

201234042A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食中毒調査における食品中の病原大腸菌の
統括的検査法の開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究 . . . 3

工藤 由起子

II. 分担研究報告書

1. 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討 17

大西 真

2. 病原大腸菌の統括的検査法の開発 29

工藤 由起子

(1) 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定 41

(2) 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討 115

(3) 多血清群での分離培地の検討 161

3. 病原大腸菌の分布および病原性解析 181

西川 禎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 203

I. 総括研究報告書

食中毒調査における食品中の病原大腸菌の
統括的検査法の開発に関する研究

工藤 由起子

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

総括研究報告書

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所・細菌第一部
西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

日本での腸管出血性大腸菌の重要な血清群の解析を行い、食品を対象にした検査法を開発することを目的に、（1）腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討、（2）病原大腸菌の統括的検査法の開発、の研究を行った結果、日本での主要な血清群である 0157、026、0111、0103、0145 および 0121 の 6 血清群を流通食品や原因食品調査の試験の対象にすることが国内の食品での効果的な検査になるものと思われた。また、重症者の発生の割合の多い血清群 0165 を国内での食中毒対応の対象として、海外（特に、米国）での患者発生の多い血清群 045 を輸入食品検査の対象として試験を行うことも有用と考えられた。また、VT 遺伝子検査法の本研究での検討結果をもとに通知法にある VT 遺伝子スクリーニングを改訂改し通知（平成 24 年 12 月 17 日食安監発 1217 第 1 号「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」）した。次に、腸管出血性大腸菌や毒素原性大腸菌など病原大腸菌のヒト、家畜、食肉等からの網羅的検出を試み、高効率に病原大腸菌を検出分離できるか否か実際の検体を用いての検証および調査にて病原大腸菌の汚染源を推定することを目的に、（3）病原大腸菌の分布および病原性解析、の分担研究を行った結果、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニングとコロニー・ハイブリダイゼーション法の併用によって病原大腸菌の網羅的な検出が実際の調査においても有用であることを実証できた。また、健康なブタで見つかった毒素原性大腸菌がヒトの汚染源となる可能性があるのか検討する必要があると考えられた。以上の研究成果を今後発展させて、腸管出血性大腸菌や毒素原性大腸菌などの食品での検査法を開発し、食中毒の解明や汚染食品の調査等に貢献することが期待される。

研究協力者

伊豫田 淳	国立感染症研究所・細菌第一部
井口 純	宮崎大学・IR 推進機構
王 麗麗	大阪市立大学大学院生活科学研究科後期博士課程
長谷 篤	大阪市立環境科学研究所
小笠原準	大阪市立環境科学研究所
中村寛海	大阪市立環境科学研究所
前原智史	大阪市中央卸売市場食品衛生検査所
木太雅俊	大阪市食肉衛生検査所
藤原佐美	(独) 国立病院機構 大阪南医療センター
大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
小西典子	東京都健康安全研究センター
甲斐明美	東京都健康安全研究センター
森 哲也	財団法人 東京顕微鏡院
中川 弘	株式会社 BML フード・サイエンス
林 昭宏	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
原田 誠	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
小林直樹	国立医薬品食品衛生研究所
長尾清香	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者の発生も珍しくない。日本も含め世界で食中毒が発生し、各国でも食中毒の発生の抑制が重要な課題になっており、汚染食品の調査や汚染制御に取り組んでいる。世界的機関でも微生物学的リスクアセスメントとして牛肉などとの組み合わせについて解析が行われるなど、対応が急がれている。食中毒では原因食品確定が不可欠であり、食品からの検査法は日本および米国やEUなど諸

外国の政府機関で策定されている。日本および諸外国の検査法では、腸管出血性大腸菌の重要な病原因子である Vero toxin (VT) 遺伝子 (または志賀毒素遺伝子、*stx*) の有無を食品培養液から検出することによって腸管出血性大腸菌の汚染の有無のスクリーニングが行われている。また、諸外国では血清群 0157 に加え、感染の多い血清群 4-6 種類を対象にした食品または牛肉からの検査法が確立されており、VT 遺伝子スクリーニングで陽性になった検体について主要な O 血清群を

