ベロ毒素遺伝子の蛍光偏光法による迅速検出 および遺伝子型別

村野勢津子^{*1}・伊藤文明^{*2}・石村勝之^{*3}
鶴岡 誠^{*1}・山岡弘二^{*3}

(^{*1}広島市先端科学技術研究所, ^{*2}広島市保健所, ^{*3}広島市衛生研究所)

(受付 平成 13 年 3 月 21 日)

(受理 平成 13 年 4 月 20 日)

Rapid Detection and Typing Method of the *Escherichia coli* Vero Toxin Genes by Fluorescence Polarization

Setsuko MURANO^{*1}, Fumiaki ITOH^{*2}, Katsuyuki ISHIMURA^{*3},
Makoto TSURUOKA^{*1} and Koji YAMAOKA^{*3}

(^{*1}Advanced Science and Technology Laboratory, Hiroshima City, 151-366
Otsuka, Numata-cho, Asaminami-ku, Hiroshima-shi 731-3162)

(^{*2}Hiroshima City Public Health Center, 11-27 Fujimi-cho, Naka-ku,
Hiroshima-shi 730-0043)

(^{*3}Hiroshima City Institute of Public Health, 4-1-2 Shoko-center, Nishi-ku,
Hiroshima-shi 733-8650)

Fluorescence polarization technique can specifically detect nucleotide sequences by hybridization without separation procedures. We applied the technique to the detection of the Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (STEC).

STEC possesses *stx1* and/or *stx2* and using MK primers, the amplification of *stx1* and/or *stx2* can be performed universally, but the band sizes for both genes are almost identical; thus the genotype is hard to determine using electrophoresis. To identify *stx* genotype, conventional PCR combined with electrophoresis requires a second amplification process with more than 25 temperature cycles using other genotype-specific primer pairs. However, using the newly developed method only a few temperature cycles of the asymmetric PCR using the same MK primers and two different probes for *stx1* and *stx2* were needed. The incubation time for probe hybridization was 10 minutes, and the detection time for fluorescence polarization was within about 1 minute per sample. Thus, we considered that the detection method using fluorescence polarization technique was a rapid and reliable method for detecting *stx1* and/or *stx2*.

Key words: Fluorescence polarization, Shiga toxin genes, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

緒 言

腸管出血性大腸菌による集団感染症は、1990 年の浦和市の検出事例に始まり、1996 年には集団発生事例が全国的に多発した。同年 8 月には指定伝染病に指定さ

れ、それに伴い検出用試薬の開発や検出法の検討などが活発に行われてきた。当所においても、1996 年 8 月に蛍光偏光法¹⁰⁾を応用しベロ毒素産生性大腸菌中のベロ毒素遺伝子(*stx*)^{1, 6)}を検出することを試み、軽部、本田らとの共同研究により基礎的な検討を行い、*stx2* 型について検出可能であることを確認した^{9, 12~14)}。厚生省通知に示された検査法⁸⁾などでは、増菌培養後分離培養、性状確認による菌株の同定など煩雑な操作が必要で結果が

^{*1} ☎731-3162 広島市安佐南区沼田町大塚 151-366

^{*2} ☎730-0043 広島市中区富士見町 11-27

^{*3} ☎733-8650 広島市西区商工センター 4-1-2

得られるまで4日間を要する。食品検査においては速やかに安全性を確認することが必要であり、そのためには検査法の簡易化、迅速化および安全性が求められる。

蛍光偏光法は、視覚的判断による電気泳動法と異なり、数値によりDNAの有無を判定可能であるため、個人差や非特異産物の影響を受けないという利点がある。また、DNAハイブリッド形成反応を利用しているため特異性にも優れており、臭化エチジウムなど毒性の高い試薬を使用しないという利点もある。

現在までに合成DNAやウシ糞便由来試料を用いて基礎的な検討を行ってきたが^{12, 13)}、ヒト糞便、食品についての検討は行っていない。将来的には、公共あるいは食品会社などの検査機関において日常的な食中毒検査に応用されることを考え、今回はこの方法をヒト糞便および食品に応用することを試みた。また、これまでに検討されてきた*stx2*型検出に加えて*stx1*型検出についても検討を行い、ヒト糞便および食品について蛍光偏光法を用いて遺伝子型を判別することを試みた。

