

マルチプレックスリアルタイム PCR 法を用いた 下痢原性大腸菌迅速同定検査法の開発

矢儀田優佳 氏家絢子 浅野由紀子 青木紀子 阪東成純 四宮博人

Key Words : Diarrheagenic *Escherichia coli* ,
multiplex real-time PCR , Melting curve analysis

例年、国内で下痢原性大腸菌を起因菌とする健康危機事例が数多く報告されている。従来、当所では下痢原性大腸菌病原因子の検出には、10 病原因子を対象としたマルチプレックスコンベンショナル PCR 法を実施してきたが、2020 年度に、迅速かつ簡便な検査法の確立を目的として、10 病原因子遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2f*, *eae*, *estA1*, *estA2*, *elt*, *invE*, *aggR*, *afaD*) について一斉検出可能なマルチプレックスリアルタイム PCR (MR-PCR) 法を開発した。しかし、*stx2f* の解析結果がやや不明瞭であったこと、さらに大規模食中毒事例の原因となる EAST1EC の病原因子 (*astA*) を対象に含めていなかったことから、今回、11 病原因子遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2f*, *eae*, *estA1*, *estA2*, *elt*, *invE*, *aggR*, *afaD*, *astA*) を 4 反応液で一斉検出可能な MR-PCR 法を開発した。

当該法を用いて臨床株 120 株を解析したところ、下痢原性大腸菌 21 株 (17.5%) を検出し、さらにこれまで検出できなかった DAEC 5 株 (4.2%) を新たに検出できた。今後、感染症発生動向調査事業や健康危機事例発生時に当該法を活用していく予定である。

はじめに

ヒトや動物に胃腸炎を引き起こす大腸菌は下痢原性大腸菌と総称とされる。作用機序により大きく 6 分類¹⁾され、腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (*E. coli*) (EHEC)、腸管病原性大腸菌 enteropathogenic *E. coli* (EPEC)、腸管毒素原性大腸菌 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)、腸管侵入性大腸菌 enteroinvasive *E. coli* (EIEC)、腸管凝集付着性大腸菌 enteroaggregative *E. coli* (EA_gEC) 及び、その他の下痢原性大腸菌として、分散付着性大腸菌 diffusely adherent *E. coli* (DAEC) や腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素遺伝子保有大腸菌 EA_gEC heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli* (EAST1EC) 等がある (表 1)。

従来から、下痢原性大腸菌の判定は O 群血清型

別試験により実施されていたが、血清型と病原性とは必ずしも相関を示すとは限らないことから、2012 年に衛生微生物技術協議会等により、病原性の保有の有無による分類に改定¹⁾された。当所における病原因子の検出は、マルチプレックスコンベンショナル PCR 法 (multiplex conventional PCR 法: MC-PCR 法) を用いていたが、2020 年度に、迅速かつ簡便な検査法の確立を目的として、リアルタイム PCR 装置を活用した 10 病原因子遺伝子

表 1 下痢原性大腸菌の分類

分類	病原因子
腸管出血性大腸菌	VT (<i>stx1</i> , <i>stx2</i>), LEE (<i>eae</i>)
腸管病原性大腸菌	LEE (<i>eae</i>), <i>bfpA</i>
腸管毒素原性大腸菌	ST (<i>estA1</i> , <i>estA2</i>), LT (<i>elt</i>)
腸管侵入性大腸菌	<i>invE</i>
腸管凝集付着性大腸菌	<i>aggR</i> , <i>astA</i> , CVD432
その他の下痢原性大腸菌	<i>astA</i> , <i>afaD</i> , <i>cdt</i> , <i>cnf</i> 等

(*stx1*, *stx2*, *stx2f*, *eae*, *estA1*, *estA2*, *elt*, *invE*, *aggR*, *afaD*) について一斉検出可能なマルチプレックスリアルタイム PCR 法 (multiplex real-time PCR 法: MR-PCR 法) を開発した。しかし, *stx2f* 領域の解析結果が不明瞭であること, 近年大規模健康危機事例の起因病原体である EAST1EC の病原因子 (*astA*) が対象に含まれていなかったことから, 今回, 11 病原因子遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2f*, *eae*, *estA1*, *estA2*, *elt*, *invE*, *aggR*, *afaD*, *astA*) について一斉検出可能な改良 MR-PCR 法を検討したので報告する。

材料と方法

1 使用菌株

(1) 病原因子保有標準菌株

国立感染症研究所から分与を受けた EHEC NIID 1303 (*stx1*, *stx2*, *eae*), NIID 1733 (*stx2f*, *eae*, *astA*), EPEC NIID 1923 (*eae*), ETEC NIID 1290 (*elt*, *estA2*, *astA*), NIID 1297 (*estA1*, *astA*), EIEC NIID 1298 (*invE*), EAaggEC NIID 2279 (*aggR*, *astA*) 及び DAEC NIID 1782 (*afaD*) の計 8 株の標準菌株を使用した (表 2)。

(2) 臨床由来株

平成 8~21 年の間に愛媛県感染症発生動向調査事業及び行政検査として搬入された糞便等から分離され, 病原大腸菌免疫血清 (デンカ株) により O 血清型別が確定した大腸菌の中から無作為に選んだ 120 株を使用した。

(3) 鋳型 DNA 及び陽性コントロール DNA 調整

非選択培地で純培養後の数コロニーを, 1 M-

表 2 標準菌株及び保有病原因子

大腸菌	菌株番号	保有病原因子
EHEC	NIID1303	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i>
	NIID1733	<i>stx2f</i> , <i>eae</i> , <i>astA</i>
EPEC	NIID1923	<i>eae</i>
ETEC	NIID1290	<i>elt</i> , <i>estA2</i> , <i>astA</i>
	NIID1297	<i>estA1</i> , <i>astA</i>
EIEC	NIID1298	<i>invE</i>
EAaggEC	NIID2279	<i>aggR</i> , <i>astA</i>
DAEC	NIID1782	<i>afaD</i>