対象に遺伝子検出を2次スクリーニングとして行っている。日本でも0157以外の感染が多数あり、独自に主要な血清群を決定し、食品検査法を確立する必要がある。このため本研究では、日本での腸管出血性大腸菌の重要な血清群の解析を行い、食品を対象にした検査法を開発することを目的に、(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討(大西 真)(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発(工藤由起子)の分担研究を行った。

また、腸管出血性大腸菌や毒素原性大腸菌など病原大腸菌には病原性に基づいて5種類以上があるが、ヒト、家畜、食肉等から各種病原大腸菌の網羅的検出を試み、高効率に病原大腸菌を検出分離できるか否か実際の検体を用いて検証すること、および調査結果に基づいて下痢原性大腸菌の汚染源を推定することを目的に、(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析(西川禎一)の分担研究を行った。

B. 研究方法

(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討

血便および(または)HUSを発症している患者を重症者と定義し、これらの患者由来の腸管出血性大腸菌株の0血清群について集計を行うことにした。血清型別には、デンカ生研またはデンマークの

血清学研究所の市販血清を用いた。また、0157、026、0111、0103の抗原遺伝子と*stx1*および*stx2*およびインチミン遺伝子(*eae*)のプライマー配列は既知のものを使用し、0121、0145、0165は本研究で新たにデザインしたものを使用してマルチプレックスPCR法を開発した。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 食品培養液でのVT遺伝子検出スクリーニング法の改定

反応系の縮小化のために、牛挽肉およびカイワレダイコンのmEC中培養液にVT1およびVT2陽性腸管出血性大腸菌0111:H-の培養液および希釈液を接種して、それらからアルカリ熱抽出法によってDNA抽出を行ないリアルタイムPCR法にてVT遺伝子を検出した。

試薬および機器の組み合わせによるVT遺伝子検出感度を検討するために、牛レバー、牛挽肉、豚スライス肉、チーズ(ヤギナチュラルチーズ)、レタス、カイワレダイコン、トマトおよびホウレンソウのmEC中培養液にVT1陽性の腸管出血性大腸菌026およびVT2陽性の腸管出血性大腸菌0157の4株ずつ計8株の培養液および希釈液を接種して、それらからアルカリ熱抽出法によってDNA抽出を行ないCycleavePCR 0-157(VT gene) Screening Kit Ver. 2.0およびNielsenらの方法にてVT遺伝子をリアルタイムPCR法で検出した。

試薬調製による増幅ベースラインの安定化のために、Nielsen らの方法に従って調製した反応液に DNA 抽出原液を添加して 10 回タッピングしてスピンドウンしたものとタッピングしないものをリアルタイム PCR 法にて測定した。

2. 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

牛挽肉およびカイワレダイコンの mEC 中培養液に 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の 7 種類の O 血清群の培養液および希釈液を接種して、それらからアルカリ熱抽出法によって DNA 抽出を行ない、O 抗原特異的遺伝子検出法（米国農務省（United States Department of Agriculture、USDA）参照法および欧州食品安全機関（European Food Safety Authority、EFSA）参照法）および *eae* 検出法に供試した。

3. 多血清群での分離培地の検討

血清群（VT 陽性株 60 株および陰性株 4 株の計 64 株）を酵素基質培地に画線し、37°C にて 24 時間培養し、生育したコロニーの発色を観察した。また、一部培地でセフィキシム・亜テルル酸（CT）を添加し菌の感受性を確認した。

