

PCRによる腸管出血性大腸菌（O157）の産生する Vero毒素遺伝子検出法の検討

杉谷 加代 山岸 高由

KEY WORDS

PCR, Verotoxin, Enterohemorrhagic E. coli, O157

はじめに

腸管出血性大腸菌（Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC）は、ヒトに感染すると出血性腸炎を起こし、抵抗力の弱い幼児、小学生、老人には溶血性尿毒症症候群を併発し死に至らしめることもあるため、本菌の感染が疑われる場合、早急な原因菌の同定が要求される¹⁻³⁾。これらの病原因子は2種類のベロ毒素（Vero toxin 1, 2; VT1, 2）である^{2,4-7)}。したがって、O157をはじめとするEHECによる感染症が疑われる場合、便から菌を分離同定する一方、VTの産生性を早急に証明する必要がある⁸⁻¹⁰⁾。VTの検出には、ベロ細胞に対する細胞変性を調べる方法、抗毒素抗体を使った免疫学方法およびVT遺伝子を検出する方法がある⁸⁻¹⁰⁾。

われわれは、VT検出法の中で最も鋭敏なPolymerase chain reaction（PCR）を用い、2種類のVT遺伝子の同時検出と、ブイオン培養液および平板培地上のコロニーをサンプルとして直接VT遺伝子を検出する方法について検討したので報告する。

方法と材料

1) 使用菌株

腸管出血性大腸菌 O157 は、金沢大学医学部附属病院検査部細菌検査室で分離された2株（No.71, No.72）および石川県予防医学協会から分与されたもの（No.73, No.74, No.75, No.76）を使用した。内1株（No.73）はVT1のみの産生株であったが、残り5株はVT1とVT2の両毒素産生株であった。

2) 使用培地

ブレインハートインフュージョンブイオン（BHIB, 日水製薬）2mlおよびハートインフュージョン寒天

平板培地（HIA, 日水製薬）を使用した。

3) DNAの抽出

被検菌株をBHIBで37℃4時間培養した菌液の100μlをPCR用チューブ（0.6ml）にとり、サーマルサイクラー（Mini Cyclor, MJ Research Co., Watertown, Mass., USA）を使用して、95℃で5分、15分および30分間加熱し、12,000 rpm, 3分間遠心した上清をDNA抽出液として比較検討した。

4) プライマー

VT1およびVT2遺伝子に対する2組のプライマー、VTP-1, VTP-2およびVTP-3, VTP-4は、小林の報告⁹⁾に基き、合成を委託した（TaKaRa Co.）。

5) PCR法

PCR Amplification Kit（TaKaRa Co.）を用いた。反応液量50μlのうち10倍濃度緩衝液5μl,デオキシヌクレオチド混合液（各2.5mM）4μlおよびTaq DNAポリメラーゼ（1.25 U/μl）1μlを一定量とし、他の成分を変量とした（表1）。この反応液は、サーマルサイクラーで94℃45秒, 55℃1分, 72℃1分の加熱を30回繰り返し、目的の遺伝子DNAを増幅した。

6) PCR増幅産物の検出

PCR終了後、1.5%アガロースゲル電気泳動（Mupidミニゲル電気泳動, ADVANCE Co., Ltd）を行い、エチジウム・ブロマイド液で染色し、紫外線を照射し写真撮影（アトー科学機器）を行った。

結 果

1) 菌体からのDNA抽出条件について

BHIB培養液をそれぞれ95℃5分, 15分, 30分加熱処理して調製したDNA抽出液を鋳型DNAとして、

表1 PCR 反応液の組成

試 薬	1 サンプルあたりの 使用量
10倍濃度緩衝液	5 μ l
デオキシヌクレオチド混合液(各2.5mM)	4 μ l
プライマー VTP-1 (50 μ M※)	1 μ l
プライマー VTP-2 (50 μ M※)	1 μ l
プライマー VTP-3 (50 μ M※)	1 μ l
プライマー VTP-4 (50 μ M※)	1 μ l
Taq DNA ポリメラーゼ(1.25U/ μ l)	1 μ l
鋳型 DNA	1 μ l ※
蒸留水	35 μ l ※
計	50 μ l