表 3 本研究に用いたプライマー一覧

PCR	大腸菌	group	Target	Primer-F	Primer-R	sequence (5'-3')	size(bp)	Tm(°C)	Tm distance(°C)	reference	
改良MR-PCR	EHEC	A	<i>estA1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.5±0.25	1.2	2)	
	EHEC		<i>estA2</i>	ST1b-s	ST1b-as	TTT ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT TT	179	78.7±0.19	1.6	2)	
	EHEC		<i>stx2f</i>	stx2fK_A1	stx2fK_A1	CAA AAG AGC TAT GTT GAT TC	296	80.3±0.19	1.4	2)	
	改良MR-PCR	EHEC	B	<i>stx1</i>	mMK1-1	mMK1-2	GAA TTT ACC TTA GAC TTC TCG AC	234	81.7±0.30	2.9	2)
		EIEC		<i>invE</i>	I-1	I-51	ATA TCT GTA TTT CCA ATC GGG T	379	78.2±0.20	2.1	2)
		EHEC		<i>elt</i>	LT-11	LT-2	CCC ACC GGA TCA CCA	123	81.1±0.21	2.1	2)
		EHEC		<i>stx2</i>	mMK2-1	mMK2-2	GAG TTT AGG ATA GAC TTT TCG AC	254	83.2±0.19	1.8	2)
	EAaggEC, EIEC	C	<i>aggR</i>	aggRk-S4	aggRk-A4	CGG ATA CAT TAA GAC GCCTA	254	79.4±0.23	8.8	2)	
			<i>eae</i>	mSK1	eaeKas-a	CCG GCA CAA GCA TAA GC	310	81.2±0.24	8.8	2)	
	DAEC	D	<i>afaD</i>	afaDks1	afaDkas1	GGG AGT ATA AGG AAG ATG ATG C	207	90.0±0.22	1.3	2)	
	EAST1EC		<i>astA</i>	EASTOS1	EASTOAS2	GCC ATC AAC ACA GTA TAT CCG	109	85.5±0.57	4.2	2)	
改良MR-PCR	EHEC	A'	<i>estA1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.4±0.30	2.9	2)	
	EHEC		<i>estA2</i>	ST1b-s	ST1b-as	TTT ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT TT	179	78.7±0.22	4.2	2)	
	EHEC		<i>stx1</i>	mMK1-1	mMK1-2	GAA TTT ACC TTA GAC TTC TCG AC	234	81.6±0.37	1.3	2)	
	EHEC		<i>stx2f</i>	vix2f_F1	vix2f_R1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424	85.8±0.38	2.9	3)	
改良MR-PCR グループBと同じ 改良MR-PCR グループCと同じ	EHEC, EPEC	B	<i>stx1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.4±0.30	1.3	2)	
			<i>stx2f</i>	vix2f_F1	vix2f_R1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424	85.8±0.38	2.9	3)	
	EHEC, EPEC	C	<i>stx1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.4±0.30	1.3	2)	
			<i>stx2f</i>	vix2f_F1	vix2f_R1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424	85.8±0.38	2.9	3)	
	EHEC, EPEC	1	<i>stx1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.4±0.30	1.3	2)	
			<i>stx2f</i>	vix2f_F1	vix2f_R1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424	85.8±0.38	2.9	3)	
	EHEC, EPEC	2	<i>stx1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.4±0.30	1.3	2)	
			<i>stx2f</i>	vix2f_F1	vix2f_R1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424	85.8±0.38	2.9	3)	
	EHEC, EPEC	Takara Bio, Inc.	<i>stx1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.4±0.30	1.3	2)	
			<i>stx2f</i>	vix2f_F1	vix2f_R1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424	85.8±0.38	2.9	3)	
	EHEC, EPEC	Takara Bio, Inc.	<i>stx1</i>	ST1a-s	ST1a-as	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	179	77.4±0.30	1.3	2)	
<i>stx2f</i>			vix2f_F1	vix2f_R1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	424	85.8±0.38	2.9	3)		

* The primer set was purchased from Takara Bio, Inc.

