

[原 著]

*uidA* と *stx1/stx2* を指標とした腸管出血性大腸菌の比率予測

北橋智子<sup>1)</sup>・吉原純子<sup>2)</sup>・島村亮子<sup>1)</sup>・大木旬子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 千葉市環境保健研究所

<sup>2)</sup> 千葉市保健所

(平成 27 年 11 月 6 日受付, 平成 28 年 6 月 2 日受理)

大腸菌の保有する  $\beta$ -グルクロニダーゼをコードする *uidA* を利用し, 糞便中の大腸菌に含まれる腸管出血性大腸菌 (EHEC) の割合が予測可能であるか検討した。既知量の EHEC 標準株及び *Escherichia coli* 株を混合し, リアルタイム PCR を利用し, 大腸菌が保有する *uidA* に対する *stx1/stx2* の割合 (Ct 値の差) を調べたところ, 実測値と近似であった。患者糞便で確認したところ, 大まかな予測に利用できる結果が得られ, 選択培地を利用できない稀な O 抗原型の腸管出血性大腸菌を効率的に分離することに利用可能であると考えられた。

**Key words:** *uidA*, *stx*, Ct 値, 腸管出血性大腸菌, リアルタイム PCR

序 文

$\beta$ -グルクロニダーゼは大腸菌が保有する酵素で, 合成蛍光酵素基質 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-グルクロニド (以下 MUG) を分解し, 紫外線照射下で青色の蛍光を発する。水質検査項目の 1 つである大腸菌 (*Escherichia coli*) 検査においては, 現在その性質を利用した方法が公定法として採用されている。*uidA* は  $\beta$ -グルクロニダーゼをコードする遺伝子で, *uidA* を増幅・検出することにより水や食品から迅速に大腸菌を判定する方法が報告されている<sup>1)2)</sup>。なお, 腸管出血性大腸菌 (以下 EHEC) O157 は遺伝子の一部が変化して  $\beta$ -D-glucuronidase の活性をもたないため, MUG 培地で蛍光を示さない菌が多い<sup>3)</sup>。

近年, EHEC は O157, O26 及び O111 以外の様々な O 抗原型が多く報告され, 中には cefixime, tellurite に感受性かつ酵素基質培地で EHEC 様色調を示さない O 抗原型も存在している。DHL 平板培地から大腸菌を釣菌する際に, 大腸菌に含まれる EHEC の割合が予測できれば, 効率的に検査を進める上で極めて有用である。

そこで, EHEC を分離するために必要な大腸菌の釣菌数を予測することを目的として, *uidA* を大腸菌の指標に, そして *stx1/stx2* を EHEC の指標に用い, *uidA* に対する *stx1/stx2* の割合, すなわちリアルタイム PCR で測定した Ct 値 (Threshold Cycle) の差が利用可能であるかを検討した。

材料と方法

1. 材料

国立感染症研究所から分与された EHEC 標準株 (O157:H7, *stx1*, *stx2* を 1 コピーずつ保有, 以下 Sakai 株) 及び当所に保存されていた病原性のない *E. coli* (O18:H-, *stx1*, *stx2* 非保有, 以下 Ec) の菌株を使用した。また, 当所に搬入された, 無治療で陰性化した EHEC 患者糞便 3 件 (軽症のため治療しなかった患者株 O157:H7 が 2 件及び無症候性保菌者株 O146:H21 が 1 件) を使用した。

2. *uidA* に対する *stx1/stx2* の割合 (Ct 値の差) と細菌数の相関性調査 (図 1)

(1) *E. coli* (Ec) 及び EHEC (Sakai 株), 各々をトリプトソイブロス (TSB) 3 mL に 37°C, 18 時間静置培養した。各々の培養液をリン酸緩衝希釈水 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> は 0.31 mM, 以下 PB) で 10 倍段階希釈し 10<sup>7</sup> 倍に希釈した希釈液 1 mL を標準寒天で 37°C, 18~24 時間混濁培養後, 菌数を計測した。また, 10<sup>1</sup>~10<sup>5</sup> 倍希釈液をリアルタイム PCR に供した。

