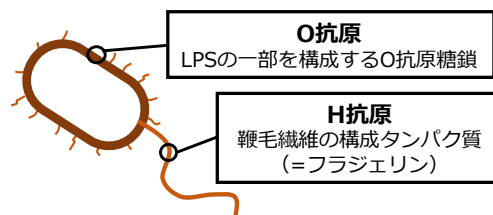


***E. coli* Og/Hg-typing PCR の概要と詳細 (2024.7.24Ver)**

大腸菌の O 血清群（以下、O 群と略す）と H 型は、それぞれに特有な遺伝子または塩基配列を標的とした PCR 法により型別することができる。本稿の前半（a～e）では血清型と PCR 法の概要を、後半（f～k）では判定原理や応用法などの詳細を解説する。

a) 血清型の種類

大腸菌の血清型（serotype）は、O 群（O-serogroup）と H 型（H-type）を組み合わせた「O : H」により表される。O 群と H 型は、それぞれ菌体表層に発現する LPS の一部を構成する O 抗原糖鎖（O 抗原）と、運動器官である鞭毛の繊維部分を構成するタンパク質・フラジリン（H 抗原）の構造的な多様性を免疫学的に識別したときの分類である（図 A）。



図A. O抗原とH抗原

大腸菌の血清型は、現在のところデンマーク国立血清学研究所（Statens Serum Institute : SSI）により、O1 から O188 までの O 群（185 種類）と、H1 から H56 までの H 型（53 種類）が国際的に定められており、その組み合わせは計算上 9,800 パターンを超える（表 A）。本法は大腸菌を種内で細かく分類できることから、疫学的に関連性のある分離株間で血清型が同じであった場合は、同一起源から分岐して間もないクローン株であると推測できる。また、疫学的な関連性の無い場合でも同じ血清型であった場合は、共通祖先から分岐した（共通するゲノム構造や病原性を保持する）近縁株であると予想できる。このような背景から、血清型別（または O 群分類）は病原性大腸菌の集団感染事例や流行型の調査、分離株の整理などに用いられ、報告書や論文においても分離株の特徴として血清型別の結果を付けることが一般化している。

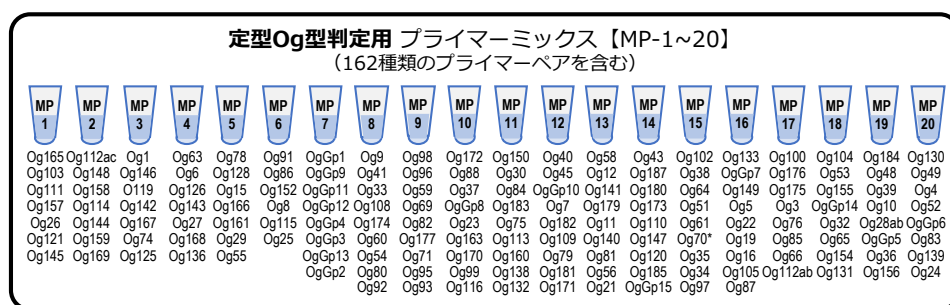
表A. O群とH型の種類

血清型分類	標的抗原	種類	備考
O群	O抗原	O1 – O188 (185種類)	亜型 : O18ab/ac, O28ab/ac, O112ab/ac 欠番 : O31, O47, O67, O72, O94, O122
H型	H抗原	H1 – H56 (53種類)	欠番 : H13, H22, H50