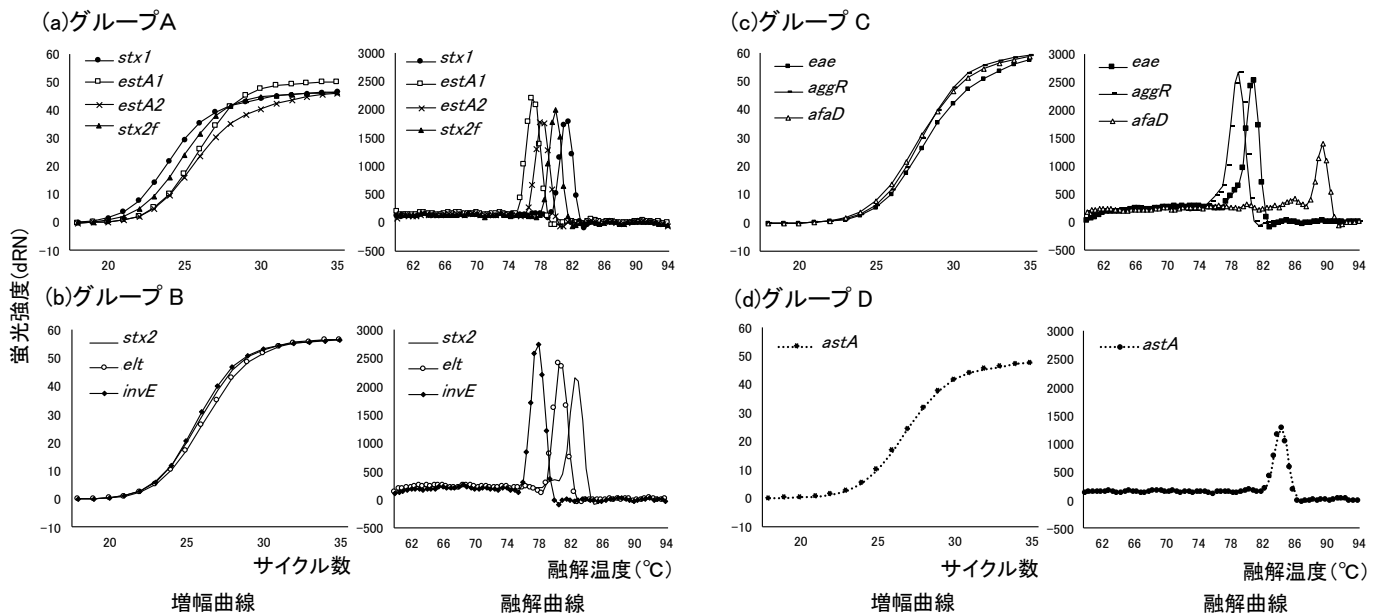


図1 陽性コントロールでの MR-PCR 法による増幅曲線及び融解曲線

NaOH 溶液 85 μL に懸濁し, 100°C, 10 分間加熱後, 1 M-Tris 塩酸緩衝液 15 μL を添加して中和し, 12000 rpm, 10 分間遠心分離した上清を鋳型 DNA とした。

陽性コントロール DNA として, 標準菌株の各病原因子遺伝子についてリアルタイム PCR をそれぞれ実施し, 閾値を超えたサイクル数 (threshold cycle:Ct 値) が 21 程度となるように, TE 緩衝液で希釈したものを用いた。

2 方法

(1) 改良 MR-PCR 法

本研究で用いたプライマーを表 3 に示した。全てのプライマーを A~D の 4 グループに分け, グループごとに 2~8 種類のプライマーを, それぞれ終濃度 10 μM となるように混合してプレミックスプライマーを調整した。リアルタイム PCR 装置は Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (タカラバイオ株) を使用し, PCR 反応液は TB Green Premix Ex Taq (タカラバイオ株) 10 μL , プレミックスプライマー (10 μM) 0.8 μL , 鋳型 DNA 1 μL , 滅菌蒸留水 8.2 μL の全量 20 μL とした。PCR 反応は, 95°C 30 秒後, 95°C 5 秒, 55°C 30 秒を 35 サイクルとし, 95°C 15 秒, 60°C 1 分, 95°C 15 秒 (ランプ速度 4.0°C/秒) で融解曲線分析を行った。

(2) 旧 MR-PCR 法

表 3 に示すように, グループ A' の *stx2f* を 424 bp の増幅産物を得る領域とし, その他の *estA1*, *estA2*, *stx1* 及びグループ B, C は改良 MR-PCR 法と同一のものを使用した。また, プレミックスプライマーの調整, リアルタイム PCR 装置, 反応条件等は改良 MR-PCR 法と同じとした。

(3) MC-PCR 法

表 3 に示すように, *LT*, *ipaH*, *stx* (*stx1* and/or *stx2*) と, *astA*, EAF, *esth*, *bfpA*, *aggR*, *invE*, *eaeA* の 2 グループに分けた。PCR 反応液は, 10 μL 中に 1 \times Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus), 0.2 mM dNTP, プライマー, TaKaRa Ex Taq 0.25 U, 鋳型 DNA 1 μL を含むように調整した。プライマーの終濃度は, *ipaH*, *astA*, *aggR*, *invE* は 0.15 μM , *LT*, *stx*, *esth*, *bfpA*, *eaeA* は 0.25 μM , EAF は 0.75 μM とした。PCR 装置は, S1000 (バイオラッド株) もしくは T100 (バイオラッド株) を使用した。PCR 反応条件は, 94°C 3 分反応後, 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 50 秒を 32 サイクルとし, 72°C 4 分の伸長反応を行った。PCR 増幅産物は 2.5% アガロースゲルを使用して電気泳動を行い, バンドサイズを確認した。