材料と方法

1. 材料

試料は広島市衛生研究所（以下、広島市衛研）保存菌株（ヒト糞便 O111 株（*stx1* 検出）、O157 株（*stx1*, *stx2* 検出）、O157 株（*stx2* 検出））および STEC 検査のために広島市衛研に搬入された糞便および食品を用いた。糞便・食品の由来、血清型、糞便の場合は検出された遺伝子型を Table 1 に示した。食品については厚生省通知の検査法⁸⁾に準拠した培養法により STEC は分離されず、遺伝子増幅 (PCR) 法および電気泳動法による確認で *stx* は検出されなかった。

Table 1. List of samples for sensitivity and typing test by fluorescence polarization

No.	Origin or sample name	Serogroup	<i>stx</i> gene
1	Human	O111	<i>stx1</i>
2	Human	O26	<i>stx1</i>
3	Human	O26	<i>stx1</i>
4	Human	O26	<i>stx1</i>
5	Human	O111	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>
6	Human	O157	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>
7	Human	O157	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>
8	Human	O157	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>
9	Human	O157	<i>stx2</i>
10	Human	O157	<i>stx2</i>
11	Human	O157	<i>stx2</i>
12	Human	O157	<i>stx2</i>
13	Human	O157	<i>stx2</i>
14	Beef	Negative	Negative
15	Beef	Negative	Negative
16	Pork	Negative	Negative
17	Tomato	Negative	Negative
18	Leek	Negative	Negative
19	Cucumber	Negative	Negative

2. 鋳型 DNA の調製

蛍光偏光法による *stx* 検出感度を測定する際は、広島市衛研保存菌株をトリプトソイブイオン (TSB, Difco 製) で純培養した菌液から滅菌蒸留水で 10 倍希釈列を調製し、沸騰水浴中で 10 分間置く加熱法を行った後、10,000 rpm で 5 分間遠心した上清 10 μ l を PCR 用鋳型 DNA (以下、テンプレート) とした。

遺伝子型別を行う際は、ヒト糞便については、GN ブロス (Difco 社製) 増菌培養液 1 ml をマイクロチューブに入れ、10,000 rpm で 5 分間遠心後上清を捨て沈渣を蒸留水 100 μ l に懸濁した。この懸濁液から加熱法により DNA 抽出を行い、遠心した上清 10 μ l をテンプレートとした。

食品については、*stx* 陽性の食品が入手できなかったため、TSB 増菌培養液 1 ml を用いヒト糞便同様に調製したテンプレート 10 μ l に、感度測定用に調製したテンプレート (菌量は約 10^3 cfu/10 μ l) を 10 μ l 添加し計 20 μ l を PCR に供した。PCR 時の反応液量は蒸留水で調整した。

3. PCR 反応

PCR は Karch ら⁷⁾ の MK プライマー (MK1: 5'-TTTACGATAGACTTCTCGAC-3', MK2: 5'-CACATATAAATTATTTCGCTC-3') を用い、Table 2 に示す反応液組成で行った。

遺伝子型別を行う前の段階での蛍光偏光度 (以下、偏光度) の感度を確認するために、偏光度測定に適しているとされる^{12~14)} センス側プライマー濃度とアンチセンス側プライマー濃度が各々異なった非対称 PCR³⁾ を 35 サイクル実施し、PCR 産物を偏光度測定に供した。

遺伝子型別を行う際は、センス側プライマー濃度とアンチセンス側プライマー濃度が同じ対称 PCR²⁾ を 35 サイクル実施した後、非対称 PCR を 10 サイクル実施し、PCR 産物を偏光度測定に供した。

温度条件は、伊藤らの方法^{4, 5)} に準じ、94°C 30 秒 (Denaturation), 48°C 1 分 (Annealing), 72°C 30 秒 (Extension) とした。偏光度測定には、1 本鎖 DNA を必要とするので、2 本鎖 DNA の生成を防ぐために、非対称 PCR の最終サイクルはプライマーアニーリング後 72°C での伸長をせずに 4°C に下げ保持した (アニーリ

