PCR 法による大腸菌 O157 および H7 抗原遺伝子の検出

塚本 定三・神吉 政史

(大阪府立公衆衛生研究所)

(受付: 平成 11 年 7 月 16 日)

(受理: 平成 11 年 8 月 25 日)

Detection of O157 and H7 Antigen Genes of *Escherichia coli* by PCR

Teizo TSUKAMOTO and Masashi KANKI

(Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku,
Osaka 537-0025)

A PCR method was developed for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157 and H7 antigens. Two PCR primer pairs for amplification of both *E. coli* O157 *rfbE* and H7 *fliC* genes, which are necessary for the expression of the O157 and H7 antigen respectively, were performed for the detection of *E. coli* O157:H7. All Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O157:H7 and STEC O157:NM strains were positive for both *E. coli* O157 *rfbE* and H7 *fliC* genes.

Non-STEC O157 strains were positive only for *E. coli* O157 *rfbE* genes and H7 strains except O157 were positive only for H7 *fliC* genes. Some of the nonmotile strains were positive for H7 *fliC* genes. No cross-reaction was observed with other *E. coli* serotypes (except O157 and H7) and other bacterial species, like *Salmonella* O30 and *Citrobacter freundii* which react with *E. coli* O157 antiserum. It is recommended that PCR amplification of both *E. coli* O157 *rfbE* and H7 *fliC* genes is one of the most specific methods for *E. coli* O157:H7 identification.

Key words: *E. coli* O157:H7, PCR

緒 言

大腸菌の血清型別に用いている O 抗原, H 抗原を遺伝学的に調べる手段として, おおのの抗原に関連のある特異遺伝子を PCR で検出する方法がある。大腸菌 O157:H7 を例にとってみると, O157 抗原の特異遺伝子として O 抗原多糖の生合成に関与する遺伝子 *rfbE* があり¹⁾, H7 抗原についてもフラジェリンをコードしている遺伝子のなかの H7 抗原特異遺伝子 *fliC* があり¹⁰⁾, PCR 法によりそれらを増幅してその有無を観察すればよい^{3, 5, 11)}。一方, 大腸菌 O157:H7 はほとんどすべてが志賀毒素を産生すると考えられることから⁷⁾, 遺伝学的手法で迅速に O157:H7 を血清型別できれば早期に毒素産生の推定も可能である。そこで O157 抗原, H7 抗原をコードしている遺伝子の両者を PCR 法を用いて同

時に検出することにより, O157:H7 の迅速診断を試みた。

方 法

供試菌株: 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O157:H7 111 株, STEC O157:NM (運動性なし) 5 株, STEC でない (non-STEC) O157 (H7 抗原以外) 10 株, 大腸菌 H7 (O157 抗原以外) 65 株, その他大腸菌 (O157 抗原以外でしかも H7 抗原以外) 218 株, その他の菌種として *Salmonella* O30 2 株, *Citrobacter freundii* 15 株, *Escherichia hermannii* 1 株, *Yersinia enterocolitica* O9 1 株, *Vibrio cholerae* O1 1 株, さらに対照として大腸菌 O157 型別用標準株 (O157:H19) および H7 型別用標準株 (O1:H7) を供試菌として用いた。供試菌をトリプトソイブイオンで 37℃, 18 時間培養後, 100℃, 5 分加熱したものを試料とした。

PCR: O157 抗原に関与する遺伝子として, O157 抗

原多糖の生合成を制御する遺伝子 *rfbE* (accession number S83460)¹⁾, H7 抗原に参与する遺伝子として, フラジェリンをコードしている遺伝子のなかの H7 抗原遺伝子 *fliC* (accession number L07388)¹⁰⁾ をターゲットとして, おのおのについてプライマー対を設定した.

O157 *rfbE* F: 5'-GTCTGGACTCAACGTGGATT-3' (181-200)

O157 *rfbE* R: 5'-AACTTGCTCATTCGATAGGC-3' (1166-1147)

H7 *fliC* F: 5'-CGCAGGCTACTGATTCAGCT-3' (776-795)

H7 *fliC* R: 5'-CTGTATAGTCGGCAACGTTA-3' (1318-1299)

増幅される DNA サイズは O157 *rfbE* は 986 bp, H7 *fliC* は 543 bp である.