結果

(1) 改良リアルタイム PCR 法による各病原因子遺伝子の増幅及び融解曲線分析

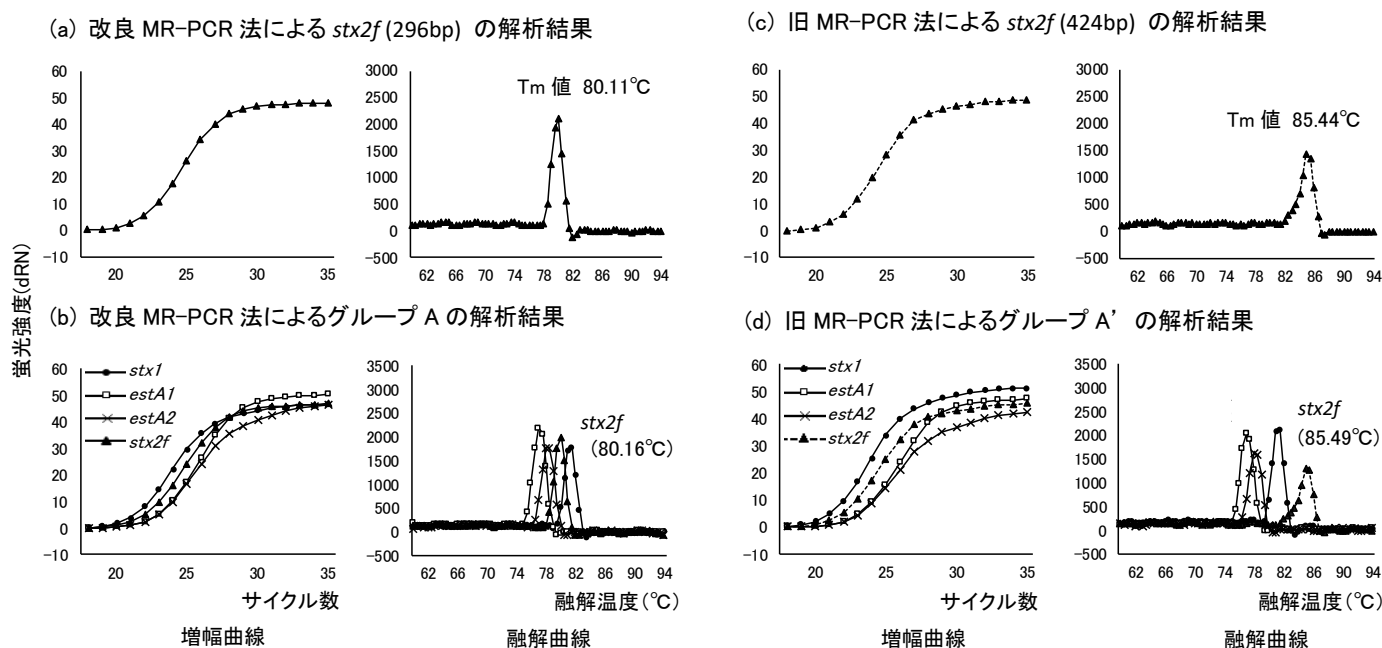


図 2 標的領域の異なる *stx2f* のプライマーを用いた標準菌株の解析結果

陽性コントロール DNA を使用し、*stx1*、*stx2*、*stx2f*、*eae*、*estA1*、*estA2*、*elt*、*invE*、*aggR*、*afaD*、*astA* の 11 病原因子遺伝子について、リアルタイム PCR による遺伝子増幅及び融解曲線分析を実施した。その結果、全ての領域で明瞭な遺伝子増幅が確認された。また、それぞれの融解温度 (melting - temperature: Tm 値) は、*stx1* $81.7 \pm 0.30^\circ\text{C}$ 、*stx2* $83.2 \pm 0.19^\circ\text{C}$ 、*stx2f* $80.3 \pm 0.19^\circ\text{C}$ 、*eae* $81.2 \pm 0.24^\circ\text{C}$ 、*estA1* $77.5 \pm 0.25^\circ\text{C}$ 、*estA2* $78.7 \pm 0.19^\circ\text{C}$ 、*elt* $81.1 \pm 0.21^\circ\text{C}$ 、*invE* $78.2 \pm 0.20^\circ\text{C}$ 、*aggR* $79.4 \pm 0.23^\circ\text{C}$ 、*afaD* $90.0 \pm 0.22^\circ\text{C}$ 、*astA* $85.5 \pm 0.57^\circ\text{C}$ であった (表 3)。

(2) 改良 MR-PCR 法による増幅及び融解曲線分析

各領域の Tm 値の差が 2°C 程度となるように標的病原因子をグループ A (*stx1*、*stx2f*、*estA1*、*estA2*)、グループ B (*stx2*、*elt*、*invE*)、グループ C (*eae*、*aggR*、*afaD*)、グループ D (*astA*) の 4 本の反応チューブに分け、MR-PCR 法を実施した。その結果、全ての病原因子遺伝子の遺伝子増幅が確認された (図 1)。

融解曲線分析の結果、各グループの領域ごとの Tm 差は、グループ A は $1.2 \sim 1.6^\circ\text{C}$ 、グループ B は 2.1 と 2.9°C 、グループ C は 1.8°C と 8.8°C であ

った。

(3) 旧 MR-PCR 法及び新 MR-PCR 法の比較

改良 MR-PCR 法及び旧 MR-PCR 法の *stx2f* 領域の融解曲線分析の結果を図 2 (a)、(c) に示した。

改良 MR-PCR 法の *stx2f* (296bp) は、Tm 値 80.11°C にシャープなピークを示し、旧 MR-PCR 法の *stx2f* (424bp) では Tm 値 85.44°C にややブロードなピークを示した。さらに、改良 MR-PCR 法のグループ A (図 2 (b)) 及び旧 MR-PCR 法のグループ A' (図 2 (d)) の融解曲線分析を行った結果、*stx2f* と Tm 値が隣接する各領域の Tm 値差は、改良 MR-PCR 法は *estA2* と 1.6°C 、*stx1* と 1.4°C であった。旧 MR-PCR 法では、*stx1* と 4.2°C であった。

(4) 標準菌株を用いた改良 MR-PCR 法の解析結果

標準菌株 8 株を用いて改良 MR-PCR 法を実施した結果を図 3 に示した。図 3 (a) は *stx1*、*stx2*、*eae* 保有 EHEC 株の解析結果である。A~C の 3 グループの反応チューブの増幅曲線で遺伝子増幅が確認され、グループ D の反応チューブでは遺伝子増幅は確認されなかった。融解曲線分析の結果、グループ A の Tm 値は 81.40°C 、グループ B は 83.01°C 、グループ C は 81.05°C であった。これらの Tm 値を既知の各グループの標的遺伝子の Tm 値と比較した結果、グループ A の増幅遺伝子は *stx1*、グループ B は *stx2*、グループ C は *eae* であ