（3）病原大腸菌の分布および病原性解析

各種食品、家畜糞便（ウシおよびブタ）、健康者便、下痢症患者便の総計 1,148 検体を供試した。食品の増菌培養には基本

的に FDA の二段培養法（ブレインハートインヒュージョン・ブイオンおよびトリプトン・フォスフェート・ブイオン）、糞便検体はブレインハートインヒュージョン・ブイオンにて増菌培養した。各増菌培養液からの DNA 抽出物を用いて、各種リアルタイム PCR 法（*stx1*・*stx2*・*eae* トリプレックス、*stx1*・*stx2* デュプレックス、*est*（STp・STh）・*elt* トリプレックス、*est*（STp）・*est*（STh）デュプレックス、*aggR*・*astA* デュプレックス、*virB*・*afaB* デュプレックス）を行なった。これによって、病原大腸菌陽性と判定された増菌培養液からコロニー・ハイブリダイゼーション法にて病原大腸菌の分離を行った。また、分離された腸管病原性大腸菌について、Clermont らの方法での系統発生群解析、Afset らの方法に準じた病原性プロファイル、Blanco らの方法での *eae* の型別の 3 つの分子疫学的解析を行った。

C. 研究結果

（1）腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討

2007 年から 2011 年までに日本国内でヒトから分離され、感染研細菌第一部に送付された総計 14,376 株の腸管出血性大腸菌のうち、9,966 株が 0157（69.3%）、2,228 株が 026（15.5%）、479 株が 0111（3.3%）、289 株が 0103（2%）、247 株が 0121（1.7%）、265 株が 0145（1.8%）、158

株が 091 (1.2%)、56 株が 0165 (0.4%) であった。091 を除く、これら 7 つの血清群で重症者由来株全体の 99%以上を占めることが判明した。これまでの我々の報告から、これら 7 つの血清群に属する腸管出血性大腸菌は接着因子として *eae* を保有することが明らかとなっている。また、7 つの O 血清群マルチプレックス PCR を開発した。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

反応系の縮小化では、Nielsen らの方法での総反応液量が 50 および 30 μ l において、50 μ l 反応系よりも 30 μ l 反応系の方が検出性の高い結果であった。試薬および機器の組み合わせによる VT 遺伝子検出感度の検討では、検出試薬、機種および解析方法ごとに試験した 8 食品種のうち、各食品種の繰り返し 2 反応での測定結果が両方とも陽性だった食品種の数を集計したところ、CycleavePCR O-157 Screening Kit Ver.2.0 では、auto 解析によって LC480 および Dice では 10^4 cfu/ml まで VT1 および VT2 遺伝子ともに 8 食品種全てで検出されたが、ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast では 8 食品種中 5 食品種以下の検出であり、また増幅していないのに陽性に判定されるなど妥当な解析結果が得られなかった。しかし、manual 解析を行うことで妥当な結果

が得られた。Nielsen らの方法の反応結果では、auto 解析および manual 解析ともに ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480 で、auto 解析 (manual 解析設定のない) LCnaio および Dice で適切な解析結果が得られた。試薬調製による増幅ベースラインの安定化では、混和操作を行った場合には、反応初期の蛍光値の異常な上昇は認められず、 10^2 cfu/ml が陽性判定であった。

2. 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

供試した全株とも USDA 参照法および EFSA 参照法での定性試験で検出された。感度を確認したところ、USDA 参照法および EFSA 参照法ともに、アルカリ熱抽出した DNA を供試した場合には 10^2 cfu/ml まで陽性であった。食品培養液での定性試験では、USDA 参照法および EFSA 参照法で牛挽肉培養液およびカイワレダイコン培養液の両方において供試した全血清群が検出された。感度を確認したところ、USDA 参照法および EFSA 参照法で全ての O 血清群について両食品培養液で 10^3 cfu/ml まで陽性であった。*eae* は、菌液の定性試験では USDA 参照法および EFSA 参照法の両方法で検出された。