著者連絡先: (〒261-0001) 千葉市美浜区幸町 1-3-9

千葉市環境保健研究所

北橋智子

TEL: 043-238-1900

FAX: 043-238-1901

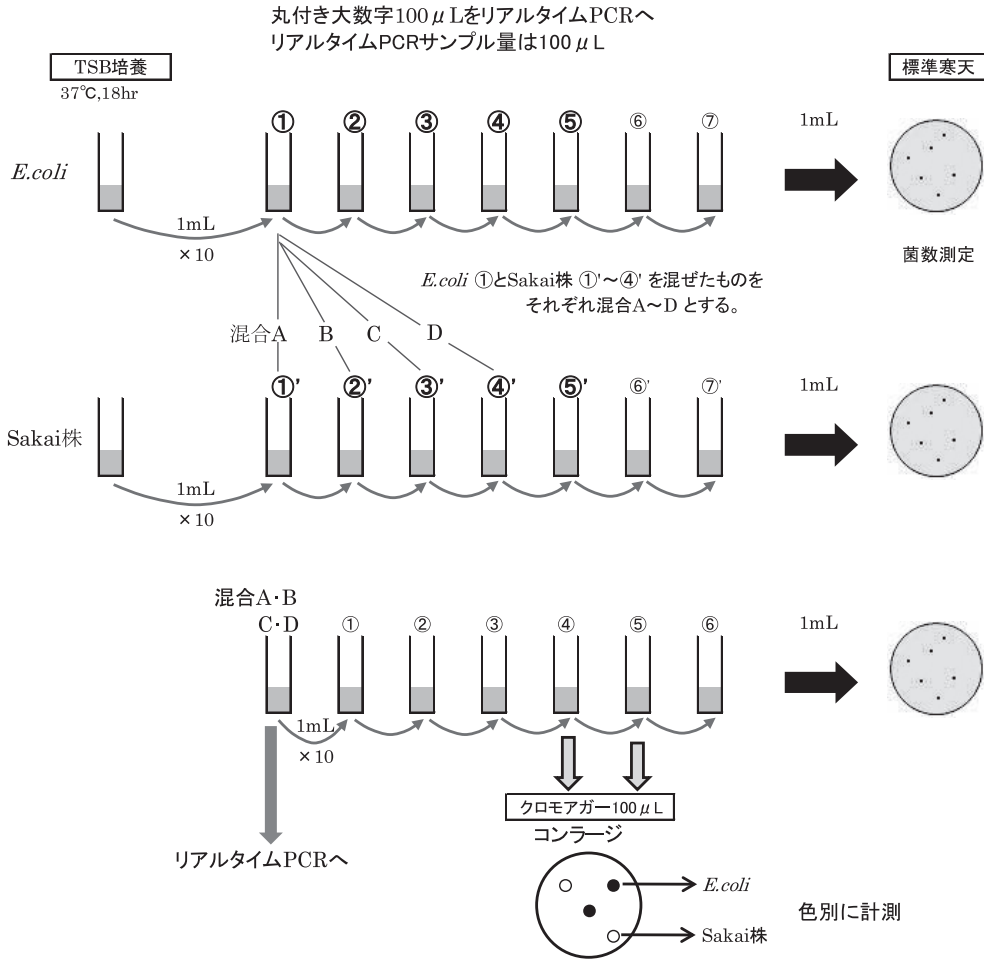


図1. 方法

なお、PBは食品衛生検査指針<sup>4)</sup>に従い、自家調製した。

(2) Ec培養液の $10^1$ 倍希釈液とSakai株培養液の $10^1 \sim 10^4$ 倍希釈液を等量混合したものを混合A~Dとし、リアルタイムPCRに供した。(1)と同様に、混合A~DをPBで $10^6$ 倍希釈した希釈液1mLを標準寒天で培養後、計測した菌数を実測数とした。また、前項(1)で計測したEc及びSakai株の $10^7$ 倍希釈液の菌数を基に希釈率を割り戻して計算した混合A~Dの菌数を推定数とした。