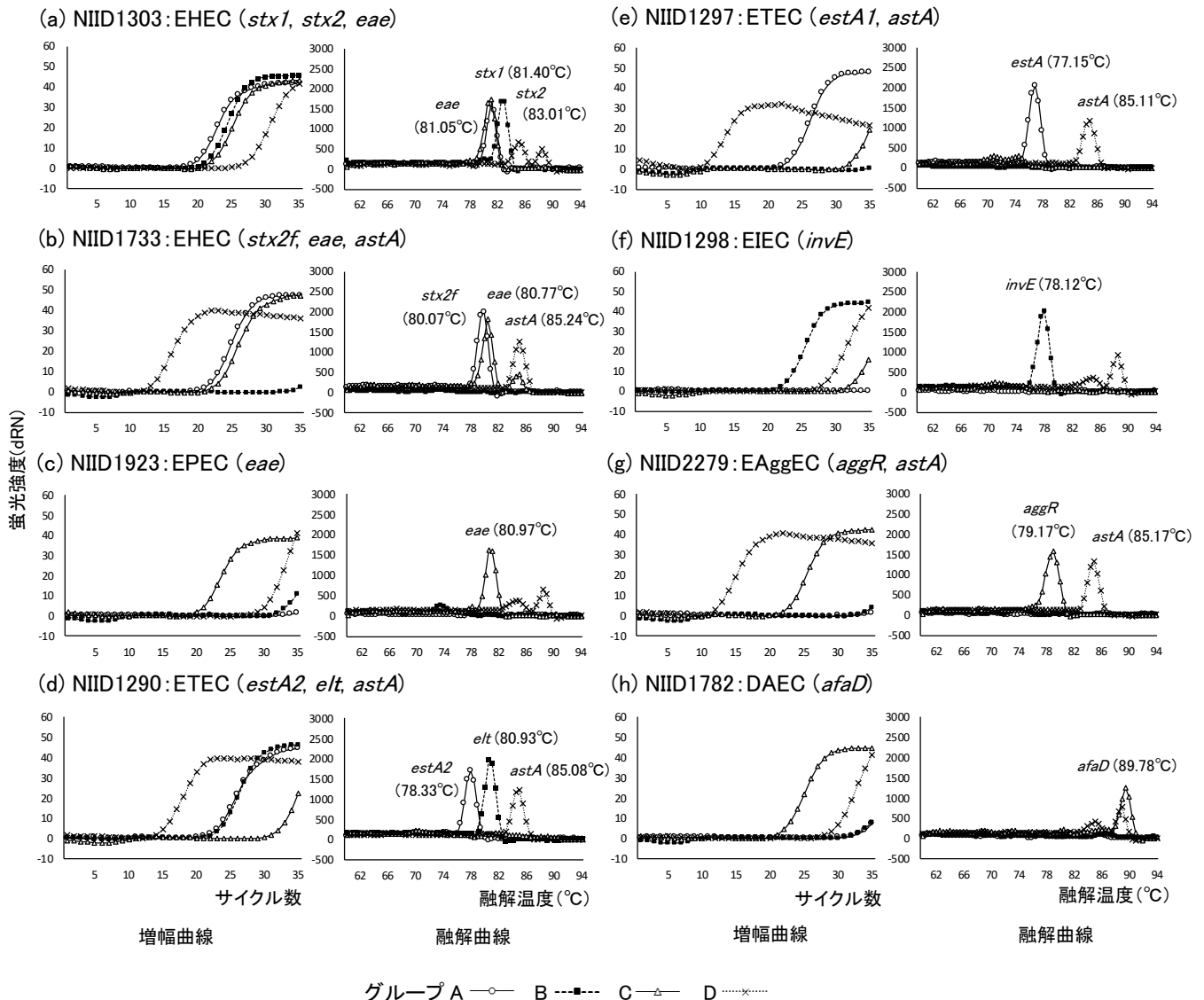


図3 MR-PCR法による標準菌株の解析結果

ることが判別可能であった。

図3(b)は、*stx2f*, *eae*, *astA* 保有 EHEC 株の解析結果である。増幅曲線から、グループ A, C, D において、明瞭な遺伝子増幅が確認された。融解曲線分析の結果、グループ A の T_m 値は 80.07°C であることから増幅遺伝子は *stx2f*, グループ D の T_m 値は 85.24°C で *astA* であることが判別可能であった。一方、グループ C の融解曲線は、80.77°C 及び 85.25°C の二峰性のピークを示した。 T_m 値 80.77°C は *eae* と判別可能であったが、 T_m 値 85.25°C はグループ C に該当する標的病原因子遺伝子がなかったことから、非特異的反応であることが判別可能であった。

さらに、図3(c)のグループ B, 図3(d), (e), (f)のグループ C, 図3(h)のグループ B 及び C の増幅曲線において、32 サイクル以降で緩やかな上

昇が確認された。また、図3(a), (c), (f), (h)のグループ D でも同様の傾向が確認されたが、融解曲線分析の結果、いずれも非特異的反応であることが判別可能であった。

(5) 臨床株を用いた MC-PCR 法及び MR-PCR 法による解析結果

当所で保存している臨床由来株 120 株を用いて、改良 MR-PCR 法及び MC-PCR 法により再解析を実施した(表4)。改良 MR-PCR 法の結果、下痢原性大腸菌 21 株 (17.5%) を検出し、そのうち EHEC 6 株 (5.0%), EPEC 3 株 (2.5%), EAggEC 4 株 (3.3%), DAEC 5 株 (4.2%), EAST1EC 3 株 (2.5%) を検出した(表5)。

