

リアルタイム PCR による腸管出血性大腸菌の  
検出およびロシアと日本における  
腸管出血性大腸菌感染症の比較

カンドレン コンスタンチン  
クラスノヤルスク医科大学 4 年

長谷川 奏恵・藤島 基宣・中牟礼 道秀  
新潟大学医学部 3 年

中川 沙織・滝沢 陽子・岩倉 信弘  
種池 郁恵・山本 達男  
指導：細菌学教室

Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)  
by Real Time PCR and Comparison of Episodes  
of EHEC Infections in Russia and Japan

Kandlen KONSTANTIN

*Krasnoyarsk State Medical Academy*

Kanae HASEGAWA, Motonobu FUJISHIMA and Michihide NAKAMURA

*Niigata University School of Medicine*

Supervisor: Saori NAKAGAWA, Yoko TAKIZAWA, Nobuhiro IWAKURA  
Ikue TANEIKE and Prof. Tatsuo YAMAMOTO

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*  
*Department of Bacteriology*

Reprint requests to: Prof. Tatsuo YAMAMOTO  
Division of Bacteriology  
Department of Infectious Disease  
Control and International Medicine  
Niigata University Graduate School  
of Medical and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座  
細菌学分野 山本達男

## Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC; alternatively called Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) belonging to a serotype, e.g., O157:H7 is an emerging cause of food-borne infections. It produces Shiga toxin, and causes hemorrhagic colitis and serious systemic disorders such as hemolytic uremic syndrome (HUS) with very negative prognosis. That's why rapid diagnosis is very important and it can be made by identification of Shiga toxin either by serological or DNA analysis. In this study, we investigated an EHEC mechanism of cell-infection by scanning electron microscopy. We also developed a rapid diagnosis method for EHEC with use of real time PCR assay, and compared cases (including treatment) of EHEC O157:H7 infections in Russia (Tula region) and Japan.

## はじめに

腸管出血性大腸菌(別名,志賀毒素産生大腸菌)は,志賀毒素(Shiga toxin, Stx;別名ペロ毒素,VT)を産生し,腸管出血性大腸炎などの腹部症状の他に,溶血性尿毒症症候群(HUS)などの予後不良な合併症の原因となる<sup>1)2)</sup>.腸管出血性大腸菌は1982年に米国で発見された新興病原菌である.わが国でも1996年(平成8年)に世界最大規模の流行が発生している.腸管出血性大腸菌の主要な血清型はO157:H7で,自然界での保有動物はウシであると考えられている.食品媒介感染症(食中毒)の主要な原因の一つである<sup>1)2)</sup>.腸管出血性大腸菌感染症では迅速な診断が重要で,polymerase chain reaction(PCR)診断法や血清学的な診断法などが用いられている.本実験ではより簡便に,迅速に腸管出血性大腸菌を診断するために,蛍光色素サイバークリーン(SYBR green)を用いたreal time PCR法<sup>3)</sup>によって志賀毒素遺伝子を検出した.また,細胞感染メカニズムを解析したほか,ロシアにおける腸管出血性大腸菌感染症を調査し,日本の感染事例と比較検討した.

## 方 法

菌株:腸管出血性大腸菌(血清型O157:H7)として,平成8年に堺市で起きた流行で分離されたStx1とStx2を産生する菌株を用いた.対照株として,毒素非産生大腸菌(血清型O157)を用いた.電子顕微鏡解析:腸管出血性大腸菌をHCT-

8細胞に3~6時間感染させ,常法に従って固定・乾燥後,走査型電子顕微鏡で観察した.DNAの分離:腸管出血性大腸菌をLBブロス(Difco)で一晩培養後,遠心によって菌体を得,QIAamp DNAMini Kit(Qiagen)を用いてDNAを抽出した.生菌数の測定:PBSで希釈後,普通寒天平板を用いて測定した.Real time PCR:ABI 7900 HT sequence detector(ABI)を用いて,マニュアルに従って行った<sup>4)5)</sup>.蛍光色素としてサイバークリーン(ABI)を用いた.志賀毒素1(Stx1)遺伝子の検出のためのプライマーは,VT1-u(5'-GCAGTTCGTGGCAAGAGC)とVT1-d(5'-GCGTCGCAGCGCACTTG)であった<sup>6)</sup>.

## 結 果

腸管出血性大腸菌の培養細胞への粘着(感染)は特異的で,細胞膜を強く変性させた(図1).