常法⁶⁾に従い試料に PCR 用の試薬, プライマー 2 組 (4 種類) を加え, 熱変性 94°C, 1 分, アニーリング 55°C, 1 分, 伸長 72°C, 1 分で 30 サイクル行った. 増幅された DNA の確認は 1.5% アガロースによる電気泳動で行なった.

結 果

Fig. 1 に示すようにレーン 1 の STEC O157:H7,

レーン 2 の STEC O157:NM はアガロースゲル上に 986 bp および 543 bp の 2 カ所に PCR 産物のバンドが観察された. 一方, レーン 3 の O157:H42 およびレーン 5 の大腸菌 O157 型別用標準株は 986 bp, レーン 4 の O1:H7 およびレーン 6 の大腸菌 H7 型別用標準株は 543 bp のところにのみバンドが検出された.

Table 1 は臨床分離株を含む多くの株で検討した成績である. STEC O157:H7 111 株および O157:NM 5 株のすべての株に *rfbE*, *fliC* 遺伝子の同時増幅が認められた. 一方, non-STEC の大腸菌 O157 で H7 以外の 10 株 (H38 2 株, H42 1 株, H43 1 株, H 型別不能 5 株, NM 1 株) はすべて *rfbE* 遺伝子のみが増幅され, O157 以外で H7 抗原を持っている 65 株は *fliC* 遺伝子のみ増幅された. O157 および H7 抗原を持たない STEC O26:H11 8 株および O111:NM 3 株さらにその他の大腸菌 218 株については O55:NM 4 株を除いて PCR 産物の増幅は認められなかった. また, *Salmonella* O30 2 株, *Citrobacter freundii* 15 株, *Escherichia hermannii* 1 株, *Yersinia enterocolitica* O9 1 株, *Vibrio cholerae* O1 1 株についても PCR 産物の増幅はなかった.

考 察

今回報告した PCR 法を用いれば大腸菌 O157:H7 に

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products of *E. coli* O157 *rfbE* and H7 *fliC* gene from *E. coli* strains.

Lane M pHY DNA Marker (TaKaRa), Lane 1 *E. coli* O157:H7 (STEC), Lane 2 *E. coli* O157:NM (STEC), Lane 3 *E. coli* O157:H42, Lane 4 *E. coli* O1:H7, Lane 5 *E. coli* O157 (Standard O antigen strain), Lane 6 *E. coli* H7 (Standard H antigen strain)

Table 1. Detection of *Escherichia coli* O157 *rfbE* and H7 *fliC* genes by PCR

Group		No. of strains tested	No. of positive strains		
			O157 <i>rfbE</i> H7 <i>fliC</i>	O157 <i>rfbE</i>	H7 <i>fliC</i>
STEC	O157:H7	111	111	0	0
	O157:NM*	5	5	0	0
	O26:H11	8	0	0	0
	O111:NM	3	0	0	0
Non-STEC	O157:H38	2	0	2	0
	O157:H42	1	0	1	0
	O157:H43	1	0	1	0
	O157:HNT**	5	0	5	0
	O157:HM	1	0	1	0
	O1:H7	9	0	0	9
	O2:H7	5	0	0	5
	O18ac:H7	19	0	0	19
	O27:H7	18	0	0	18
	O55:H7	3	0	0	3
	O128:H7	2	0	0	2
	ONT:H7	9	0	0	9
	O55:NM	4	0	0	4
	Others***	214	0	0	0
	<i>Salmonella</i> O30	2	0	0	0
	<i>Citrobacter freundii</i>	15	0	0	0
	<i>Escherichia hermannii</i>	1	0	0	0
	<i>Yersinia enterocolitica</i> O9	1	0	0	0
	<i>Vibrio cholerae</i> O1	1	0	0	0