3. 多血清群での分離培地の検討

クロモアガー-0157 では、0157 および 0151 が藤色、それ以外はほとんどが青色であった。クロモアガー-STEC では、供試

した株全てが藤色であった。BCM0157 では、0157、063 が紺色、0121 は白色、および他の血清群は緑色であった。クロモアガー-026/0157、Vi RX026、Vi EHEC、CIX およびレインボーアガーでは血清群ごとに多様な発色であった。クロモアガーSTEC に CT を添加した CT-クロモアガーSTEC では、0157、026 (VT 陰性株は非生育)、0111、0103 (1 株生育)、0121、0145、045 (1 株生育)、0151 は藤色であった。0165、08、063、091 は非生育であった。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

病原大腸菌の関連遺伝子の検出の結果、EPEC の *eae* 陽性検体をもっとも多く、特に家畜においては 67% の陽性率であった。次いで *stx1*、*stx2* 陽性検体が多く、ウシでは 46% に達した。ETEC のエンテロトキシン遺伝子 (*elt*、*est*) が検出される率は高くなかったが、ブタにおいては他の検体に比べて高い傾向があった。EAEC の指標とされる *aggR* は検出率の最も低い遺伝子であったが、その中ではヒトの陽性率が他の検体に比べて高い傾向を示した。コロニー・ハイブリダイゼーション法で ETEC は患者 3 検体から分離された。腸管病原性大腸菌の分子疫学解析では、 $\beta 1$ (インチミン型)-B1 (系統発生群型) がウシの主要なタイプであり、患者由来株の 25% を占めて健康者由来株に比べてその比率が有意に高かった ($p=0.025$)。

D. 考察

(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討

本研究から、日本国内で分離頻度の高い腸管出血性大腸菌は血清群 0157、026、0111、0103、0145、0121、091 または 0165 であることが明らかとなった。しかし、091 は現時点では重症者由来株としては頻度が低いため、その他の 7 血清群が今後の食品検査に重要な EHEC の O 血清群と考えられる。このうち、0121 と 0165 は分離数こそ少ないものの、重症例の割合が多いこと、0121 は集団発生の原因株となっていることが多いことから、今後注意を要する。また、本年度構築したマルチプレックス PCR 法は 10 種類の遺伝子を異なる増幅産物のサイズで同時に検出できる系である。しかし、さらに、他の細菌種が混在していると考えられる臨床検体または食品等からの増菌液を用いた検出感度および特異性など、今後の検討が必要である。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 食品培養液での VT 遺伝子検出スクリーニング法の改定

リアルタイム PCR 法での自家調製試薬は市販キットと比べて経済的であるため使用する場合が多い。反応系を 30 μ l にすることによってさらに経済性を高められることが判明した。また、リアルタイ

ム PCR 法の改良された市販キットおよび自家調製の試薬と汎用性の高い複数の機器の組み合わせによる使用について検討したところ、多くの食品で 10^3 cfu/ml まで 2 反応の両方で検出され高感度であることが示された。しかし、一部食品では 10^3 cfu/ml で 2 反応の両方で検出されないものがあり、食品成分が DNA 抽出や PCR 反応を阻害することが考えられた。

2. 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

諸外国の政府機関で使用されている試験法を参照し、日本での主要な血清群についての O 抗原特異的遺伝子対象 PCR 法を定性での検出および感度を検討した。定性検出では、USDA 参照法および EFSA 参照法において供試した全株について菌液および菌接種食品培養液から検出された。感度を検討した結果、両参照法において食品培養液からのアルカリ熱抽出で 10^3 cfu/ml まで全血清群とも検出できることが明らかになった。USDA 参照法および EFSA 参照法で *eae* 検出が確認されたことから、効率的な腸管出血性大腸菌の検査法の策定の為に VT 遺伝子と合わせて *eae* をスクリーニング対象とすることを考慮する必要があると考えられた。日本での腸管出血性大腸菌の主要な血清群に対応した食品での検査法の確立には、026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 を対象とした諸外国の政府機関で使用さ