Stx1遺伝子をもつ腸管出血性大腸菌をサイバークリーン・real time PCR法で解析したところ,ベースライン以上の蛍光(DNAフラグメントの増幅)が検出され,陽性と判定された(図2).蛍光の検出は,腸管出血性大腸菌の菌数に依存的で,少なくとも $10^4$ /mlまで検出が可能であった.一方,Stx非産生株の場合には,蛍光レベルはベースライン以下で,陰性であった.

## 考 察

腸管出血性大腸菌はタイプⅢ分泌システムで細胞感染し,Stxを産生して発症させる<sup>1)2)</sup>.感染の

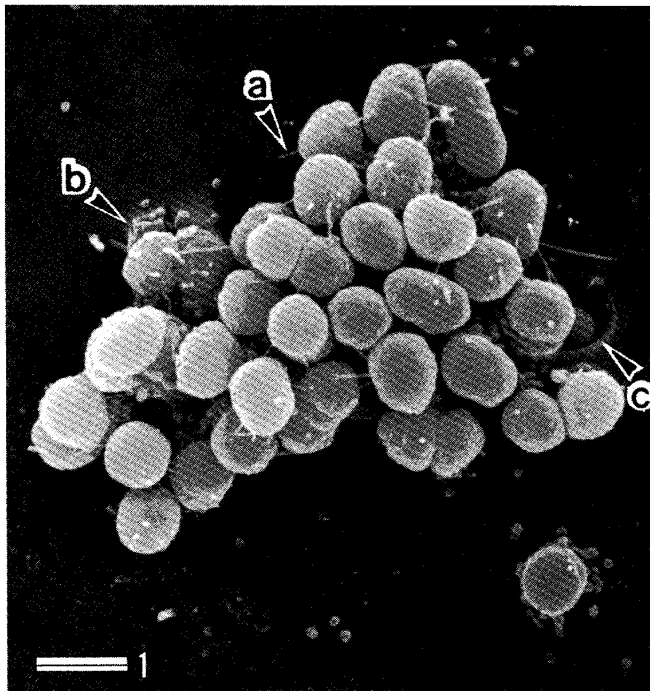


図1 腸管出血性大腸菌の培養細胞への感染  
(走査型電子顕微鏡像)

培養細胞 (HCT-8 細胞) 表面への粘着を観察 (数字  $\mu\text{m}$ ) した。a, EHEC の線毛； b, 細胞膜との相互作用； c, 細胞膜へのめり込み。

電子顕微鏡解析で、細胞への感染では、細胞膜を変化させることを確認したが、これは腸管出血性大腸菌がもつタイプ III 分泌システムによって細胞骨格系タンパクが変化したためであると考えられた。

Real time PCR では、通常プライマーと蛍光標識したプローブを設計し、反応に用いる<sup>4)5)</sup>。しかし、プローブの設計は高価であるので、本研究では、プライマーのみをもちい、増幅した DNA フラグメントを蛍光 (サイバークリーン)<sup>3)</sup> によって標識することでリアルタイムに検出した。Real time PCR は通常の PCR より短時間で結果を出すことができる。検出感度の改善が問題点として残されたが、菌数が多い場合には、本法で比較的安価に、かつ迅速に診断することが可能である。