並行して、混合A~Dの $10^4 \sim 10^5$ 倍希釈液100 $\mu$ LをクロモアガーO157TAM(関東化学、以下クロモO157)平板培地に塗布・培養後、色調によりEc(紺色)とSakai株(藤色)のコロニー数を計測した。このEc(紺色)コロニーとSakai株(藤色)コロニー

の合計をSakai株コロニー数で除した数値を実測比とした。また、混合A~DをリアルタイムPCRで測定して得られた*uidA*のCt値(以下、*uidA*-Ct)と*stx1/stx2*のCt値(以下、*stx1/stx2*-Ct)の差を2の乗数 $[2^{(stx1/stx2-Ct-uidA-Ct)}]$ とした数値を推定比とし、推定比と実測比を比較した。

具体例を示すと、*uidA*-Ctが25、*stx1*-Ctが29の場合、Ct値差が4であることから推定比は $16(=2^4)$ 、すなわち大腸菌を16コロニー釣菌すればEHECを分離することができるかと予測できる。

### 3. リアルタイムPCR

サンプル100 $\mu$ Lを10,000 $\times g$ 10分遠心した沈渣から、厚生労働省の通知「腸管出血性大腸菌O26、O111及びO157の検査法について<sup>5)</sup>」に従い、アルカリ熱抽出法によりDNAを抽出した後、リアルタイムPCR

表1. *stx1*, *stx2* 及び *uidA* 検出プライマー及びプローブ

検出遺伝子	名称	配列 (5'-3')
<i>stx1</i>	VT1-F	GGATAATTTGTTTGCAGTTGATGTC
	VT1-R	CAAATCCTGTCACATATAAAATTATTTCTG
	VT1-P	VIC-CCGTAGATTATTAACCGCCCTTCTCTGGA-TAMRA
<i>stx2</i>	VT2-F	GGGCAGTTATTTTGTCTGTGGA
	VT2-R	GAAAGTATTTGTTGCCGTATTAACGA
	VT2-P	FAM-ATGTCTATCAGGCGGTTTTGACCATCTT-TAMRA
<i>uidA</i>	uidA-F	CAACGAAGTGAAGTGGCAGA
	uidA-R	TAGASCATTACGCTGCGATG
	uidA-P	VIC-ATCCGCGGGAATGGTGAT-TAMRA

を実施した。

また, *stx* の検出系は表1のとおりとした。

試薬は TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems 社: 以下 AB 社) を使用し, 機器は AB 社製 7300Real-Time PCR System を使用した。

反応条件は 50°C で 2 分, 95°C で 10 分を 1 サイクル, 次いで 95°C で 15 秒, 60°C で 1 分を 40 サイクル行った。

*uidA* の検出系は, PCR プライマー設計ソフト primer3 を使用し, プライマー及びプローブを設計した (表1)。

#### 4. 患者糞便での検証

患者便を DHL 培地に塗布し, 37°C, 18 時間培養後, DHL 培地のコロニー密集部分をエーゼでスワイプにより採取した菌塊から, 前述3と同様の方法で DNA をアルカリ抽出<sup>9)</sup>し, リアルタイム PCR で *uidA*-Ct 及び *stx1/stx2*-Ct を測定した。また, 同じ DHL 平板から大腸菌様コロニーを釣菌し, IMViC, O 抗原血清型別及び VTEC-RPLA (デンカ生研) を使用した Stx1/Stx2 産生試験により EHEC を鑑別した。