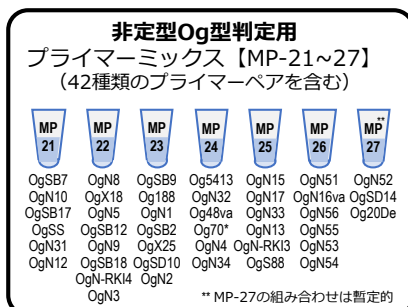
ただし、SSI が提供する完全タイピング用の抗血清をそれぞれの検査室や研究機関で揃えることは経済的に難しく、分離株の詳細な血清型を判定できない場合がある。近年、血清型別の代替法として利用できる PCR 法が開発されており、比較的安価で広域な型別が可能となっている。本マニュアルでは、大腸菌の血清型を型別できる PCR 法について解説する。

b) *E. coli* Og-typing PCR の概要

それぞれの O 群に特有な塩基配列を標的としたプライマーにより、O 群に対応した遺伝子型 (O-genotype = Og 型) を PCR 法 (*E. coli* Og-typing PCR) で判定できる。現在、O1 から O187 に対応した 162 種類の定型 Og 型と、上記以外の 42 種類の非定型 Og 型を判定できるプライマーペア (全 204 種類)、さらに、それらを組み合わせた 27 種類のプライマーミックス (MP-1 から 27) によるマルチプレックス PCR 法が利用できる (図 B)。



*MP-15内のOg70判定用プライマーでは一部のOg70が判定できないことが判明したため、MP-24内にすべてのOg70を判定できるプライマーを追加

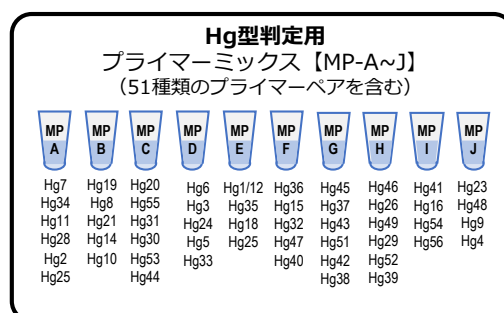


図B. *E. coli* Og-typing PCRの
マルチプレックスPCR用プライマーミックスの組み合わせ

プライマー配列と産物サイズ、プライマーミックスの組み合わせと調整方法等は別表に示す。
EHEC に関連する主要 7 種類の Og 型（Og26、Og103、Og111、Og121、Og145、Og157、Og165）の判定プライマーは MP-1 に集約している（図 B）。

c) *E. coli* Hg-typing PCR の概要

それぞれの H 型に特有な塩基配列を標的としたプライマーにより、H 型に対応した遺伝子型（H-genotype=Hg 型）を PCR 法（*E. coli* Hg-typing PCR）で判定できる。現在、H1 から H56 に対応した 51 種類の Hg 型を判定できるプライマー、さらに、それらを組み合わせた 10 種類のプライマーミックス（MP-A から J）が利用できる（図 C）。



図C. *E. coli* Hg-typing PCRの
マルチプレックスPCR用プライマーミックスの組み合わせ

プライマー配列と産物サイズ、プライマーミックスの組み合わせと調整方法等は別表に示す。
EHEC では運動性が無く H-と判定される菌株も多いが、標的配列がゲノム上に残っていれば本来の H 型に相応な Hg 型が判定できる（詳細は後述する）。EHEC に関連する主要な 11 種類の Hg 型（Hg2、Hg7、Hg8、Hg10、Hg11、Hg14、Hg19、Hg21、Hg25、Hg28、Hg34）の判定プライマーは、MP-A と B に集約している（図 C および表 B）。

表B. EHECの主なO群とそれぞれに関連するH型/Hg型

O群	関連する 主なH型/Hg型	これまでに報告のある 他のH型/Hg型
O157	H7/Hg7	
O26	H11/Hg11	
O111	H8/Hg8	H11/Hg11, H21/Hg21
O103	H2/Hg2	H11/Hg11, H25/Hg25
O121	H19/Hg19	
O145	H28/Hg28	H25/Hg25, H34/Hg34
O165	H25/Hg25	
O45	H2/Hg2	
O91	H14/Hg14	H21/Hg21
O178	H19/Hg19	

d) PCRの実施方法 (*E. coli* Og-/Hg-typing PCR 共通)