Table 2. Volume of reagents for symmetric and asymmetric PCR systems

Reagents	Symmetric	Asymmetric
Sense primer	10 pmol	25 pmol
Antisense primer	10 pmol	250 pmol
DNA polymerase*	0.4 μ l	0.5 μ l
dNTP mixtures (each 2.5 mM)	2 μ l	8 μ l
Reaction buffer ($\times 10$)	5 μ l	10 μ l
Template	10 μ l	20 μ l
Distilled water	up to 50 μ l	up to 100 μ l

* TaKaRa Ex Taq

ング処理)。

プライマーはカスタム合成品を用いた。なお、毎 PCR 時に試料の代わりに蒸留水を用いて PCR を行い、陰性コントロールとした。サーマルサイクラーは、Perkin-Elmer 社製の GeneAmp PCR System 9600 を使用した。

4. 偏光度測定

(1) プローブの設計

PCR 増幅領域 (約 230 塩基) のセンス側に 21 塩基の *stx1* 検出用プローブ試薬 (PB235) と、同じく 21 塩基の *stx2* 検出用プローブ試薬 (PB03) を設計した。プローブ試薬はカスタム合成品 (5' 側にフルオレセイン標識) を用いた。

(2) 偏光度測定条件

偏光度の測定にはプラスチック (ポリメタクリル酸メチル) 製 4 面透明 10 mm 角標準セル (東京硝子器械製) を用い、セルホルダーの温度は 46°C に保持した。その他の測定条件は鶴岡らの方法¹¹⁾ に準じ、セルに PCR 産物 40 μ l, プローブ試薬 400 μ l および反応緩衝液として 0.8M 塩化ナトリウム (和光純薬工業製, 試薬特級) 含有 TE (pH 8.0, ニッポンジーン製, 遺伝子工学研究用) 400 μ l を入れ、マイクロチップを用いて混合し、10 分後の偏光度を測定した。プローブ試薬は反応緩衝液に溶解し、濃度は 1.2 nM とした。

測定装置は、日本分光製分光蛍光光度計 FP-777 および自動偏光解消装置 ADP-301 を使用し、測定波長は励起側を 485 nm, 蛍光側を 525 nm とした。

結 果

1. 蛍光偏光法における検出感度

蛍光偏光法を用いた際の検出可能最低菌量を把握するため感度測定を行った。その結果として、偏光度測定試料と陰性コントロールの偏光度の差を 1,000 倍した値 (ΔP) を Table 3 に示した。電気泳動法で *stx1* が確認された試料 6 検体は PB235 による測定で、 3.8×10^2 cfu/10 μ l 以上のとき、すべて ΔP が 20 mP 以上であった。*stx1* と *stx2* の両方 (*stx1* & 2) が確認された試料は、4 検体については PB235 による測定で、 2.3×10^2 cfu/10 μ l のとき ΔP が 20 mP 以上であった。2 検体については PB03 による測定で、PB235 による測定と同様に 2.3×10^2 cfu/10 μ l のとき ΔP が 20 mP 以上であった。*stx2* が確認された試料 5 検体は PB03 による測定で、 4.0×10^2 cfu/10 μ l 以上のとき ΔP の平均値が 20 mP 以上であった。

2. 遺伝子型別試験結果

stx 陽性既知のヒト糞便について本法を用いて遺伝子型別を行った。 ΔP を Table 4 に示した。従来法 (PCR および電気泳動法) で *stx1* が確認された検体においては PB235 による測定で、 ΔP が 20 mP 以上で、PB03 による測定では 20 mP 未満であった。*stx2* が確認された

Table 3. Sensitivity of fluorescence polarization method for detecting *stx* genes

Genotype	Probe	ΔP (mP) on various number (cfu/10 μ l) of bacteria		
		10 ¹	10 ²	10 ³
<i>stx1</i>	PB235		36	45
			41	
			32	47
			43	52
			44	51
		25	43	57
<i>stx1</i> & 2	PB235		24	42
			44	53
			45	43
			48	48
		23		
			24	36
<i>stx2</i>	PB03		32	38
			17	25
			14	34
			17	42
			36	44
		8	30	42

ΔP : The values indicate the difference between polarization of a probe in the presence of an amplified gene and a negative control. They are the values multiplied by 1,000 and shown in the unit of mP.