EHEC 株では、MC-PCR 法では *stx* (*stx1* and/or *stx2*) 検出と判定されるが、改良 MR-PCR 法では

表 4 MC-PCR 法及び MR-PCR 法による臨床由来株の解析結果

菌株番号	保存年	O抗原	MC-PCR	改良MR-PCR	菌株番号	保存年	O抗原	MC-PCR	改良MR-PCR	菌株番号	保存年	O抗原	MC-PCR	改良MR-PCR
1	1996	167	-	-	41	2003	86a	-	-	81	2006	8	-	-
2	1996	1	-	<i>afaD</i>	42	2003	18	-	-	82	2006	1	-	-
3	1996	1	-	<i>afaD</i>	43	2003	157	<i>aggR</i>	<i>aggR</i>	83	2006	44	-	-
4	1996	1	-	-	44	2003	25	-	-	84	2006	1	-	-
5	1996	157	<i>stx, eae</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>	45	2003	1	-	-	85	2006	166	-	<i>afaD</i>
6	1996	157	<i>stx, eae</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>	46	2003	8	-	-	86	2006	8	-	-
7	1997	157	<i>stx, eae</i>	<i>stx2, eae</i>	47	2003	128	-	-	87	2006	18	-	-
8	1997	157	<i>stx, eae</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>	48	2003	128	<i>eae</i>	<i>eae</i>	88	2006	1	-	-
9	1997	18	-	-	49	2003	146	<i>eae</i>	<i>eae</i>	89	2006	6	-	-
10	1997	18	-	-	50	2003	167	-	-	90	2007	18	-	-
11	1997	1	-	-	51	2003	18	-	-	91	2007	1	-	-
12	1997	1	-	-	52	2004	1	-	-	92	2007	1	-	-
13	1997	6	-	-	53	2004	18	-	-	93	2007	124	-	-
14	2000	153	<i>stx</i>	<i>stx2</i>	54	2004	1	-	-	94	2007	1	-	-
15	2000	25	-	-	55	2004	18	-	-	95	2007	1	-	-
16	2000	1	-	-	56	2004	18	-	-	96	2007	1	-	-
17	2000	25	<i>astA</i>	<i>astA</i>	57	2004	111	<i>aggR</i>	<i>aggR</i>	97	2007	1	-	-
18	2000	1	-	-	58	2004	25	-	-	98	2007	164	-	-
19	2000	1	-	-	59	2004	44	-	-	99	2007	168	-	-
20	2000	44	-	-	60	2004	124	-	-	100	2008	6	-	-
21	2000	86a	<i>aggR</i>	<i>aggR</i>	61	2004	1	-	-	101	2008	6	-	-
22	2000	128	-	-	62	2004	55	-	-	102	2008	15	-	<i>afaD</i>
23	2001	18	-	-	63	2004	8	-	-	103	2008	8	-	-
24	2001	1	-	-	64	2004	169	-	-	104	2008	1	-	<i>afaD</i>
25	2001	25	-	-	65	2004	18	-	-	105	2008	166	-	-
26	2001	1	-	-	66	2004	1	-	-	106	2008	18	-	-
27	2001	1	-	-	67	2004	18	-	-	107	2008	25	-	-
28	2001	18	-	-	68	2004	164	-	-	108	2008	1	-	-
29	2001	157	<i>stx, eae</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>	69	2005	25	-	-	109	2008	1	-	-
30	2001	1	-	-	70	2005	1	-	-	110	2009	18	-	-
31	2002	78	-	-	71	2005	1	-	-	111	2009	1	-	-
32	2002	1	-	-	72	2005	1	-	-	112	2009	6	-	-
33	2002	1	-	-	73	2005	18	<i>astA</i>	<i>astA</i>	113	2009	1	-	-
34	2002	1	-	-	74	2005	8	-	-	114	2009	18	-	-
35	2002	1	-	-	75	2005	6	-	-	115	2009	1	<i>astA</i>	<i>astA</i>
36	2002	1	-	-	76	2005	25	-	-	116	2009	1	-	-
37	2002	6	-	-	77	2005	18	-	-	117	2009	125	-	-
38	2002	55	<i>eae</i>	<i>eae</i>	78	2005	8	-	-	118	2009	1	-	-
39	2002	1	-	-	79	2006	1	-	-	119	2009	127a	<i>aggR</i>	<i>aggR</i>
40	2002	119	-	-	80	2006	18	-	-	120	2009	1	-	-

stx1 及び *stx2* の保有について識別可能である。菌株番号 5, 6, 8, 29 の EHEC 株は *stx1* 及び *stx2* 保有株、菌株番号 7, 14 は *stx2* 単独保有株と判別された。

aggR 保有 4 株（菌株番号 21, 43, 57, 119）及び、*eae* 保有 8 株（菌株番号 5, 6, 7, 8, 29, 38, 48, 49）では、改良 MR-PCR 法及び MC-PCR 法の解析結果は一致した。

菌株番号 2, 3, 85, 102, 104 の 5 株は、MC-PCR 法で病原因子遺伝子は検出されなかったが、改良 MR-PCR 法で *afaD* 保有を確認し、DAEC である

表 5 MC-PCR 法による臨床由来株の解析のまとめ

分類	検出株数	(%)
EHEC	6	(5.0)
EPEC	3	(2.5)
EAggEC	4	(3.3)
DAEC	5	(4.2)
EAST1EC	3	(2.5)
計	21	(17.5)

ことが判明した。

MC-PCR 法で *astA* が検出された菌株番号 17, 73, 115 の 3 株は、改良 MR-PCR 法による解析においても EAST1EC であった。

考察

国内では、例年、下痢原性大腸菌による食中毒事例が 10~50 事例報告¹⁰⁾されている。また近年では、食品流通の広域化等により事例が大規模化している（表 6）。これらのことから、下痢原性大腸菌による健康危機事例に迅速に対応するため、10 病原因子遺伝子を対象とする MR-PCR 法を 2020 年度に開発²⁶⁾した。しかしながら、当該方法では、*stx2f* の融解曲線分析の結果が明瞭なピークとならないこと、近年の健康危機事例の起病原体である EAST1EC を検出できないことから、今回 MR-PCR 法の改良を行った。

