とデータベ

ースに登録されている Stx フェージのゲノム配列から PCR-RFLP 法の新たな PCR プライマーを設計した。この新たな PCR プライマーと感染研での分離株を用いて、再度評価した。

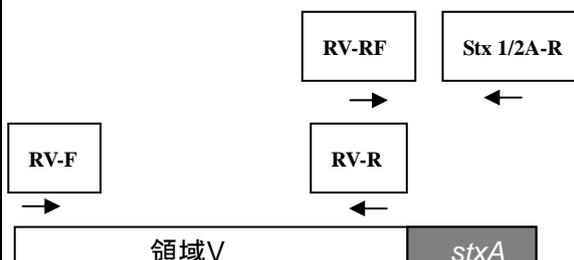


図 1. PCR-RFLP 及び特異性を調べるためのプライマー結合領域

RV-F と RV-R は PCR-RFLP 用に領域 V を増幅するためのもの。RV-RF と Stx1A 又は Stx2A は、PCR 産物の特異性を確認するための PCR プライマー

4. 研究成果

感染研で PFGE により型別された O157、100 株、O26、50 株、O111、10 株及びそれ以外の血清型の EHEC40 株について、まず領域 V を増幅するための PCR を行った。その結果、O157 では 100 検体中 95 検体で、O26 では、50 検体中 48 検体で、O111 では 10 検体中 5 検体で、それ以外の血清型では 40 検体中 19 検体で PCR 産物が得られた (表 1)。得られた PCR 産物の特異性を確認するために、図 1 に示したように領域 V を増幅する時に用いた下流の PCR プライマーの相補的な配列、すなわち、逆向きに結合するプライマーを上流の PCR プライマー (RV-RF) として設計し、下流の PCR プライマーを stx1A あるいは stx2A 遺伝子と結合できるもの (Stx1A-R 又は Stx2A-R) とし、これらのプライマーセットを用いた PCR を行った。その結果、O157 では、95 検体 (stx1 は 53 検体中 48 検体で、stx2 は 90 検体中 88 検体: 両陽性検体 41 を含む) で得られた PCR 産物は特異的であることが確認できた。しなしながら 5 つの stx1 フェージと 2 つの stx2 フェージで増幅産物が得られず、3 検体で非特異的な増幅が見られた。

O26 について同様に調べたところ、48 検体中 47 検体 (stx1 は 47 検体中 47 検体で、stx2 は 2 検体中 0 検体で) で、得られた PCR 産物の特異性が確認できたが、全てが stx1 由来であり、stx2 では特異的な増幅産物は得られなかった。また、48 検体全てで非特異的な増幅産物が見られた。O111 に関しては、22 検体中 4 検体 (stx1 は 0/4、stx2 は 4/4) で、

PCR 産物の特異性が確認できたが全てが stx2 由来であり stx1 では特異的な増幅産物は得られなかった。また非特異的な増幅産物も 3 検体でみられた。

O157/O26/O111 以外の血清型の EHEC では、19 検体中 10 検体 (Stx1 は 12 検体中 9 検体で、Stx2 は 8 検体中 1 検体で) で PCR 産物の特異性が確認できたが、11 検体で非特異的な増幅産物も得られた。

O111 の stx1 フェージに対して特異的な増幅産物が全く得られなかつたことから、データベースに登録されている stx1 フェージの塩基配列を基に、新たな 2 種類 (ARF-1, ARF-2) の PCR プライマーを設計し、O111 の stx1 フェージについて PCR を行った。その結果、ARF-1 で 6 検体、ARF-2 で残りの 4 検体で特異的な PCR 産物が得られ、非特異的な増幅産物は得られなかった。さらに ARF-1 と stx1A に結合できるプライマーを用いて O26、O157/O26/O111 以外の EHEC を用いて PCR を行ったところ、PCR 産物は全く得られず本 PCR は、O111 に特異的であることがわかった。一方、ARF-2 と stx1A に結合できるプライマーを用いた場合には、O111 以外にも O26 等の血清型で特異的な PCR 産物が得られた。