れている試験法を参照することが可能であることが示された。

3. 多血清群での分離培地の検討

腸管出血性大腸菌用の酵素基質培地は、海外でも開発されているが、日本では、特に 0157、026、0111 を対象として開発が進んでおり、複数社からの市販品として普及し使用されている。本研究ではこれら酵素基質培地を日本で重要な血清群 8 種類 (0157、026、0111、0103、0121、0145、045、0165) の分離に応用することを検討した結果、CT など選択剤を加えて選択性を高めた CIX 寒天培地にて、0157 は青緑、0121 はピンク、026、0111、0103、0145、045 は濃紫として鑑別分離すること、CT など選択剤を加えて選択性を高めたクロモアガー-026/0157 培地にて 0157 は赤、026 は緑、0121、045 は紫、0111、0103、0145 は赤紫として鑑別分離すること、などが考えられた。今後、さらなる検討を行い確立されるものと考えられる。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

我々が開発したマルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニング手法と、スクリーニングで陽性と判定された検体でのコロニー・ハイブリダイゼーション法の併用によって病原大腸菌の網羅的な検出が実際の調査においても有用であることを実証できた。また、家畜の毒素原性大腸菌は

家畜の間で、ヒトの毒素原性大腸菌はヒトの間だけで感染を循環させており相互の行き来はないとされているが、今回健康なブタで見つかった毒素原性大腸菌がブタの毒素原性大腸菌であってヒトの汚染源となる可能性があるのか否か、検討してみる価値はある。さらに、分子疫学的解析によってヒトに病原性を示す EPEC がウシに由来することが示唆された。一方、健康者に見られる EPEC 株の多くは、ヒトに下痢原性を示さない常在菌の一種である可能性もあると考えられる。

E. 結論

日本での腸管出血性大腸菌の重要な血清群の解析を行い、食品を対象にした検査法を開発することを目的に、(1) 腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討、(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発、の研究を行った結果、日本での主要な血清群である 0157、026、0111、0103、0145 および 0121 の 6 血清群を流通食品や食中毒等原因食品調査の試験の対象にすることが国内の食品での効果的な検査になるものと思われた。また、重症者の発生の割合の多い血清群 0165 を国内での食中毒対応の対象として、海外（特に、米国）での患者発生の多い血清群 045 を輸入食品検疫の対象として試験を行うことも有用と考えられた。また、VT 遺伝子検査法の本研究での検討結果を

もとに通知法にある VT 遺伝子スクリーニングを改訂し通知（平成 24 年 12 月 17 日食安監発 1217 第 1 号「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」）した。次に、腸管出血性大腸菌や毒素原性大腸菌など病原大腸菌のヒト、家畜、食肉等からの網羅的検出を試み、高効率に病原大腸菌を検出分離できるか否か実際の検体を用いての検証および調査にて病原大腸菌の汚染源を推定することを目的に、(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析、の分担研究を行った結果、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を適用した増菌培養液のスクリーニングとコロニー・ハイブリダイゼーション法の併用によって病原大腸菌の網羅的な検出が実際の調査においても有用であることを実証できた。また、健康なブタで見つかった毒素原性大腸菌がヒトの汚染源となる可能性があるのか検討する必要があると考えられた。

以上の研究成果を今後発展させて、腸管出血性大腸菌や毒素原性大腸菌などの食品での検査法を開発し、食中毒の解明や汚染食品の調査等に貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi, A., Iyoda, S., Ohnishi, M.
Molecular characterization
reveals three distinct clonal
groups among clinical Shiga
toxin-producing *Escherichia coli*
strains of serogroup O103. J. Clin.
Microbiol. 50:2894-2900, 2012.

Hara-Kudo, Y., Kumagai, S. Konuma, H.,
Miwa, N., Masuda, T., Ozawa, K.,
Nishina, T. Decontamination of
Vibrio parahaemolyticus in fish by
washing with hygienic seawater and
impacts of the high level
contamination in the gills and
viscera. J. Vet. Med. Sci.
75:589-596, 2013.