※：変量

表2 毒素遺伝子検出に必要なサンプル量およびプライマー濃度

サンプル量 (μ l)	プライマー終濃度 (μ M)	毒素遺伝子検出 (同時検出)	
		VT1遺伝子	VT2遺伝子
1	0.2	—	±
	0.5	+	±
	1.0	+	+
	2.0	+	+
5	0.2	—	—
	0.5	+	±
	1.0	+	+
	2.0	+	+
10	0.2	—	—
	0.5	—	—
	1.0	—	—
	2.0	—	—

+：検出可能 ±：検出可能だが弱い反応 -：検出不能

VT1およびVT2の両遺伝子検出のためのPCRを行った。その結果、5分、15分、30分いずれの条件でもVT1とVT2遺伝子に相当する811および471塩基対の明瞭なDNAフラグメントが観察された。したがって、DNA抽出は95°C 5分の加熱条件で充分であると考えられた。

2) 培養液を直接鋳型DNAとする方法について

被検菌の培養液1 μ lを鋳型DNAとして試薬の入ったPCRチューブに入れ、95°C 5分間のDNA加熱抽出条件をPCR反応の前段階にプログラムして一連の

反応を行った。その結果、DNA加熱抽出液を鋳型DNAとする場合と同様の結果が得られた。したがってこれ以降、サンプルには培養液そのものを用い、DNA抽出とPCR反応を一括してサーマルサイクラーで行うこととした。

3) BHIBからのサンプル量およびPCR増幅条件について

毒素遺伝子検出に必要なサンプル量およびプライマー濃度についてBHIB一晚培養液を使って検討した結果を表2に示した。その結果、サンプル量が

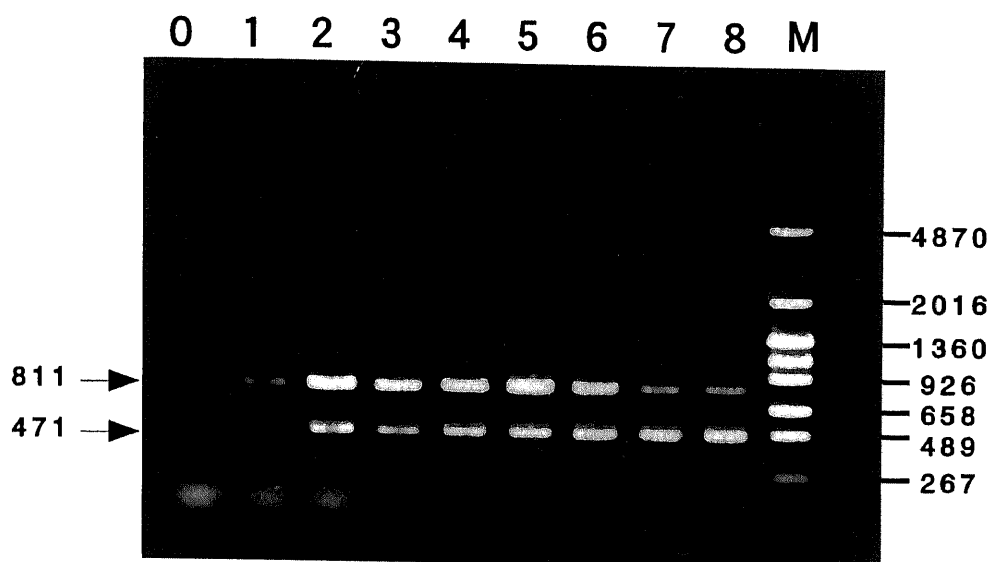


図1 VT1,VT2 両毒素産生株のPCRによるペロ毒素遺伝子の検出
0~8の数字はBHIBでの培養時間を示す。
Mは分子量マーカー、右の数字はDNAマーカーサイズ(bp)、左の数字はVT1(811)、VT2(471)遺伝子のサイズ(bp)を示す。
使用した各プライマー(VTP-1,2,3,4)の終濃度は1.0 μ M。