#### 5. 陰性化までの *stx1/stx2* 及び *uidA* の Ct 値差の推移

無治療で陰性化した患者便 2 検体について, リアルタイム PCR により *uidA*-Ct と *stx1/stx2*-Ct の差を経目的に測定した。うち 1 検体についてはノボビオシン加 mEC 培地 (極東製薬工業, 以下 N-mEC) で 42°C, 18 時間培養した増菌液 100 µL も同様に測定した。

### 結 果

#### 1. *E. coli* (Ec) 及び EHEC (Sakai 株) の細菌数と Ct 値の相関

Ec 培養液及び Sakai 株培養液における, 10<sup>7</sup> 倍希釈

液の菌数から計算した細菌数と 10<sup>1</sup>~10<sup>5</sup> 倍希釈液をリアルタイム PCR で測定した *uidA*-Ct または *stx1/stx2*-Ct の相関性を独立して 3 回調べたところ, 図2のとおり良好な直線性が得られた。また, Ec 及び Sakai 株の細菌数と *uidA*-Ct との相関性は高く, *uidA* は大腸菌数の指標として使用できると考えられた。Sakai 株の細菌数との相関について, *stx1*-Ct は *uidA*-Ct とほぼ重なったが, *stx2*-Ct は約 0.5 低値を示した。

#### 2. Ec 及び Sakai 株の混合状況 (標準寒天培地の細菌数)

Ec 培養液の 10<sup>1</sup> 倍希釈液と Sakai 株培養液の 10<sup>1</sup>~10<sup>4</sup> 倍希釈液を混合した混合 A~D は表2のとおり, 推定数と実測数に大きな乖離はなく, 正確に希釈されていた。

#### 3. Sakai 株 1 コロニーを得るために釣菌する大腸菌数 (クロモ O157TAM 寒天培地の細菌数)

Sakai 株 1 コロニーを得るために釣菌する大腸菌数は, 表3のとおりであった。

推定比と実測比には大きな乖離はなく, *stx1/stx2*-Ct と *uidA*-Ct の差から Sakai 株の比率を予測できた。Sakai 株の比率が低い混合 D での Sakai 株コロニーが検出できなかった 1・2 回目以外の実験で, 乖離は 3 倍以内に収まっていた。

#### 4. 患者便での検証: EHEC, 1 コロニーを得るために釣菌する大腸菌数 (DHL の細菌数)

当所に搬入された腸管出血性大腸菌 O157 患者便 2 検体 (イ・ロ) 及び腸管出血性大腸菌 O146 患者便 1 検体 (ハ) において, EHEC 1 コロニーを得るために釣菌する大腸菌数を調べたところ, 表4のとおり, 実測比から計算した割合と推定比に大きな乖離はなかった。

なお, 実測比は DHL 平板培地から釣菌した大腸菌

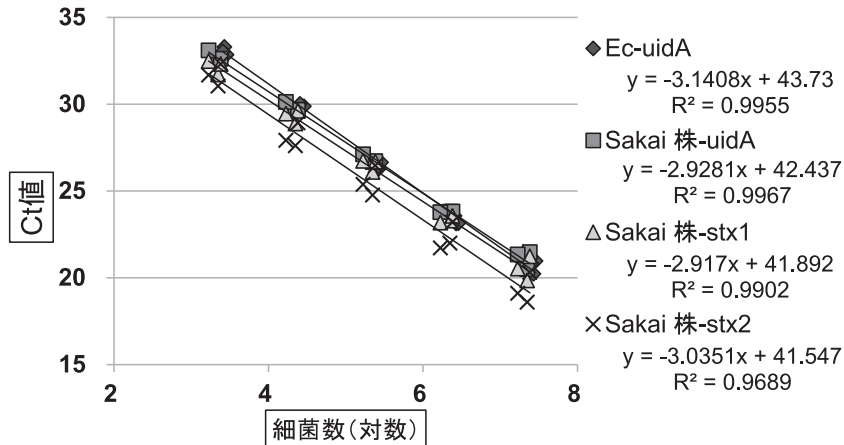


図2. 細菌数 (標準寒天培地) と Ct 値の相関

表2. Sakai 株と Ec の混合状況 (標準寒天培地の細菌数)