まず各病原因子遺伝子の融解曲線分析を実施

表 6 下痢原性大腸菌を起因菌とする食中毒事例

発生年	発生地区	患者数(人)	原因施設等	原因食品	原因(検出病原因子)	参考文献
2005	千葉市	401	刑務所	白菜キムチ漬け	EPEC O6:H16	11)
2007	山梨県	229	調理施設	学校給食	EAggEC O44:H18 (<i>aggR</i>)	12)
2012	大阪府	102	調理施設	仕出し弁当	EPEC O169:H41	13)
2013	大阪市	39	飲食店	オムレツきのこソース	EAST1EC O166:H15 (<i>astA</i>)	14)
2013	長野県	81	保育所	給食	EPEC O55:H7	15)
2014	静岡県	510	花火大会(露店)	冷やしきゅうり	EHEC O157 (VT1, VT2)	16)
2014	千葉県	133	調理施設	仕出し弁当	EPEC O169	17)
2016	静岡県(関東)	67	食品加工会社	冷凍メンチカツ	EHEC O157 (VT2)	18)
2016	静岡県	94	宿泊施設	提供食	EPEC O159 (ST)	19)
2017	岐阜県	37	保育園	給食	EHEC O103:H11 (VT1)	20)
2017	千葉県	61	宿泊施設	提供食	EIEC OUT (<i>ipaH</i>)	21)
2017	高知県	67	飲食店	不明	EPEC O17	22)
2018	東京都	34	保育園	給食	EHEC O121 (VT2)	23)
2020	埼玉県	2958	飲食店	海藻サラダ	EAST1EC O7:H4 (<i>astA</i>)	24)
2021	東京都	2548	仕出し屋	仕出し弁当	EPEC O25 (LT)	25)

した結果, *stx1*, *stx2*, *eae*, *estA1*, *estA2*, *elt*, *invE*, *aggR*, *astA* の融解曲線は明瞭な一峰性を示した。しかしながら, *afaD* は低い温度に弱いピークを示す二峰性となった。そこで, この増幅産物の電気泳動を行った結果, *afaD* は目的サイズのバンド以外に 100 bp 未満の不明瞭なバンドが確認された。2 本鎖 DNA が 1 本鎖 DNA に解離する温度 (T_m 値) は, 増幅産物の長さや GC 含量に影響されることは知られている。*afaD* は, 増幅領域が 207 bp と短鎖であるものの, T_m 値が $90.0 \pm 0.20^\circ\text{C}$ と非常に高い。*afaD* の塩基配列を確認すると, GC 含量が 60% 以上で GC リッチな領域であった。そのため, T_m 値が高いことから立体構造をとりやすく, 融解曲線が二峰性を示したと推察された。

次に, 検査の効率化及び省力化を目的に, 複数の領域を 1 反応液で増幅する MR-PCR 法を確立するため, プライマーの組み合わせ, PCR 試薬及びサイクル数等の PCR 条件について検討した。プライマーの組み合わせは, 各領域の T_m 値が 2°C 程度乖離するようにグループの最適化を検討した。その結果, グループ A の標的病原因子を *stx1*, *stx2f*, *estA1*, *estA2*, グループ B を *stx2*, *elt*, *invE*, グループ C を *eae*, *aggR*, *afaD*, グループ D を *astA* とする 4 グループに分けた。これにより全ての領域が良好に増幅し, さらに融解曲線分析で病原因子遺伝子の確認が可能であった。

グループ A の 4 つの標的遺伝子のうち, *estA1* の T_m 値が $77.5 \pm 0.25^\circ\text{C}$, *estA2* が $78.7 \pm 0.19^\circ\text{C}$ と, T_m 差は 1.2°C とやや近いものの, 各領域の T_m ピークが明瞭に確認できること, *estA1* 及び *estA2* は

共に EPEC の ST (耐熱性毒素) 関連遺伝子であるため判別困難となった場合でも EPEC と判定可能であることから, 運用に支障ないと判断し, 同一グループに含めることとした。

グループ D に分類した *astA* は, 他の領域と組み合わせで MR-PCR 法を実施したところ, *astA* 以外の他の領域の十分な遺伝子増幅が確認されず, *astA* の遺伝子増幅のみが顕著に確認された (データ示さず)。これは, *astA* が 109 bp と非常に短鎖であることから, 各領域の増幅効率の差によるものと考えられた。そこで, *astA* については他の領域を混合せずグループ D として, 単領域の反応液とすることとした。

さらに検査法の有用性を確認するため, 当所保存分離株の臨床株 120 株を用いて改良 MR-PCR 法による再解析を実施した。その結果, 120 株のうち下痢原性大腸菌 21 株 (検出率 17.5%) を検出し, EHEC 6 株 (5.0%), EPEC 3 株 (2.5%), EAggEC 4 株 (3.3%), DAEC 5 株 (4.2%), EAST1EC 3 株 (2.5%) であった (表 5)。改良 MR-PCR 法と MC-PCR 法の共通標的遺伝子に関しては, 双方の結果が完全に一致し, 感度及び特異性ともに MC-PCR 法と比較して問題ないことが確認できた。

また, 改良 MR-PCR 法は, 電気泳動が不要であることから, 操作が簡便で, 結果判明までの時間も大幅に短縮可能であり, 食中毒事例等の健康危機事例発生時には行政担当課に対して迅速に結果報告が可能であることから, 有益な検査法であると思われる。

一方, 今回の臨床株の検討で MC-PCR 法で検出

不可能であった DAEC 株が 4.2%と高率に検出されたことは注目に値する。DAEC は健康人の糞便からも分離されることがあり、DAEC による有症者の 80%以上はノロウイルス等の病原体との重複感染であったとの報告²⁷⁾もあるため、下痢症発症機序などについては未だ不明な部分が多い。今後、愛媛県感染症発生動向調査事業において、当該検査法を活用しながら病原性等の解明や保有状況の把握のために、データ蓄積の必要があると考えられた。