1 μ l のとき最も明瞭に VT1, VT2 遺伝子に相当する DNA のフラグメントが得られた。しかしサンプル量を 5 μ l とすると、プライマー濃度 0.5 μ M 以下での VT2 の反応が弱くなり、さらに 10 μ l まで菌液量を増やすと VT1, VT2 の遺伝子フラグメントとも全く検出されなくなり、目的の DNA 領域が増幅されることがわかった。これらの原因が、菌量そのものの増加によるものなのかどうかを確認するため、滅菌水による洗浄操作により培養液成分を除去した菌浮遊液をサンプルとして同様の実験を行った。その結果、1 μ l, 5 μ l, 10 μ l とサンプル量を増加させても VT1, VT2 に相当するフラグメントが明瞭に確認でき、これは BHIB 培養液 1 μ l を鋳型 DNA とした実験結果と同じであった。逆に、1 μ l の BHIB 培養液に未使用の BHIB を添加し PCR を行うと、9 μ l の添加により検出されるべき VT1, VT2 フラグメントが消失するという結果が得られた。以上のことから、PCR 反応液中への培養液成分の混入は、PCR 反応そのものを阻害する可能性があるため、BHIB 培養液を鋳型 DNA として使用する際のサンプル量は 1 μ l が適当と考えられた。さらに、サンプル量を増やす必要のあるときは、洗浄操作による培養液成分の除去が必須であると考えられた。また、プライマー濃度につ

いては、毒素遺伝子 VT1 および VT2 を同時に検出する場合、1.0~2.0 μ M の終濃度が適当であった。
4) VT 遺伝子検出に必要な BHIB 培養時間について

O157 の BHIB 一夜培養液 2 μ l をあらたに BHIB 2 ml に接種後、どのように菌が増殖していくのかを 560 nm での吸光度変化により経時的に分光光度計 (HITACHI U-2000) で測定した。その結果、約 2 時間まではほとんど吸光度の変化は見られなかったが、それ以降急速に菌液の濁度が増加し、6 時間後にはほぼプラトーに達した。このとき 1 時間毎に採取した菌液 1 μ l を鋳型 DNA として、PCR による VT1 および VT 2 遺伝子の同時検出を行ったところ、培養 1 時間後にはすでに VT1 に相当する DNA フラグメントがわずかに観察され、2 時間目以降で明瞭に観察できることがわかった (図 1)。VT2 に相当する DNA フラグメントも、培養 2 時間後には明瞭なバンドとして観察でき、これらの結果には菌株による差がほとんど見られなかった。したがって、BHIB で O157 を培養する際は、37 $^{\circ}$ C で最低 2 時間の培養で VT1 および VT2 遺伝子の同時検出が可能であることがわかった。

表3 コロニーPCRによる毒素遺伝子検出とプライマー濃度

プライマー終濃度 (μM)		毒素遺伝子検出 (同時検出)	
VT1 遺伝子検出用 (VTP- 1,2)	VT2 遺伝子検出用 (VTP- 3,4)	VT1 遺伝子	VT2 遺伝子
0.2	0.2	—	±
	0.5	—	+
	1.0	—	+
	2.0	—	+
0.5	0.2	+	—
	0.5	+	±
	1.0	+	+
	2.0	+	+
1.0	0.2	+	—
	0.5	+	±
	1.0	+	+
	2.0	+	+
2.0	0.2	+	—
	0.5	+	±
	1.0	+	+
	2.0	+	+

+: 検出可能 ±: 検出可能だが弱い反応 -: 検出不能

5) コロニーからの直接 PCR

HIA に発育したコロニーから、白金線の先端に被検菌を取り、余分の菌を新しい寒天培地に2度穿刺して取り除いた後、50 μl の PCR 試薬混合液に直接菌を浮遊させた。このチューブをサーマルサイクラーにセットし、DNA 抽出と PCR を一括したプログラムで VT1 および VT2 遺伝子の同時検出を行った。このとき、使用する2組のプライマー濃度は終濃度 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 μM の4段階を設定し、これらの組合せを変えることによりどの条件が適切であるかを検討した。その結果、VT1 および VT2 遺伝子検出用プライマーの終濃度がそれぞれ 0.5~2.0 μM および 1.0~2.0 μM の濃度条件において VT1, VT2 遺伝子の同時検出が可能であった (表3)。