Ohnishi, T., Goto, K., Kanda, T.,
Kanazawa, Y., Ozawa, K., Sugiyama,
K., Watanabe, M., Konuma, H.,
Hara-Kudo, Y. Microbial
contamination by procedures of
consumption and the growth in
beverage. J. Environ. Sci. Health,
Part A. 48:781-790, 2013.

Wang, L. Wakushima, M., Aota, T.,
Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T.,
Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y.,
Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y.
Specific properties of
enteropathogenic *Escherichia coli*

strains isolated from diarrheal
patients: comparison between
strains from foods, and fecal
specimens from cattle, swine and
healthy carriers in Osaka City,
Japan. Appl. Environ. Microbiol.
79:1232-1240, 2013.

2. 学会発表

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Kai,
A., Ohtsuka, K. DNA extraction and
molecular detection methods for
Shiga toxin-producing *Escherichia*
coli in food. VTEC 2012, May 3-7,
2012. Amsterdam.

Hara-Kudo, Y., Hiroi, M., Iizuka, S.,
Taga, K., Sugiyama, K.,
Sugita-Konishi, Y., Ohtsuka, K.
Detection methods for Shiga
toxin-producing *Escherichia coli*
O111 in food. FoodMicro 2012,
September 3-6, 2012. Istanbul.

工藤由起子. 食品での腸管出血性大腸菌
の検査法の最新の動向について. 第
33 回日本食品微生物学会学術総会.
平成 24 年 10 月 福岡.

工藤由起子、斉藤志保子、大塚佳代子、
山崎省吾、八尋俊輔、岩出義人、西尾
智裕、杉山寛治、大友良光、小沼博隆、
田中廣行、中川 弘、小西良子、熊谷
進. 近年の腸炎ビブリオ食中毒の減少
と魚介類の汚染状況の解析. 第 46 回

腸炎ビブリオシンポジウム. 平成 24
年 11 月 大分

曾我部祐介、塚原めぐみ、丸山弓美、飯
塚 太由、荒木恵美子、小西良子、
工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、
0111 および 0157 一斉試験法のため
の増菌培養法の基礎検討. 第 33 回
日本食品微生物学会学術総会. 平
成 24 年 10 月 福岡.

小西典子、齊木 大、大塚佳代子、
森 哲也、中川 弘、飯塚信
二、多賀賢一郎、甲斐明美、
小西良子、工藤由起子. 複数機関で
実施した腸管出血性大腸菌 026、
0111 および 0157 一斉試験法のため
の増菌培養法の検討. 第 33 回日本
食品微生物学会学術総会. 平成 24
年 10 月 福岡.

山本祐嗣、林 昭宏、飯塚信二、多賀
賢一郎、大塚佳代子、小西典子、
森 哲也、中川 弘、齊藤志保
子、磯部順子、廣井みどり、神吉政
史、右田雄二、小西良子、工藤由起
子. 腸管出血性大腸菌 026、0111 お
よび 0157 の一斉試験法のコラボレ
イティブスタディによる評価 (1).
第 33 回日本食品微生物学会学術総
会. 平成 24 年 10 月 福岡.

大塚佳代子、門脇奈津子、森 哲也、
高見明代、中川 弘、林昭宏、
上田泰史、小西典子、甲斐明美、

右田雄二、神吉政史、廣井みどり、
磯部順子、齊藤志保子、小西良子、
工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、
0111 および 0157 の一斉試験法のコ
ラボレイティブスタディによる評
価 (2). 第 33 回日本食品微生物
学会学術総会. 平成 24 年 10 月 福
岡.