* Nonmotile

** Nontypable

*** O157 or H7 strains were excluded, nonmotile strains were included

については *rfbE* 遺伝子, *fliC* 遺伝子の同時増幅がみられ, それ以外の大腸菌はいずれか一方 (O157 抗原あるいは H7 抗原のいずれか一方をもつ株) またはいずれも増幅されない (O157 抗原および H7 抗原をもたない株) ため, 大腸菌 O157:H7 を迅速に調べることができた。また, 大腸菌 O157 と共通の O 抗原をもつと報告されている *Salmonella* O30, *Citrobacter freundii*, *Escherichia hermannii*, *Yersinia enterocolitica* O9^{2, 8, 9)} および大腸菌 O157 と類似の *rfbE* 遺伝子をもっている *Vibrio cholerae* O1¹⁾ も陰性であった。ただし, 大腸菌 O157:NM については志賀毒素の産生性の違いにより *fliC* 遺伝子の増幅が異なり, 5 株の STEC の O157:NM では PCR 産物が得られたが, 1 株の non-STEC の O157:NM では増幅されなかった。これは STEC O157:NM は *fliC* 遺伝子が存在しているにもかかわらず, 調節領域の変異などにより H7 抗原が発現されていない⁴⁾ ものと思われる。結果は示さなかったがその裏付けとして STEC O157:H7 と STEC O157:NM および対照である大腸菌 H7 型別用標準株の *fliC* 遺伝子の PCR 産物のプライマー部分を除く 503 bp について DNA の塩基配列を調べてみると, H7 型別用標準株と STEC O157:H7 および STEC O157:NM は各々 97% の一致率であったが, STEC O157:H7 と STEC O157:NM では完全に一致

した。一方, non-STEC の O157:NM には *fliC* 遺伝子はまったく存在しない。

以上のことから本法は大腸菌 O157:H7 を迅速に調べるのに有効であるとともに, 大腸菌 O157:H7 のほとんどすべての株は志賀毒素を産生すると思われるため⁷⁾, *rfbE*, *fliC* 遺伝子を今回報告した PCR 法により調べることににより, 臨床材料, 食品から分離した菌株が STEC か, non-STEC かの鑑別に有効な補助手段となると考えられる。さらに, 志賀毒素遺伝子との PCR 法¹²⁾ を併用すればより有効性が高まる。また, O157:NM については用いた株数が少ないため, さらに多くの株数についての検討が必要であるが, *rfbE* 遺伝子とともに *fliC* 遺伝子が陽性であった場合は STEC である可能性が高いと思われる。

謝 辞

本研究の実施に当たり, *Salmonella* O30, *Escherichia hermannii*, *Yersinia enterocolitica* O9 を分与していた東京立衛生研究所 甲斐明美博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Bilge, S. S., Vary, Jr. J. C., Dowell, S. F. and Tarr, P. I.:

- Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. Immun.*, **64**, 4795-4801 (1996).
- 2) Chart, H., Willshaw, G. A., Cheasty, T. and Rowe, B.: Structure and antigenic properties of *Citrobacter freundii* lipopolysaccharides. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 583-587 (1993).
 - 3) Desmarchelier, P. M., Bilge, S. S., Fegan, N., Mills, L., Vary, Jr. J. C. and Tarr, P. I.: A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1801-1804 (1998).
 - 4) Feng, P., Fields, P. I., Swaminathan, B. and Whittam, T. S.: Characterization of nonmotile variants of *Escherichia coli* O157 and other serotypes by using an anti-flagellin monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2856-2859 (1996).
 - 5) Gannon, V. P. J., D'Souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K. and Read, S.: Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 656-662 (1997).
 - 6) 平井久丸, 門脇 孝: PCR 法利用の手引き. 矢崎義雄監修, 中外医学社, 東京 (1998).
 - 7) 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌の臨床材料および食品からの分離・同定法. *日本細菌学雑誌*, **52**, 748-762 (1997).
 - 8) Lior, H. and Borczyk, A. A.: False-positive identifications of *Escherichia coli* O157. *Lancet*, **i**, 333 (1987).
 - 9) Rice, E. W., Sowers, E. G., Johnson, C. H., Dunnigan, M. E., Strockbine, N. A. and Edberg, S. C.: Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1315-1316 (1992).
 - 10) Schoenhals, G. and Whitfield, C.: Comparative analysis of flagellin sequences from *Escherichia coli* strains possessing serologically distinct flagellar filaments with a shared complex surface pattern. *J. Bacteriol.*, **175**, 5395-5402 (1993).
 - 11) 塚本定三, 河合高生: PCR 法による O157 抗原の同定. *感染症誌*, **72**, 738-741 (1998).
 - 12) Yamasaki, S., Lin, Z., Shirai, H., Terai, A., Oku, Y., Ito, H., Ohmura, M., Karasawa, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H. and Takeda, Y.: Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligonucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **40**, 345-352 (1996).