①テンプレート DNA

市販キットなどにより精製して調整した DNA (1~10 ng/μL) やアルカリ熱抽出法により準備した DNA を用いることができる。また、純培養液や寒天平板培地上のコロニーを反応液に直接加えることでも判定できる。ただし、マルチプレックス PCR 法では DNA 濃度が高い場合や菌量が多い場合は非特異的バンドの出現に繋がるので、調整が必要となる。

②PCR 試薬

単独およびマルチプレックス PCR には、各社から販売されている標準的な PCR 試薬が利用できる。これまでに、DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)、KAPATaq EXtra PCR Kit (日本ジェネティクス)、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)、GoTaq Hot Start Polymerase (プロメガ) などでの実用報告がある。

③単独 PCR 法

分離株が予想される Og 型や Hg 型であるか否かを判定するには、単独プライマーペアを用いた PCR 法 (単独 PCR 法) が利用できる。確認のために、陽性コントロールとして対象 Og 型または Hg 型の DNA を加えて実施することが望ましい。反応液組成および反応温度の例を表 C に示す。

表C. 単独PCRの反応液組成の例
(DreamTaq Green DNA Polymeraseを用いた場合)

反応試薬など	1反応 (μL)	備考
PCR grade water	10	
DreamTaq Master mix (2x)	15	
F-primer (10 μM)	1.5	最終濃度は0.5 μM
R-primer (10 μM)	1.5	最終濃度は0.5 μM
Template DNA	2	精製DNAの場合は1-10 ng/μLが適当
Total	30	

反応条件の例（全ての単独 PCR に共通）

[94℃-20 秒 + 58℃-20 秒 + 72℃-1 分] × 25 サイクル

*サイクル前の変性（94℃）とサイクル後の伸長（72℃）は必要としない

④マルチプレックス PCR 法

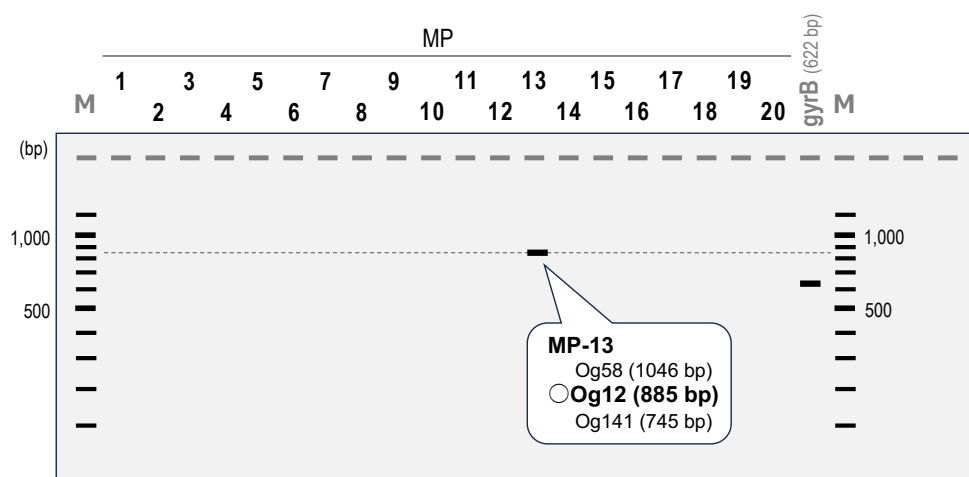
分離株の Og 型や Hg 型が不明な場合は、広域かつ効率的な型別が可能なマルチプレックス PCR が有効である（図 B）。反応液組成および反応温度の例を表 D に示す。加えるプライマーミックスは別表の通りに事前調整して使用すると効率が良い。増幅産物のサイズの読み間違いが起こらないように、サイズマーカーとともに 100 から 1,000 bp が十分に展開するように電気泳動する（図 C）。マルチプレックス PCR の性質上、100 bp 以下または 1,500 bp 以上に非特異的な増幅が観察されることもあるが、Og 型および Hg 型の判定には影響しないので無視してよい。

