

【資料】群馬県における O-genotyping 法の検討結果

長谷川駿 高橋裕子 下田貴博 遠藤るい 塚越博之 猿木信裕

Evaluation of the O-genotyping Method in Gunma Prefecture

Shun HASEGAWA, Hiroko TAKAHASHI, Takahiro SHIMODA, Rui ENDO, Hiroyuki TSUKAGOSHI,
Nobuhiro SARUKI

1.はじめに

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、ベロ毒素（VT）を產生または vt 遺伝子を保有している大腸菌による感染症である。EHEC におけるO血清型の決定は、同一起源から分離したクローン集団を予測する手がかりとなり、集団発生調査において重要な情報となる。EHEC の O 血清型は多様化しており、抗血清を用いた検査（抗血清法）で型別不能（OUT）になることも多くなっている。そこで、近年はO血清群 PCR 検査法（O-genotyping PCR 法）も広く使用されるようになってきている。しかし、O-genotyping PCR 法では 20 種類のプライマーミックスを使用して 162 種類の O 血清型を判別するため、コストや作業効率の面で改良の余地があると考えられる。そこで、O-genotyping PCR 法の作業効率化を目的とし、群馬県の届出状況に沿った O-genotyping PCR 法を検討したため、その結果について報告する。

2.対象および方法

2.1 対象 EHEC 血清型

2019 年から 2023 年にかけて群馬県内において EHEC 感染症で OUT として届出された 88 株 (18.6%) を対象とし、その中でも複数回報告があった 14 種類の血清型 (O172、O156、O84、O91、O113、O176、O181、O148、O174、O186、O76、O8、O88、O9) を対象とした。

2.2 O-genotyping PCR 反応系

それぞれの PCR 用プライマーは、Tm 値 (Tm Calculator for Primers) や PCR 産物の大きさ、それぞれの反応系におけるプライマーダイマーの形成 (Multiple Primer Analyzer) についても確認した。マルチプレックス PCR 反応は、対象株から抽出した DNA を Emerald Amp PCR

Master Mix (Takara Bio) を用いて、国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所の病原体検出マニュアル (国立健康危機管理研究機構、2025) に準じて実施した。PCR 反応後は、アガロースゲル電気泳動にて、バンドのサイズを確認し、標的遺伝子の増幅および反応特異性について確認した。

3.結果および考察

対象となる血清型での PCR 産物の大きさ (bp) および Tm 値をもとに 3 種類のマルチプレックス PCR 系に分けた (表 1)。それぞれの PCR 系におけるプライマーダイマーについて解析を行ったところ、Multiplex I では 2 組のプライマー間でプライマーダイマーの形成が予測された。Multiplex II では 3 組、Multiplex III では 2 組のプライマー間でのプライマーダイマーの形成が予測されたが、3 種類のマルチプレックス PCR 反応を行ったところ、すべての血清型で増幅が確認され、非特異的な反応もなく良好な反応であることが分かった (図 1)。

このことから、O-genotyping PCR 法は、プライマーの組み合わせを状況に応じて変えることができ、自由度が高いことが考えられた。県内の EHEC 感染症の届出状況は今後変化する可能性があることから、状況に応じて、プライマーの組み合わせを変更することで、効率的な検査体制に繋げていける可能性がある。

4.まとめ

本報告では OUT 株への対応策として群馬県の届出状況に基づき、O-genotyping PCR 法の効率化を試みた。複数回報告のあった 14 種類の血清型に対する、マルチプレックス用のプライ

マーミックスを作成した結果、3種類のプライマーマーミックスの組み合わせによる検出が可能であることが確認された。本反応系を用いることで、OUT株として届出された菌株の約60%が型別可能になると考えられる。また、検査対象を絞り込むことにより、O-genotyping PCR法に用いるプライマーの本数を従来の20種類から3種類に削減することができ、作業効率の向上に寄与した。

今後は、県内の発生動向の変化に合わせ、柔軟にプライマーの組み合わせを見直すことで、効率的な検査体制を構築していきたい。

謝辞

解析に御協力いただきました国立健康危機管理研究機構の皆様、検体採取及び調査等に御協力いただきました県内医療機関並びに保健所の皆様に深謝いたします。今後も迅速な菌株解析及び情報共有に努めていくので、引き続き関係機関の御理解と御協力をお願いします。