混合液 ( $10^6$ 倍希釈液)	1 回目		2 回目		3 回目	
	推定数	実測数	推定数	実測数	推定数	実測数
混合 A	246	248	264	230	212	257
混合 B	146	153	156	121	136	217
混合 C	136	125	145	105	129	148
混合 D	135	112	144	130	128	139

単位: cfu/mL

様コロニー数と、そのうち EHEC と同定されたコロニー数の比とした。

#### 5. 患者便における陰性化までの *stx1/stx2* 及び *uidA* の Ct 値差の推移

結果4の患者2名 (イ・ハ) について、無治療で陰性化までの *stx1/stx2*-Ct と *uidA*-Ct の差を調べたところ、図3-1及び図3-2のとおりであった。患者ハは、定期的な検便で感染が確認された健康保菌者であった。患者イの便の増菌液は、便を直接 DHL に塗布した本法に比べて Ct 値差が1~2大きくなる傾向があった (図3-1)。

#### 考 察

Ec 及び Sakai 株単独の希釈実験 (図1) における、細菌数 (標準寒天培地) と Ct 値の相関は、*stx1*-Ct 及び *uidA*-Ct はほぼ重なった直線だったが、*stx2*-Ct は約 0.5 低値を示した。この原因は、*stx2* 検出プライマーが *uidA* 及び *stx1* 検出プライマーに比べて Tm 値が高く反応効率が高いことが原因と思われる。*stx2*-Ct が *stx1*-Ct 及び *uidA*-Ct と重なった場合の菌数と

0.5 低値の場合の菌数は  $2^{0.5}$  ( $\approx 1.4$ ) 倍の差であると考えられ、プライマーの増幅効率及びプローブの反応効率は、株による差や検出遺伝子による差がないとして支障がないものと判断された (図2)。Ec 及び Sakai 株の混合実験において、推定比 [*stx1/stx2*-Ct と *uidA*-Ct の差から計算した全大腸菌 (Ec+Sakai 株) と Sakai 株の割合] と実測比 [混合液をクロモ O157 に培養した全コロニー数と藤色コロニー数 (Sakai 株) の割合] に大きな乖離はなく、リアルタイム PCR を使用することで、Sakai 株1コロニーを得るために釣菌する大腸菌数を予想できると考えられた (表3)。患者便においても、*stx1/stx2*-Ct と *uidA*-Ct の差から計算した推定比と DHL から釣菌した大腸菌数に含まれた EHEC 数の実測比に大きな乖離はなく、リアルタイム PCR を利用した EHEC の比率予測に有用であると考えられた (表4)。

*stx1* と *stx2* の推定比 (表3) を比べると、同じ実測比に対し *stx2* の方が推定比が小さい結果が得られた。これは、細菌数 (標準寒天培地) と Ct 値の相関 (図2) で予想されるとおりであり、腸管出血性大腸

表3. Sakai株1コロニーを得るために釣菌する大腸菌数（クロモ O157TAM 寒天培地の細菌数）

uidA と比較した 遺伝子	1回目：⑤*1		2回目：④*1		3回目：④*1		
	Ct 推定比	実測比 (実数*2)	Ct 推定比	実測比 (実数*2)	Ct 推定比	実測比 (実数*2)	
stx1	混合 A	2	2 (180/96)	2	2 (532/276)	1	2 (586/320)
	混合 B	10	8 (115/14)	12	6 (354/57)	8	6 (397/71)
	混合 C	94	96 (96/1)	98	37 (330/9)	56	39 (512/13)
	混合 D	724	119 以上 (119/0)	1226	440 以上 (440/0)	904	315 (315/1)
stx2	混合 A	1	2 (180/96)	1	2 (532/276)	1	2 (586/320)
	混合 B	5	8 (115/14)	7	6 (354/57)	3	6 (397/71)
	混合 C	44	96 (96/1)	53	37 (330/9)	24	39 (512/13)
	混合 D	375	119 以上 (119/0)	613	440 以上 (440/0)	345	315 (315/1)