表D. マルチプレックスPCRの反応液組成の例
(DreamTaq Green DNA Polymeraseを用いた場合)

反応試薬など	1反応 (μL)	備考
PCR grade water	10	
DreamTaq Master mix (2x)	15	
調整済みプライマーミックス	3	それぞれのプライマーの最終濃度は0.2 μM（一部は0.4μM）
Template DNA	2	精製DNAの場合は1-10 ng/μLが適当
Total	30	

反応条件の例（全てのマルチプレックス PCR に共通）

94℃-1 分 + [94℃-30 秒 + 58℃-30 秒 + 72℃-1 分] × 25 サイクル + 72℃-2 分



図D. *E. coli* Og-typing PCR プライマーミックスMP-1~20 (+*gyrB*) を用いた際の電気泳動像のイメージ

⑤大腸菌特異的 *gyrB* プライマーの使い方

DNA ジャイレースの β サブユニットをコードする *gyrB* は、全ての細菌に保存されている。別表に示す *gyrB* プライマーは、*gyrB* 上の大腸菌に特異的な塩基配列を標的としており、*E. albertii* や *E. harmanii* では増幅せず（または、わずかにしか増幅せず）、*Escherichia* 属以外でも増幅しない。マルチプレックス PCR を行う際には、大腸菌であることを確認するとともに、テンプレート DNA の濃度や品質に問題がないか、PCR 反応が良好に行われたかを確認するために、*gyrB* プライマーを追加して反応から泳動確認までを同時に実施することが望ましい（図 D）。

e) PCR 法によって得られた結果の表し方

菌株の血清型に関する正しい情報を共有するためには、表現型と遺伝子型の結果を区別して表記する必要がある。例えば、O 抗原を発現していない rough 型株や鞭毛を発現していない非運動性株は、Orough や HNM（non-motile）または H-と表されるが、PCR 法の標的となる遺伝子が保存されている場合は、本来の O 群または H 型に対応した Og 型または Hg 型が判定できる。つまり、表現型と遺伝子型が不一致となるケースもあることから、表現型と遺伝子型を区別して表記することが望ましい。また、PCR 法によって判定できなかった（いずれのマルチプレックス PCR を用いても増幅が確認できなかった）場合は、OgUT または HgUT（untypeable）と表現する（Og の場合は使用した MP の範囲を明示する）。未実施の場合は OgNT または HgNT（not tested）と表現する。

表E. 血清型と遺伝子型の表記例

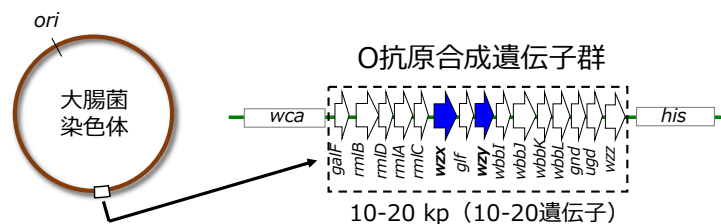
O群	H型	血清型	Og型	Hg型	遺伝子型	まとめた表記
O1	H7	O1:H7	Og1	Hg7	Og1:Hg7	O1/Og1:H7/Hg7
OUT	HNT	OUT(:HNT)	OgN34	Hg45	OgN34:Hg45	OUT/OgN34:Hg45
O165	H-	O165:H-	Og165	Hg25	Og165:Hg25	O165/Og165:H-/Hg25
OUT	H21	OUT:H21	Og188	HgNT	Og188(:HgNT)	OUT/Og188:H21

*カッコ内の結果は表記しなくても良い

後述するように、2種類のOg型およびHg型が確認される場合がある。その時の結果は2種類の遺伝子型を「+（プラス）」で繋いで併記する（例：Og8+Og156、Hg3+Hg21）。2種類の遺伝子型が確認された場合は培養液またはテンプレートDNAのコンタミネーションも疑われるので、場合によっては再培養して生育した単一コロニーを用いて確認を行う。