Table 4. Polarization values for typing of *stx* in feces

No.	Serogroup	Genotype	ΔP (mP) of PB235	ΔP (mP) of PB03
1	O111	<i>stx1</i>	55	5
2	O26	<i>stx1</i>	57	1
3	O26	<i>stx1</i>	60	8
4	O26	<i>stx1</i>	53	5
5	O111	<i>stx1</i> & 2	50	37
6	O157	<i>stx1</i> & 2	57	47
7	O157	<i>stx1</i> & 2	57	39
8	O157	<i>stx1</i> & 2	49	38
9	O157	<i>stx2</i>	-1	40
10	O157	<i>stx2</i>	7	40
11	O157	<i>stx2</i>	2	35
12	O157	<i>stx2</i>	2	39
13	O157	<i>stx2</i>	1	38

Genotype: Genotypes were determined in Hiroshima City Institute of Public Health by a conventional PCR method.

ΔP : The values indicate the difference between polarization of a probe in the presence of an amplified gene and a negative control.

検体では PB03 による測定で、 ΔP が 20 mP 以上で PB 235 による測定で、20 mP 未満であった。*stx1* & 2 が確認された検体ではどちらのプローブでも ΔP が 20 mP 以上であった。

食品における ΔP を Table 5 に示した。1 検体 (No. 16, 豚肉) を除くすべての検体において、*stx1* が確認されたテンプレートを追加した場合は PB235 による測定で ΔP が 20 mP 以上、PB03 による測定で 20 mP 未満

Table 5. Polarization values for typing of *stx* in various foods

No.	Sample name	Template	ΔP (mP) of PB235	ΔP (mP) of PB03
14	Beef	<i>stx1</i>	31	1
		<i>stx1</i> & 2	35	21
		<i>stx2</i>	12	35
15	Beef	<i>stx1</i>	58	2
		<i>stx1</i> & 2	39	36
		<i>stx2</i>	4	29
16	Pork	<i>stx1</i>	31	3
		<i>stx1</i> & 2	45	3
		<i>stx2</i>	10	26
17	Tomato	<i>stx1</i>	42	1
		<i>stx1</i> & 2	45	25
		<i>stx2</i>	1	22
18	Leek	<i>stx1</i>	44	4
		<i>stx1</i> & 2	50	30
		<i>stx2</i>	0	27
19	Cucumber	<i>stx1</i>	40	5
		<i>stx1</i> & 2	45	24
		<i>stx2</i>	6	27

Sample and template: A stored template was added with a *stx* negative food sample.

ΔP : The values indicate the difference between polarization of a probe in the presence of an amplified gene and a negative control.

であった。また、*stx2* が確認されたテンプレートを添加した場合は PB03 による測定で ΔP が 20 mP 以上、PB 235 による測定で 20 mP 未満であった。また、*stx1* & 2 型テンプレートを添加した場合は、どちらのプロープでも ΔP は 20 mP 以上であった。

考 察

蛍光偏光法を用いて *stx* を検出した結果、今回検討に用いた PB235 (*stx1* 検出用)、PB03 (*stx2* 検出用) のどちらのプロープを用いても、テンプレート中の菌量が 10^2 cfu 程度あれば *stx* を検出可能であった。これは汎用されているアガロースゲル電気泳動・臭化エチジウム染色の検出感度とほぼ同等の感度であった。