\*1: 混合 A～D の方法 (図1) における希釈段階数

\*2: [Ec (紺色) コロニー数+Sakai株 (藤色) コロニー数]/Sakai株 (藤色) コロニー数

表4. 患者便における EHEC 1 コロニーを得るために釣菌する大腸菌数

	EHEC の Stx 型	EHEC の O 抗原型	Ct 値		Ct 値差の 推定比	DHL から釣菌した EC/EHEC	
			stx	uidA		割合	実測比
患者便 イ	Stx2	O157	19.04	15.71	10	34	103/3
患者便 ロ	Stx2	O157	15.55	15.98	1	1	20/19
患者便 ハ	Stx1	O146	17.25	16.41	2	2	36/21

菌の比率予測に *stx2* を指標とした場合は、より多くのコロニーを釣菌する必要があると思われた。

患者便での検証に DHL を使用した (表4) 理由として、①cefexime, tellurite に感受性かつ酵素基質培地で EHEC 様色調を示さない O 抗原型の EHEC が生える、②ラクトース陽性の典型的な大腸菌が DHL で「赤く乾燥した感じで中心に尖ったヘソがある」という特徴的なコロニー形状を示すことから大腸菌を選択釣菌することが容易であったからである。本実験では患者3人の EHEC 株が DHL で典型的なコロニー形状だったことから検証可能であったが、小林<sup>6)</sup>らが報告した異型性状株、特にラクトース陰性大腸菌は、DHL で大腸菌特有のコロニー形状を示さないため、早い検査段階での Stx1/Stx2 産生試験または *stx* の検出が重要であると考えられる。

筆者らは次の方法で、非常に少ない EHEC O157 を患者陰性化確認便から検出した経験がある。便を CT-SMAC 及びクロモ O157 に塗布・培養したところ、疑わしいコロニーは現れなかったが、CT-SMAC から方法4と同じ方法で *stx* を検出したため、CT-SMAC のコロニー密集部分を再度クロモ O157 に画線塗抹し培養したところ、藤色の EHEC O157 コロニーを分離することができた。このことから選択性の強い培地を

介することは、EHEC の濃縮に利用できるものと考えられる。CT (cefexime, tellurite) 耐性 EHEC は CT 含有培地での培養を介し DHL に画線塗抹することにより、EHEC を濃縮できることが推測される。

小林ら<sup>6)</sup>、Fukushima ら<sup>7)</sup>は、ほとんどの EHEC が *hlyA* を持っていることを報告している。更に、小林ら<sup>6)</sup>は、E-*hly* 培地は CT の感受性によらず異型性状 EHEC 分離に有効である可能性を示唆している。CT 耐性の異型性状 EHEC は、CT 含有培地での培養を介し、E-*hly* 培地に再塗抹することにより、更に分離率が上がる可能性がある。

1990年代は腸管出血性大腸菌感染症には抗生物質を投与する治療が主流であったが、抗生物質の投与が症状を悪化させる報告<sup>8)</sup>もあり、最近では抗生物質を投与しない方針も見受けられる。その方針の患者2名において、無治療で陰性化するまで *stx1/stx2*-Ct と *uidA*-Ct の差について経日の推移を調べたところ、患者ハは徐々に Ct 値差が大きくなって陰性化した (図3-2)。一方、患者イは Ct 値差に増減があり (図3-1)、差が大きくなった時の *stx2*-Ct は 39.90 で、陽性とするか陰性とするか迷う値であった。これを陰性と判断しても翌日には明らかな陽性になったが、これは一度陰性化しても陽転することがあるという報告<sup>10)</sup>に反し