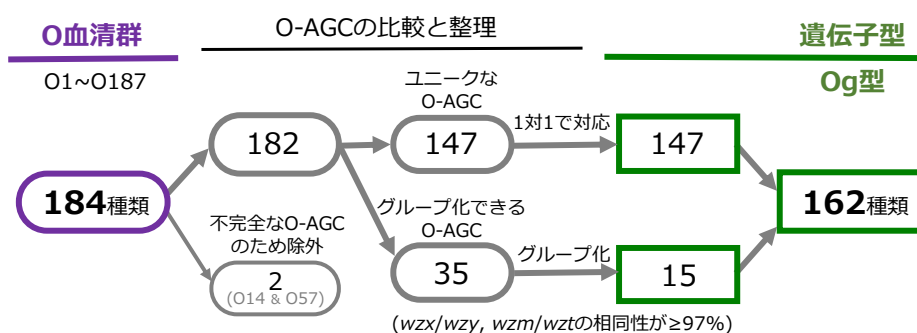
f) *E. coli* Og-typing PCR 標的遺伝子の特徴

O抗原の合成には10-20個程度の遺伝子が関与し、その多くは染色体上の決まった位置にO抗原合成遺伝子群（O-antigen biosynthesis gene cluster, O-AGC）として存在する（図D）。O-AGCには糖鎖ユニットの輸送と連結に関わる2種類の遺伝子ペア〔wzx/wzy（O-antigen flippase/O-antigen polymerase）またはwzm/wzt（ABC transporter）〕のどちらか一方が必ず含まれる。wzx/wzyとwzm/wztの大半は、異なるO群間では塩基配列が大きく異なり、後述する一部の例外を除いては、最も似ている組み合わせであってもDNAの相同性は70%を下回る。このような特徴から、wzx/wzyとwzm/wztは、O群を識別するマーカー遺伝子として用いられる。



図D. O抗原合成遺伝子群のイメージ

O1 から O187（184 種類）の O-AGC を比較すると、図 E および表 F のように整理できる。O14 と O57 の O-AGC は大部分が欠失しているため、識別できるマーカー遺伝子が存在しない。上記 2 種類は O 抗原を発現しておらず（いわゆる rough 型）、おそらく LPS の R コア部分が抗原となり識別されている。残る 182 種類のうち、147 種類の O-AGC はユニークで、35 種類は他の O 群と相同または近似した O-AGC を共有し、表 F に示す 15 種類（Gp1 から Gp15）にグループ化できる。グループ内の *wzx/wzy* または *wzm/wzt* の塩基配列の相同性は、それぞれ 97~100% と非常に高く、マーカー遺伝子だけで O 群を区別するのは難しい。以上の結果をまとめると、O14 と O57 を除く 182 種類の O 群は、162 種類の Og 型と紐付けて整理できる。



図E. O群（O1~187）とOg型の関係

表F. 遺伝学的にグループ化された15種類のOg型

Og型	グループ名	O-AGC（ <i>wzx/wzy</i> または <i>wzm/wzt</i> ）が相同または近似するO群
OgGp1	Og1	O20, O137
OgGp2	Og2	O28ac, O42
OgGp3	Og3	O118, O151
OgGp4	Og4	O90, O127
OgGp5	Og5	O123, O186
OgGp6	Og6	O46, O134
OgGp7	Og7	O2, O50
OgGp8	Og8	O107, O117
OgGp9	Og9	O17, O44, O73, O77, O106
OgGp10	Og10	O13, O129, O135
OgGp11	Og11	O153, O178
OgGp12	Og12	O18ab, O18ac
OgGp13	Og13	O124, O164
OgGp14	Og14	O62, O68
OgGp15	Og15	O89, O101, O162