Wang, L., Wakushima, M., Aota, T.,
Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T.,
Ogasawara, J., Choi, C., Kamata,
Y., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa,
Y. (2012) Specific properties of
enteropathogenic *Escherichia*
coli strains isolated from
diarrheal patients: comparison
with the strains from foods and
fecal specimens of cattle, pigs,
healthy carriers in Osaka City,
Japan. US-Japan Cooperative
Medical Science Program Cholera
and Other Bacterial Enteric
Infections 47th Conference, Chiba,
Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

分 担 研 究 報 告 書

腸管出血性大腸菌の血清群解析および
検査法への応用の検討

大西 真

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

腸管出血性大腸菌の血清群解析および検査法への応用の検討

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所・細菌第一部

研究要旨

日本国内で2007年から2011年にまでにヒトから分離され、感染研・細菌第一部に送付された腸管出血性大腸菌（EHEC, n=14,376）のO血清群の分布を解析したところ、分離頻度の高い血清群は順にO157 (69.3%), O26 (15.5%), O111 (3.3%), O103 (2%), O145 (1.8%), O121 (1.7%), O91 (1.2%), O165 (0.4%) であることが判明した。さらに、O91を除く上記7つのO血清群は重症者（血便または溶血性尿毒症症候群）由来EHECの99%以上を占めることが明らかとなった。従って、食品からのEHEC検出にはこれらの7血清群を優先的に標的にする必要があると考えられる。そこで、これらの7血清群のO抗原遺伝子と、EHECの病原性因子として必須な志賀毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*) に加え、これら7血清群のEHECが共通に保有する接着因子 Intimin をコードする *eae* の計10種類の遺伝子を同時に検出するコンベンショナルなマルチプレックスPCR系の構築を試みた。

研究協力者

伊豫田 淳 国立感染症研究所・細菌第一部
井口 純 宮崎大学・IR推進機構

A. 研究目的

日本国内で分離されるEHECの分離頻度の高い3つの血清群はO157, O26, O111で、これらを標的とした食品からの検査法は通知法となっている。一方、これら以外のO血清群による重症例も国内で数多く報告されており、これらを一括して検出する手法の開発が望まれている。そ

こで本研究では、日本国内で分離されるEHECのうち、重症者由来株として頻度の高いO血清群を明らかにすると共に、それらが保有する病原性遺伝子の情報から、食品から同時に検出すべき病原性遺伝子の情報を提供することを目的とした。さらに、これらの遺伝子の検出系への応用を目指し、コンベンショナルなマルチ

プレックスPCR系を構築することを目的とした。

B. 研究方法

1) 血清型別

デンカ生研またはデンマークの血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) から購入した抗大腸菌 O 血清 (O1-O187: 欠番として O31, O47, O67, O72, O94, O122 の 6 つがあること, SSI の O18, O28, および O112 は因子血清 ab または ac にさらに分類されるため、合計 184 種類存在する) を用いて、日本国内で分離されたヒト由来の EHEC の O 血清群の分布を定法に従って解析した。

2) 重症者の定義

EHEC 感染症の多くは、下痢や腹痛が始まり、重症者では鮮血様の下痢 (血便) から溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) を発症する経過をたどるケースが多い。HUS (判定基準としては血小板減少、溶血性貧血、急性腎不全の 3 主徴とされる) は国内で年間約 100 例程度診断されており、このうち EHEC が分離されるのは約 7 割である。そこで本研究では、血便および (または) HUS を発症している患者を重症者と定義し、これらの患者由来の EHEC 株の O 血清群について集計を行うことにした。

3) マルチプレックス PCR

PCR は定法に従って行った。Taq DNA polymerase は Ex-Taq (TaKaRa) または KAPATaq Extra (NIPPON Genetics) を使用

した。サーマルサイクラーは、ABI 9700 (Perkin Elmer), TaKaRa Dice (TaKaRa), Life Touch Thermal Cycler (Bioer Technology), T1 Thermo cycler (Biometra), DNA Engine (Bio-Rad), または T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) を使用した。詳細な PCR の条件等は図 3 を参照されたい。