文献

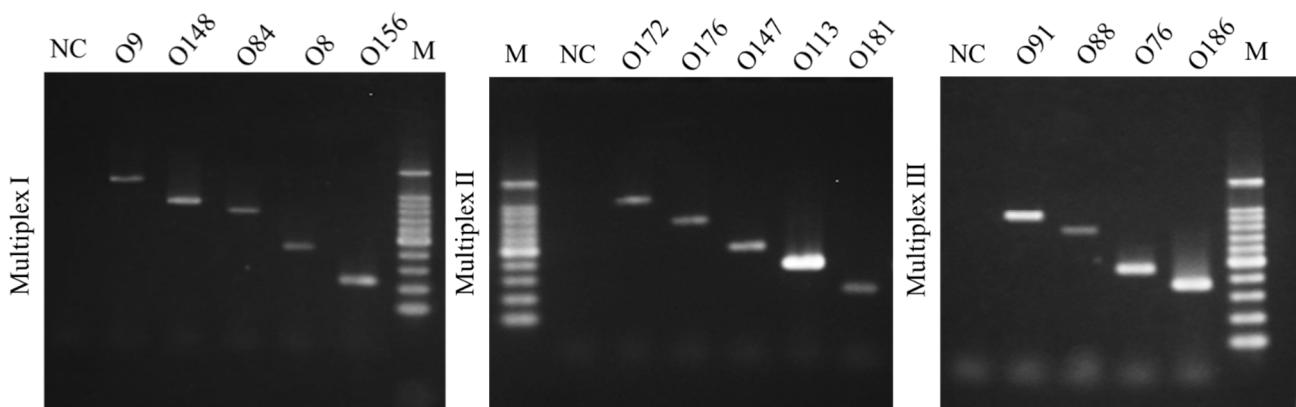
国立健康危機管理研究機構. 病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌(EHEC)検査・診断マニュアル 2025年6月改訂版」
<https://info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/EHEC20250619.pdf>
(2025年8月閲覧)

Thermo Fisher. Multiple Primer Analyzer
<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>

(2024年7月閲覧)

Thermo Fisher. Tm Calculator for Primers
<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

(2024年7月閲覧)



NC : Negative control
M : Marker (100bp ladder)

図1 マルチプレックスPCR泳動像

表 1 プライマーミックス配列

Multiplex	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Tm 値 (°C)
I	Og9-PCR_F	CGTCGGCAAGGCGTATAAATA	1235	56.9
	Og9-PCR_R	CCCAGAAATCCATGCTC		55.4
	Og148-PCR_F	TGGCAACCATTGTCTGCA	865	60
	Og148-PCR_R	CCCCAAGCCCCATAATAGTAA		58.7
	Og84-PCR_F	GTTGGCATATCAATTGGGGTT	775	57.7
	Og84-PCR_R	CGTTCCAAGAACGACTCCAGT		62
	Og8-PCR_F	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG	448	57.2
	Og8-PCR_R	GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG		59.9
	Og156-PCR_F	GGAAAATGGAACATTAGCGG	236	56.7
	Og156-PCR_R	TCGGAGTGCCAACCAAAAATA		58.9
II	Og172-PCR_F	TGGGGGTGTGGTATGTTTT	1108	58.7
	Og172-PCR_R	AATGCTCCCTTGAATCCTGTT		58.5
	Og176-PCR_F	TTGGCGTGCCAGGTATATATC	809	59
	Og176-PCR_R	TGACAGAGCTATCCCACCTTGA		59.7
	Og174-PCR_F	CGGAAGTCGGACTGCTATTT	541	59.5
	Og174-PCR_R	TATGTGACCTAGCACACCCAA		60
	Og113-PCR_F	GCATGTATGATGCATAGCTTCGCC	419	63.2
	Og113-PCR_R	TGATATCGTCGCTAACCAACCCAA		62.4
	Og181-PCR_F	AGGACTCCGATTACTACCGC	261	61.2
	Og181-PCR_R	ACAGCGAATGCAACAATTGG		58.6
III	Og91-PCR_F	GCCTGCGATACCAAGTATCCTT	953	61.5
	Og91-PCR_R	CCCCCATAATTGGGATCATAT		55.9
	Og88-PCR_F	CTGCGCTTGGAGCATTCTAT	781	60
	Og88-PCR_R	GGCGCGAAACTTCATATGC		60.1
	Og76-PCR_F	TGGCTTTATGGCGATATGTG	457	57.3
	Og76-PCR_R	TTGTGAGTATAAGCCCCCAA		60.5
	Og186-PCR_F	TTTCAACAGGTTCGAATGCC	362	58.2
	Og186-PCR_R	CCCACCAATACCACTGGAATA		58.5