g) 定型 Og 型と非定型 Og 型

O1 から O187 の O-AGC より整理された 162 種類の Og 型を「定型 Og 型」とし、それら以外の Og 型を「非定型 Og 型」として区別している。基本的には、定型 Og 型の wzx/wzy または wzm/wzt との塩基配列の相同性が 70%未満の O-AGC に対して新規 Og 型名が付与されている。ゲノム解析などから、これまでに 60 種類以上の非定型 Og 型が見つかっており、それらの多くは O1 から O187 とは異なる構造の O 抗原を発現していると予想され、SSI が提供する完全タイピング用の抗血清を用いた凝集試験でも型別できない場合が多い（一部に型別できるものもある）。つまり、非定型 Og 型の多くには対応する O 群が存在しないため（O 抗原は発現しているが、O 群として規定されていない）、ゲノム解析や遺伝子検査によってのみ型別できる。SSI において O189 以降の新規 O 群の追加は現在のところ予定されていない。

E. coli Og-typing PCR では、これまでに 42 種類の非定型 Og 型に対する判定プライマーがデザインされており、マルチプレックス PCR 用のプライマーミックス MP-21 から 27 に組み込まれている。この 42 種類には、2015 年に追加された O188（ボイド赤痢菌 type 16 と相同）、後述する赤痢菌にユニークな Og 型、Og48 および OgN16 のバリエーション（それぞれ Og48va および OgN16va。プロトタイプとの塩基配列の相同性は 70%以上-90%未満）を検出するプライマー、および Og70 判定用の新規プライマー（MP-15 内の Og70 プライマーでは、一部の Og70 を検出できないことが判明したため、すべての Og70 を判定できるプライマーをデザインして MP-24 に追加）が含まれる。

井口らのグループでは新規 Og 型に対して「OgN+番号」を付与しているが、他のグループが先行して新規 O-AGC を発表している場合は、彼らが命名した名称または対象株名を Og 型名に使用している。

h) 大腸菌の O 群と赤痢菌の血清型

赤痢菌は、志賀赤痢菌（*Shigella dysenteriae* : SD）、ボイド赤痢菌（*Shigella boydii* : SB）、フレクスナー赤痢菌（*Shigella flexneri* : SF）、ソンネ赤痢菌（*Shigella sonnei* : S）の 4 菌種から成り、少なくとも 44 種類（SD で 14 種類、SB で 17 種類、SF で 12 種類、SS で 1 種類）の血清型が認められている。赤痢菌は運動性が無く、赤痢菌の菌体抗原を標的とする「血清型」は大腸菌の「O 群」に相当する。赤痢菌と

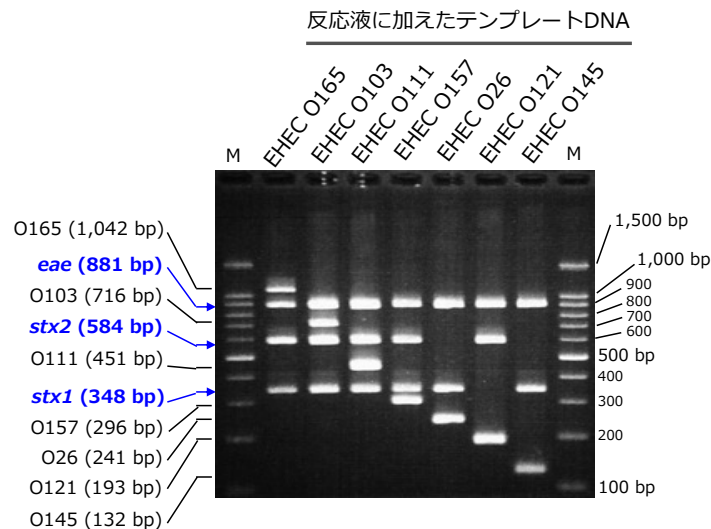
大腸菌は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列では区別できず、これまでのゲノム解析等により、赤痢菌は大腸菌の内部に存在するいくつかの特定系統群であることがわかっている。大腸菌と赤痢菌の間では O-AGC や O 抗原糖鎖の構造も重複することが知られている。O1 から O188 の大腸菌 O 群と 44 種類の赤痢菌血清型を比較すると、34 種類の O-AGC が重複し、その多くで免疫血清も交差して凝集する。上記 44 種類の赤痢菌血清型の O-AGC を整理すると 34 種類の Og 型が認められ、これらのすべてを定型 Og 型（23 種類）と非定型 Og 型（11 種類）の判定プライマーで判定できる（別表）。つまり、*E. coli* Og-typing PCR 法は大腸菌と赤痢菌に横断した包括的な Og 型判定法としても利用できる。