以上より、コロニーから採取した生菌を直接鋳型 DNA として、2種類の毒素遺伝子の PCR による同時検出が可能であることがわかった。

考 察

O157 を主とする腸管出血性大腸菌の同定に際し、2種類のベロ毒素 (VT1 と VT2) の遺伝子を PCR 法により検出する方法について検討した結果、サンプル量とプライマー濃度を一定にすることで同時検

出が可能であった。

コロニーから直接遺伝子を検出する方法は、大腸菌プラスミドへの DNA インサートチェックとして用いられている¹¹⁾が、これまで報告例の見あたらないベロ毒素遺伝子検出に応用したところ、極めて有効であるということがわかった。すなわち、下痢便を塗抹した分離培地上に腸管出血性大腸菌と疑われるコロニーが出現した場合、ここから直接菌を採取し、ベロ毒素遺伝子の有無を調べることができると、より迅速で簡便に検査結果を得ることが期待できる。

免疫抗体を使った ELISA 法や培養細胞を使ったバイオアッセイでは4時間~数日を検査に要する^{8,10)}の比べ、PCR 法を用いたベロ毒素遺伝子検出は、分離培地上のコロニーから毒素遺伝子検出までの所要時間は約3時間であり、迅速性に優れていた。また、このときサンプルとした菌培養液 1 μl 、あるいはコロニーにタッチした白金線にどのくらいの菌数が存在したのかを定量白金耳による菌数測定により計測したところ、一晚培養の菌液 1 μl 中には約 8×10^5 CFU (Colony Forming Unit)、またコロニーの場合は $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ CFU であった。このことから、この程度の菌数がサンプル中に存在すれば毒素遺伝子の検出が可能であると考えられた。

まとめ

O157 の 2 種類のベロ毒素遺伝子の同時検出は、純培養の液体培地であれば最低 2 時間培養の菌液 1 μ l, 寒天培地上のコロニーであれば直接生菌を鋳型 DNA とし、プライマー濃度を調整して PCR を行えばよいことがわかった。

また、コロニーから直接 PCR を行えば、約 3 時間で結果が得られるため、腸管出血性大腸菌群の感染症に対する迅速な診断情報として有用であると考えられた。

文 献

- 1) 竹田美文：下痢原性大腸菌，竹田美文他編，食中毒の正しい知識，第 2 版，57-62，菜根出版，1993.
- 2) 湯通堂隆他：志賀毒素様毒素，竹田美文他編，食中毒の正しい知識，第 2 版，141-146，菜根出版，1993.
- 3) 竹田多恵：腸管出血性大腸菌による HUS. 日本臨牀, 51 : 191-203, 1993.
- 4) Karch, H. et al. : Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 27 : 2751-2757, 1989.
- 5) Takao, T. et al. : Identity of molecular structure of Shiga-like toxin(VT1) from *Escherichia coli* O-157 : H 7 with that of Shiga toxin. Microb. Pathog., 5 : 357-369, 1988.
- 6) Jackson, M. P. et al. : Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural gene for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. FEMS Microbiol. Lett., 44 : 109-114, 1987.
- 7) Ito, H. et al. : Clonig and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O-91 : H 21 isolated from a patient with the haemolytic uremic syndrome. Microb. Pathog., 8 : 47-60, 1990.
- 8) 甲斐明美 他：腸管出血性大腸菌の同定法 1. Vero 毒素の検出法. 臨床検査, 36 : 1329-1333, 1992.
- 9) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の同定法 2. PCR 法. 臨床検査, 36 : 1334-1338, 1992.
- 10) 山田文也：腸管出血性大腸菌の検査法. 検査と技術, 21 : 13-18, 1993.
- 11) 中山広樹：本当に見える PCR. バイオ実験イラストレイテッド③, 80-82, 秀潤社, 1996.

Study on polymerase chain reaction test to identify verotoxin-genes from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

Kayo Sugitani Takayoshi Yamagishi