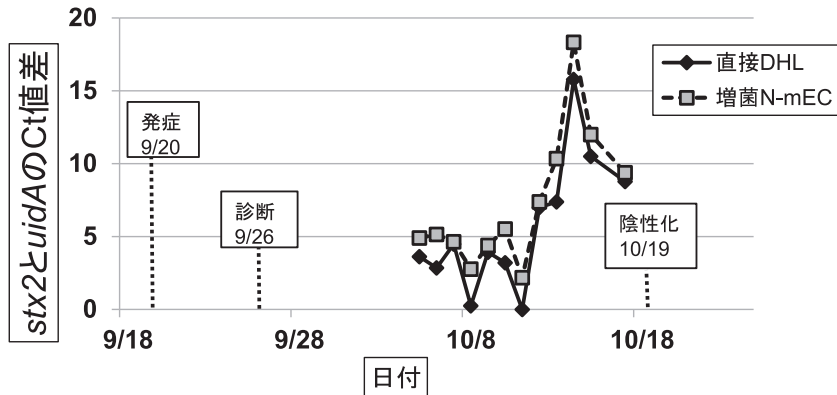


図 3-1. 患者イの陰性化までの *stx2* 及び *uidA* の Ct 値差の推移

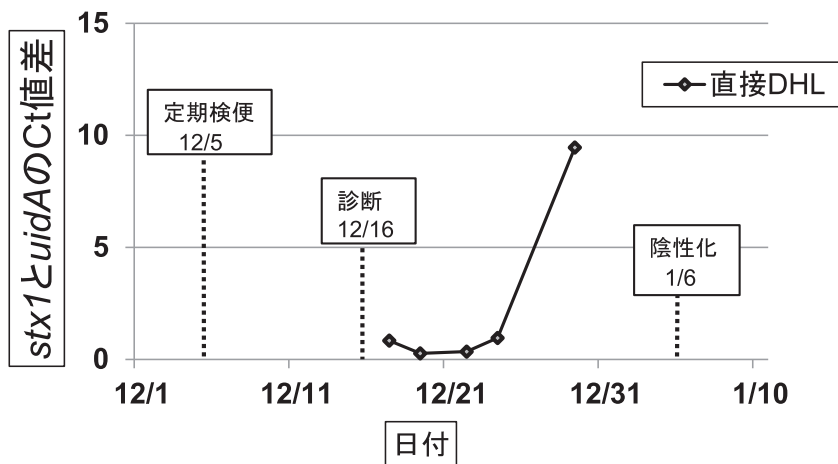


図 3-2. 患者ハの陰性化までの *stx1* 及び *uidA* の Ct 値差の推移

ない結果であった。この患者イについて、N-mEC 増菌液と直接 DHL に塗布した本法を比べたところ、N-mEC 増菌液の方が Ct 値差で 1~2 大きくなる傾向があり (図 3-1)、増菌で EHEC は増えているものの、大腸菌中の EHEC 割合は低くなる傾向があると考えられた。

保健所での腸管出血性大腸菌患者の陰性化確認検便及び接触者検便は、医療機関から原因菌に関する届出がされているため、その O 抗原型の EHEC についてのみ検査を実施しているところである。しかし、患者ハの届出は「O 抗原型不明の腸管出血性大腸菌」であったため、使用すべき培地・検索法が不明であった。そこで、本稿の方法を利用することにより *stx1/stx2*-Ct と *uidA*-Ct の差から EHEC を分離するための釣菌数

を予測し、効率的に釣菌でき、EHEC O146 を同定できた。なお、原因の EHEC O146 はクロモアガー STEC (関東化学) にコロニーを形成せず、クロモ O157 に紺色コロニー、CT-SMAC に赤いコロニーを形成した。

*stx* を 2 コピー以上有する腸管出血性大腸菌もあるため解釈には十分な注意が必要であるものの、cefixime, tellurite に感受性かつ酵素基質培地で EHEC 様色調を示さない O 抗原型の腸管出血性大腸菌感染症患者からの釣菌作業に、*uidA* と *stx1/stx2* を指標とした EHEC の比率予測が有用であると考えられた。