i) 2 種類の O-AGC を保有する大腸菌

稀ではあるが、1 株が 2 種類の O-AGC を保有する場合がある。*E. coli* Og-typing PCR により Og8 と OgSB17 の 2 種類が検出された大腸菌のゲノム解析を行ったところ、染色体上の通常の遺伝子座に 2 つの完全な O-AGC がタンデムに挿入していた。2 種類の Og 型が検出される場合、Og8 との組み合わせを見かけることが多い（Og8+OgSB17 に加え、Og8+Og27 や Og8+Og32 など）。他に、Og100+Og154 や Og102+Og120 などの組み合わせも見つかっている。凝集試験においては、いずれかの Og 型に対応した O 群に判定されることが多い。

j) EHEC のワンショット PCR

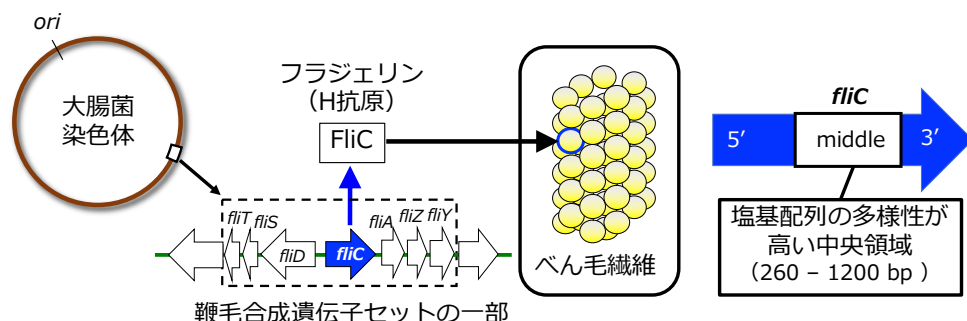
EHEC に関連する主要 7 種類の O 群（O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165）と 3 種類の病原遺伝子（*stx1*、*stx2*、*eae*）を 1 本の反応チューブで検査できる反応系（MP-1 plus）が利用できる。具体的には、*E. coli* Og-typing PCR の MP-1 に、*stx1*、*stx2*、*eae* の検出プライマーを加えたマルチプレックス PCR 法となる（図 F）。調整方法等を別表に示す。