腸管出血性大腸菌感染症は、米国で見いだされたもので、わが国やヨーロッパでも重要視されている。ロシアの場合には、報告例は紹介されてな

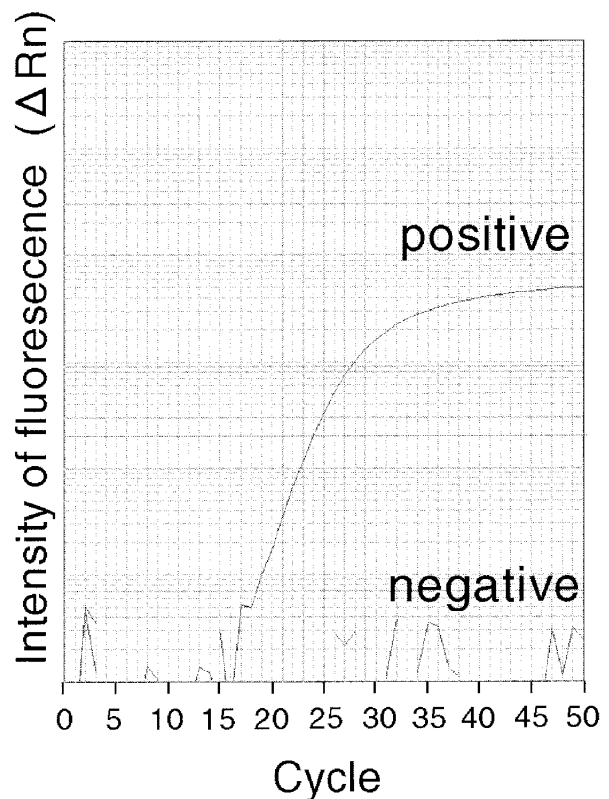


図2 サイバークリーンを用いた real time PCR による腸管出血性大腸菌 (Stx1 産生菌) の検出

かった。しかし、1998 年の夏、ロシアのトゥーラ (Tula) 地方 (図3) で、子供が参加した夏休みのキャンプで感染が起こっていたことが分かった。症状は、急速に悪化した。特徴的な初期症状は、胃痛、下痢、腹部膨満、発熱 ( $37.8 \sim 38.2^\circ\text{C}$ )、出血性腸炎であった。患者 (子供) は感染症専門病院に運ばれ、腸管出血性大腸菌 (血清型 O157: H7) が分離されて腸管出血性大腸菌感染症と診断された<sup>7)</sup>。患者 (子供) は、無菌隔離病室に移され、抗菌剤、鎮痛剤、ビタミン剤による治療を受けた。

抗菌薬はアジスロマイシンで、1 日目は  $0.5 \text{ g}$  1 日 1 回、2 ~ 5 日目は  $0.25 \text{ g}$  1 日 1 回を食前または食間に投与した。対症療法として乳酸菌製剤とビタミン B が経口投与された。患者の症状は改善した。

ここで使用された抗菌薬アジスロマイシンは、新しい腸管出血性大腸菌感染症治療薬として新潟

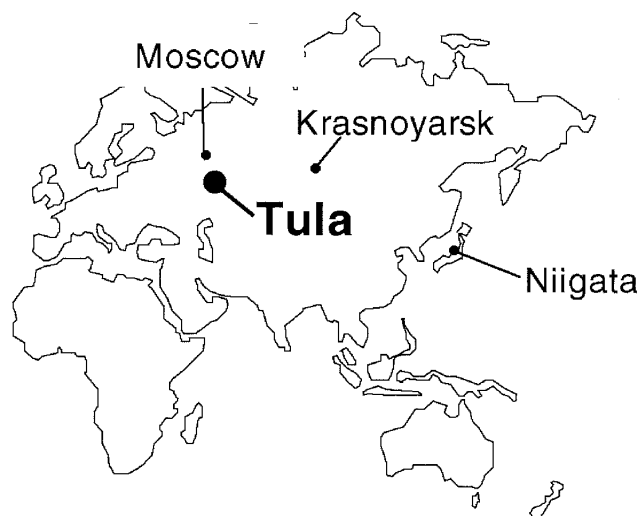


図3 ロシアでの腸管出血性大腸菌感染症の発生（トゥーラ地方）

大学医学部細菌学教室が提案してきた抗菌薬であった<sup>8)</sup>。なお、わが国で現在推奨されている抗菌薬はホスホマイシンで、発症後3日以内の投与が有効であると考えられている<sup>9)</sup>。抗菌薬の有効性については、さらに検討が必要である。

## 文 献

- 1) Nataro JP and Kaper JB: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11: 142-201 1998.
- 2) Kaper JB and O'Brien AD: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp1-465 1998.
- 3) Rantakokko-Jalava K and Jalava J: Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. J Clin Microbiol 39: 2904-2910 2001.
- 4) Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W and Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl 4: 357-362 1995.
- 5) Iwaya A, Nakagawa S, Iwakura N, Taneike I, Hatakeyama K and Yamamoto T: Nosocomial outbreak-derived *Serratia marcescens*: Rapid and quantitative detection of the agent in the blood by a real time PCR assay. Acta Med Biol 50: 185-190 2002.
- 6) 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.
- 7) Popova TA, Sypchenko AI, Korneeva NM, Bezobrazova SV, Prokop'eva LS and Shishkina LI: Isolation of *E. coli* O157:H7, the causative agent of acute enteric infections with hemolytic-uremic syndrome in the Tula region. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 5: 115-116 2000.
- 8) Ohara T, Kojio S, Taneike I, Nakagawa S, Gondaira F, Tamura Y, Gejyo F, Zhang HM and Yamamoto T: Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. Antimicrob Agents Chemother 46: 3478-3483 2002.
- 9) 腸管出血性大腸菌感染症の診断治療に関する研究班(班長 竹田美文): 一次, 二次医療機関のための腸管出血性大腸菌(O157等)“感染症治療の手引き”(平成9年改訂版), 厚生省, 1997.  
(平成15年8月12日受付)