謝辞：本研究にあたり、国立感染症研究所細菌第一

部の伊藤健一郎氏に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は平成26年度第53回千葉県公衆衛生学会（千葉市，2015年2月）において発表した。

**利益相反：**申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) Bej, K.A., S.C. McCarty, R.M. Atlas. 1991. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (8): 2429-2432.
- 2) 勝山陽子, 井上智実, 中村静夫, 他. 2006. 食品微生物の迅速検査方法. 石川県工業試験場研究報告 56: 63-68.
- 3) Cebula, A.T., W.L. Payne, P. Feng. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 248-250.
- 4) 小久保彌太郎, 浅尾 努. 2015. 第一章 総論 6. 微生物試験における検体の取扱い・試料の調製. p. 82-86. 食品衛生検査指針微生物編 2015 (発行人 鶴飼良平), 日本食品衛生協会.
- 5) 腸管出血性大腸菌 O26, O111 及び O157 の検査法について. 平成 24 年 12 月 17 日食安監発 1217 第 1 号, [http://www.hourei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t\\_docframe2.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=SEARCH&SMODE=NORMAL&KEYWORD=%92%b0%8a%c7%8f%6f%8c%8c%90%ab%91%e5%92%b0%8b%db%81%40%8c%9f%8d%b8%96%40&EFSNO=8535&FILE=FIRST&POS=0&HITSU=11](http://www.hourei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t_docframe2.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=SEARCH&SMODE=NORMAL&KEYWORD=%92%b0%8a%c7%8f%6f%8c%8c%90%ab%91%e5%92%b0%8b%db%81%40%8c%9f%8d%b8%96%40&EFSNO=8535&FILE=FIRST&POS=0&HITSU=11). 平成 27 年 12 月 15 日現在.
- 6) 小林 治, 磯崎将博, 北川真喜, 他. 2015. 1990 年から 2012 年までに分離された腸管出血性大腸菌の臨床微生物学的特徴. *日臨微誌* 25: 34-41.
- 7) Fukushima, H., K. Hoshina, M. Gomyoda. 2000. Selective Isolation of *eae*-Positive Strains of ShigaToxin-Producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1684-1687.
- 8) Su, C., L.J. Brandt. 1995. *Escherichia coli*. O157: H7 Infection in Humans. *Ann Intern Med.* 123: 698-714.
- 9) 樋上 忍, 西本佳代, 川村智行, 他. 1998. 腸管出血性大腸菌 O157 による出血性大腸炎に対する抗生物質投与と HUS 発症頻度の検討—平成 8 年 7 月の大阪府での集団大発生におけるアンケートより—. *感染症学雑誌* 72 (3): 266-271.
- 10) 太田正樹, 一色 学, 水本雅彦. 2001. 抗菌剤投与後, 再び便中に排菌した腸管出血性大腸菌感染症の症例. *IASR* 22: 196-197.

## Existence ratio of enterohemorrhagic *E. coli*, estimated using the ratio of the *uidA* to *stx1/stx2* genes as an indicator

Tomoko Kitahashi<sup>1)</sup>, Junko Yoshihara<sup>2)</sup>, Ryoko Shimamura<sup>1)</sup>, Junko Ohki<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Chiba City Institute of Health and Environment

<sup>2)</sup>Chiba City Public Health Center

The existence ratios of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) to other *Escherichia coli* species were estimated in feces using the *uidA* gene encoding  $\beta$ -glucuronidase as an indicator. The *uidA* and *stx1/stx2* genes existed at comparable ratios (differences in Ct values), as determined by real-time PCR using a mixture of equal amounts of EHEC reference and *Escherichia coli* strains. Thus, our method can be applied to isolate EHEC (O-antigens), for which selective media cannot be employed.