図F. MP-1 plusを用いた電気泳動像

k) *E. coli* Hg-typing PCR 標的遺伝子の特徴

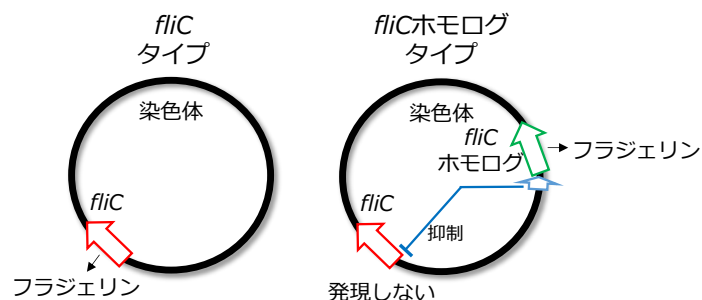
運動器官である鞭毛は、基部、フック、繊維の3つの構造からなる。プロペラの役割を果たす鞭毛繊維は、*fliC*（またはそのホモログ）によってコードされるフラジエリンと呼ばれるタンパク質がらせん状に積み重なった構造をとる（図 G）。繊維の表面に露出した部分のアミノ酸配列は多様性に富んでおり、この構造的な違いが H 型の多様性を生み出している。多様性領域は *fliC* の中央部分にあり、異なる H 型間では最も似ている組み合わせであっても相同性 90%を下回るものがほとんどである。このような特徴から、*fliC* の中央領域は Hg 型を判定する PCR 法の標的配列として用いることができる。ただし、H1 と H12 の *fliC* は塩基配列の相同性が 98%以上あり、PCR 法での区別は難しいため、Hg1/12 にまとめられた。



図G. 鞭毛繊維コード遺伝子 (*fliC*) の特徴

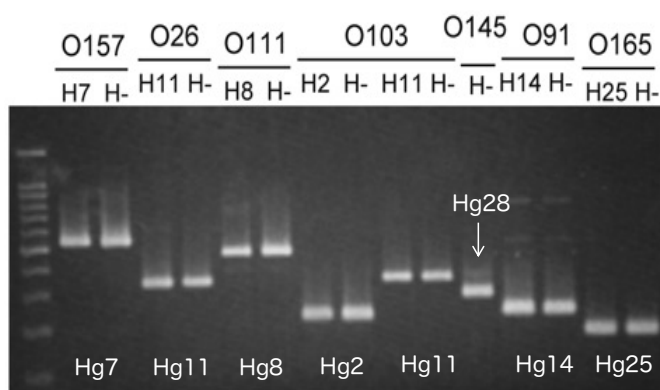
9 種類の H 型では、*fliC* とは異なる遺伝子座に挿入した *fliC* ホモログ (*fliK* など) によ

てフラジェリンがコードされている（*fliA* : H3、H35、H36、H47、H53、*fliA* : H44、H55、*fliA* : H17、*fliA* : H54）。*fliC* ホモログはプロファージなどの外来性領域に含まれ、*fliC* ホモログを獲得した菌株はその染色体上に *fliC* も保有する（図 H）。*fliC* と *fliC* ホモログが共存する場合、通常は *fliC* の発現は抑えられ、*fliC* ホモログがフラジェリンを発現する。つまり、H 型（表現型）は *fliC* ホモログの遺伝子型と一致することになる。



図H. *fliC*と*fliC*ホモログの関係

鞭毛の合成には 40 種類以上の遺伝子が関与する。そのいずれかが欠失や変異によって発現なくなると、鞭毛は合成されず運動性を失うため H 型を判定できない。しかし、このような場合であっても PCR 法の標的となる *fliC* 遺伝子は完全に保存されていることが多く、本来の H 型に対応した Hg 型を判定できる。図 I では、主要な O 群に属する EHEC の Hg 型判定の結果を示す。



図I. 運動性の無い菌株（H-）のHg型判定の結果

I) 参考文献

- 1) Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research* 22(1):101-107 (2015)
- 2) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology* 53(8):2427-2432 (2015)
- 3) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、大西真、腸管出血性大腸菌の主要な O 血清群と病原性遺伝子を判定する One-shot マルチプレックス PCR 法の開発と評価、日本食品微生物学会雑誌 32(4):215-218 (2015)
- 4) Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing. *J Clin Microbiol.* pii: JCM.00190-18 (2018)
- 5) Iguchi A, Nishii H, Seto K, Mitobe J, Lee K, Konishi N, Obata H, Kikuchi T, Iyoda S. Additional Og-typing PCR techniques targeting *Escherichia coli*-novel and *Shigella*-unique O-antigen biosynthesis gene clusters. *J Clin Microbiol.* 58(11):e01493-20 (2020)