本法の検出感度は電気泳動と同様に、PCR 増幅効率に依存していると考えられるが、ヒト糞便や食品は試料中に様々な成分を含んでいるため PCR に影響を与えることもあり、増幅阻害が起こるだけでなく非特異産物の生成など電気泳動に影響を及ぼす場合もある。このような場合は電気泳動像で *stx* の有無を判定するのに困難を要する場合もある。一方、蛍光偏光法は、目的バンドと近い位置に非特異的なバンドが確認されるような場合でも、ハイブリダイゼーションの反応強度を数値で判定できる¹¹⁾という利点を有し、特異的に遺伝子の有無を判定できると考えられる。

STEC 陽性既知のヒト糞便 13 検体に本法を応用した

結果は広島市衛研で通常 *stx* 検出および遺伝子型別のために行われている電気泳動主体の確認法による結果と一致しており、本法によっても遺伝子型別可能であると考えられる。食品の場合も、加えた *stx* を良好に検出できたことから、本法を用いた遺伝子型別が可能であると考えられる。

本法を用いて遺伝子型別を行った結果、増菌培養後 35 サイクルの通常 PCR と 10 サイクルの非対称 PCR を行い、2 種類のプロープを用いて偏光度を測定する方法 (1 測定約 10 分) で簡易に判定可能であった。

液相中でのハイブリダイゼーションの有無を直接検出する蛍光偏光法は、固相法によるハイブリダイゼーションよりも迅速簡易であり、臭化エチジウムなど有害な試薬も使わないため、食品微生物検査での迅速検出法として適していると考えられる。

謝 辞

PB03 プロープの設計においてご協力くださいました西川ゴム工業(株)産業資材事業部の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Calderwood, S. B., Auclair, F., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G. T. and Mekalanos, J. J.: Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 4364-4368 (1987).
- 2) Erlich, H. A., Gelfand, D. H. and Saiki, R. K.: Specific DNA amplification. Nature, **331**, 461-462 (1988).
- 3) Gyllenstein, U. B. and Erlich, H. A.: Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the *HLA-DQA* locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 7652-7656 (1988).
- 4) 伊藤文明, 荻野武雄, 伊藤健一郎, 渡辺治雄: 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. 日本臨牀, **50**, 343-347 (1992).
- 5) 伊藤文明, 山岡弘二, 荻野武雄, 神辺眞之: 下痢原性大腸菌における PCR 法. 臨床病理, **43**(8), 772-775 (1995).
- 6) Jackson, M. P., Neill, R. J., O'Brien, A. D., Holmes, R. K. and Newland, J. W.: Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes 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) Karch, H. and Meyer, T.: Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., **27**, 2751-2757 (1989).
- 8) 厚生省生活衛生局: 腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について. 平成 9 年 7 月 4 日, 衛食第 207 号/衛乳第 199 号 (1997).
- 9) 大磯 勲, 保科定頼, 鶴岡 誠: 蛍光偏光法によるベロ毒素遺伝子の検出. 臨床病理, **46** (補冊), 265 (1998).
- 10) 鶴岡 誠: 光技術を応用したバイオセンサー. バイオエ

- レクトロニクス (軽部征夫, 民谷栄一編著), p. 62-78, 朝倉書店, 東京 (1994).
- 11) Tsuruoka, M., Yano, K., Ikebukuro, K., Nakayama, H., Masuda, Y. and Karube, I.: Optimization of the rate of DNA hybridization and rapid detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* DNA using fluorescence polarization. J. Biotechnol., **48**, 201-208 (1996).
 - 12) 鶴岡 誠, 本田武司, 軽部征夫: 蛍光偏光法の応用による Vero 毒素遺伝子の新しい迅速検出法の開発. 日本臨床, **55**, 741-746 (1997).
 - 13) Tsuruoka, M., Fukuhara, K., Murano, S., Okada, M., Honda, T. and Karube, I.: Rapid detection of the *Escherichia coli* verotoxin (VT2) gene using fluorescence polarization. Trends Anal. Life Sciences, **1**, 131-135 (1997). elec. publish. at <http://neo.pharm.hiroshima-u.ac.jp/tals/>
 - 14) Tsuruoka, M., Fukuhara, K., Murano, S. and Okada, M.: Rapid detection of DNA sequences of gene using fluorescence polarization. Nucleic Acids Symposium Series, **39**, 115-116 (1998).