また領域 V を標的とした PCR で得られた PCR 産物を制限酵素消化したところ、O157 が 49 タイプに、O26 は 8 タイプに、O111 は 4 タイプに、O157/O26/O111 以外は 17 タイプに型別された。O157 については、PFGE と比べて解像度はやや落ちるものの、PFGE 法を補完する方法としては簡便・迅速性から有益であると考えられた。O111 に対するプライマーを再設計した実験結果から、EHEC に存在する Stx フェージの領域 V の構造は、ある程度血清型と相関性がある結果が得られた。今後、各種血清型の Stx フェージのゲノム構造の解析、特に領域 V の解析を進めることで、血清型にとらわれず全ての EHEC に適用可能な PCR-RFLP 法の構築に向けて取り組んで行く予定である。

表 1. 腸管出血性大腸菌の血清型別の PCR-RFLP 陽性率と型別数

血清型	株数	PCR-RFLP 陽性数 (型別数)	陽性率 (%)
O157	100	95 (49)	95
O26	50	48 (8)	96
O111	10	5 (4)	50
その他	40	19 (17)	48
合計	200	167	84

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 4 件)

K. Shima, N. Kawamura, A. Hinenoya, M. Asakura, Y. Wu, K. Nishimura, G.B. Nair, and S. Yamasaki. Rapid culture-free identification and molecular typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR-RFLP. *Microbiol. Immunol.*, 52: 310-313, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 田口 堯、W. Samosornsuk、呉 育羅、日根野谷 淳、西村和彦、山崎伸二：牛舎内の牛からの志賀毒素産生性大腸菌の分離と分離菌の分子疫学的解析、第 145 日本獣医学会学術集会 2008 年 3 月 28 日、相模原

2. 杉本典彦、寺嶋 淳、嶋 謙介、呉 育羅、日根野谷 淳、朝倉昌博、渡邊治雄、山崎伸二：我が国で分離した様々な血清型の腸管出血性大腸菌を用いた志賀毒素フェージを標的とした PCR-RFLP 法の評価、第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月 7 日、東京

3. 田口 堯、W. Samosornsuk、呉 育羅、日根野谷 淳、西村和彦、山崎伸二：牛群内における志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査、第 60 回日本細菌学会関西支部総会、2007 年 11 月 10 日、大阪

4. 日根野谷 淳、田口 堯、W. Samosornsuk、呉 育羅、朝倉昌博、西村和彦、山崎伸二：牛が保有する志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査。第 11 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2007 年 8 月 23 日、安曇野、長野

[図書] (計 1 件)

山崎伸二、みずく舎/医学評論社、腸管出血性大腸菌、バイオセーフティの事典-病原微生物とハザード対策の実際、2008 年、224-226.

[その他] 講演

1. 山崎伸二：腸管出血性大腸菌感染症研究の最近の動向、平成 19 年度大阪市食肉・食鳥肉衛生技術研修会、2007 年 8 月 3 日、大阪。

2. S. Yamasaki: Molecular typing for EHEC O157 and *Campylobacter*. September 17th, 2007. Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, 広州、中国.

3. 山崎伸二：食中毒細菌の簡便、迅速な分子疫学的解析法と菌種同定法、O157 とカンピロバクターを中心に、第 34 回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会、2007 年 11 月 2 日、和歌山

4. S. Yamasaki: Can genetic diversity in the regulatory region of Shiga toxin-phage be a better tool for molecular typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 than PFGE? October 3, 2008. 動物衛生研究所、つくば.

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
7 0 2 2 1 6 5 3

(3) 連携研究者

渡邊 治雄 (WATANABE HARUO)
国立感染症研究所 副所長
7 0 1 4 2 1 3 0

寺嶋 淳 (TERAJIMA JUN)
国立感染症研究所 第一細菌部 室長
7 0 2 0 2 1 9 0