同様に、*astA* についても胃腸炎との因果関係が不明な点が多い。感染症発生動向調査事業では、「胃腸炎の原因菌と考えられるもの」または「生化学的性状が同じものが多数の患者より検出された場合」のみ報告対象となっている。そのため、2020 年度に開発した旧 MR-PCR 法及び改良 MR-PCR 法の標的病原遺伝子に *astA* を含めていなかったが、近年 *astA* 保有の EASTIEC を起因病原体とする数千人規模の広域健康危機事例¹⁵⁾の発生報告があることから、今後注視していく必要があると考えられた。

まとめ

- 1 下痢原性大腸菌が保有する病原因子のうちの 11 病原因子遺伝子について、4 本の反応チューブで一斉検出可能な改良 MR-PCR 法を開発した。
- 2 改良 MR-PCR 法は、従来の MC-PCR 法では検出不可能であった *stx2f*, *afaD* が検出可能で、さらに迅速、簡便であることから食中毒事例等の健康危機事例発生時の原因究明調査に極めて有用である。
- 3 今後、愛媛県感染症発生動向調査等で改良 MR-PCR 法を活用し、*afaD* 及び *astA* の保有状況及び病原性との関連を解明していく予定である。

引用文献

- 1) 伊藤健一郎ほか：病原微生物検出情報，33 (1)，5 – 7 (2012)
- 2) 国立保健医療科学院：平成 24 年度新興再興感染症技術研修遺伝子検査法，1 – 46
- 3) EU Reference Laboratory for E. coli：
https://www.iss.it/documents/20126/1049000/EU_RL_VTEC_Method_06_Rev_1.pdf/1ad8f0c6-

8a1b-21c7-dddb-

4af28f440822?t=1576447091624

- 4) 伊藤文明ほか：混合プライマーを用いた PCR による下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法，日本臨床，50，343 – 347 (1992)
- 5) Yamasaki S. et al：Microbiol. Immunol，40 (5)，345 – 352 (1996)
- 6) 八柳潤ほか：70 (1)，73 – 79 (1996)
- 7) Kimata K. et al：Microbiol. Immunol，49 (6)，485 – 492 (2005)
- 8) 河野喜美子ほか：感染症学雑誌，72 (12)，1275 – 1282 (1998)
- 9) 小林一寛ほか：感染症学雑誌，76 (11)，911 – 920 (2002)
- 10) 厚生労働省 HP 4.食中毒統計資料：
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunituite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 11) 千葉市環境保健研究所：国立保健医療科学院 HP 健康危機管理事例データ，No.1229
- 12) 野田裕之：病原微生物検出情報，29 (8)，226 – 227 (2018)
- 13) 大阪府立公衆衛生研究所：国立保健医療科学院 HP 健康危機管理事例データ，No.1591
- 14) 中村寛海ほか：病原微生物検出情報，36 (5)，89 – 90 (2015)
- 15) 関口真紀ほか：病原微生物検出情報，34 (12)，382 – 383 (2013)
- 16) 静岡市環境保健研究所：国立保健医療科学院 HP 健康危機管理事例データ，NO.15029
- 17) 東京都健康安全研究センター：国立保健医療科学院 HP 健康危機管理事例データ，No.1192
- 18) 久川祐稔：病原微生物検出情報，38 (5)，91 – 92 (2017)
- 19) 静岡県健康福祉部：
<https://www.pref.shizuoka.jp/kousei/ko-510/documents/28hakusyo.pdf>
- 20) 千葉県衛生研究所：国立保健医療科学院 HP 健康危機管理事例データ，No.1104
- 21) 千葉県衛生研究所：国立保健医療科学院 HP 健康危機管理事例データ，No.17007
- 22) 高知市：平成 29 年食中毒発生状況
<https://www.city.kochi.kochi.jp/soshiki/36/syokutyuudokuhasseijyoukyou.html>
- 23) 世田谷区衛生検査センター：国立保健医療科

学院 HP 健康危機管理事例データ, No.19002

- 24) 厚生労働省 HP 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会：配布資料 3
- 25) 園田瑞穂ほか：病原微生物検出情報, 42 (5), 107 (2021)

26) 矢儀田優佳ほか：2021 年度愛媛県臨床検査学会抄録, 7, 37 (2020)

27) 濱田まどかほか：鹿児島県環境保健センター所報, 14, 59 -- 62 (2013)

Development of a rapid identification test for diarrheagenic *Escherichia coli* using multiplex real-time PCR

Yuka YAGITA, Ayako UJIKE, Yukiko ASANO, Noriko AOKI, Naritoshi BANDO, Hiroto SHINOMIYA

Many cases of health crisis caused by diarrheagenic *E. coli* have been reported in Japan every year. In the past, our laboratory performed multiplex conventional PCR for 10 virulence factors to detect diarrheagenic *E. coli* virulence factors. And then, in 2020, we developed a three-tube multiplex real-time PCR (MR-PCR) method for simultaneous detection of 10 virulence factor genes (*stx1*, *stx2*, *stx2f*, *eae*, *estA1*, *estA2*, *elt*, *invE*, *aggR*, and *afaD*) for the purpose of establishing a rapid and simple test method. However, the results of the *stx2f* analysis were somewhat unclear, and the virulence factor of EAST1EC (*astA*), which is responsible for large-scale food poisoning cases, was not included in the analysis. Thus, in this study, we have developed a four-tube MR-PCR method for simultaneous detection of 11 virulence factor genes; the assay was designed to detect *estA1*, *estA2*, *stx2f*, and *stx1* (tube 1), *invE*, *elt*, and *stx2* (tube 2), *aggR*, *eae*, and *afaD* (tube 3), and *astA* (tube 4).

Using this method, 21 diarrheagenic *E. coli* strains (17.5%) were detected in 120 clinical isolates, and 5 DAEC strains (4.2%) were newly detected, which had not been detected previously. In the future, we plan to use this method in the outbreak surveillance of infectious diseases and in the occurrence of health crisis cases.