O157, O26, O111, O103 の抗原遺伝子と志賀毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*) および *eae* のプライマー配列は既知のものを使用し (図 1)、O121, O145, O165 は本研究で新たにデザインしたものを使用した (論文投稿予定があるため配列は未発表とする)。

4) アガロースゲル電気泳動

バッファーとして 1×TAE (Nippon Gene の 50×TAE を希釈して調製したもの) と TaKaRa LO3 アガロースを用いて Mupid で電気泳動を行った。

C. 研究結果

1) 過去 5 年間における国内で主要な EHEC の分布解析

2007年から2011年までに日本国内でヒトから分離され、感染研細菌第一部に送付された総計 14,376 株の EHEC のうち、9,966 株が O157 (69.3%)、2,228 株が O26 (15.5%)、479 株が O111 (3.3%)、289 株が O103 (2%)、247 株が O121 (1.7%)、265 株が O145 (1.8%)、158 株が O91 (1.2%)、56 株が O165 (0.4%) であった。重症者由来の O 血清群で 2007 年から 2011 年までに合計 10 株以上の分離数があった O 血清

群は上記の 8 つのうち、O91 以外のすべて (O157, O26, O111, O103, O145, O121 および O165) で、これら 7 つの血清群で重症者由来株全体の 99%以上を占めることが判明した。これまでの我々の報告から、これら 7 つの血清群に属する EHEC は *stx1* および (または) *stx2* 以外にも接着因子として Intimin (*eae*) を保有することが明らかとなっている (伊豫田ら、未発表データ)。

2) マルチプレックス PCR

1) で同定した重症者由来の 7 つの O 血清群のうち、O157, O26, O111, O103 の O 抗原遺伝子と、EHEC の必須病原性遺伝子である *stx1* および *stx2*、および Intimin をコードする *eae* 遺伝子の検出用 PCR プライマーとして既知のものを使用した (図 1)。O165, O121, O145 については、抗原決定領域の DNA 配列を独自に決定し、上記のプライマー配列との整合性を考慮してそれぞれを異なる増幅産物のサイズ (O145 は 132 bp, O121 は 193 bp, O165 は 1,160 bp) で検出可能なプライマー配列を設計した。その結果、図 3 で示す条件を用いて、1 チューブ内で 10 種類の遺伝子を異なるサイズの PCR 増幅産物として同時に検出可能なマルチプレックス PCR 法を構築することが可能となった (図 4)。図 3 で示した通り、O157 と O165 はその他の O 抗原遺伝子より 2 倍のプライマー量で増幅することが必要である。

鋳型 DNA としては、各 O 血清群の標準株から DNA 精製キット (キアゲン等)

を用いて調製した DNA、アルカリ処理で処理した DNA (25 mM 水酸化ナトリウム水溶液 100 μ L に LB プレートで 1 晩培養したコロニーを懸濁し、95°C で 5 分間加熱した後、8 μ L の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて中和、10,000 \times g で 1 分間遠心後の遠心上清)、あるいはボイル法で調製した DNA (LB プレートで 1 晩培養したコロニーを懸濁した滅菌精製水を 95°C で 10 分間加熱処理し、10,000 \times g で 1 分間遠心後の遠心上清) のいずれの鋳型を用いた場合においても同様に増幅することが確認された。以上の結果は、用いた Taq DNA polymerase の種類に関わらず (Ex-Taq または KAPATaq Extra のどちらを用いた場合でも) 同じ結果となった。さらに、用いたサーマルサイクラーは方法に記載のいずれの機器を用いた場合でも同じ結果となった。

鋳型 DNA として各 O 血清群が決定している臨床分離の EHEC 株を 10 株ずつ用いたところ、すべての供試株で各 O 血清群の PCR 増幅産物、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が特異的に増幅可能であることが明らかとなり、上記の酵素またはサーマルサイクラーのいずれでも増幅可能であることが明らかとなった。

増幅産物が 10 種類と多いため、O165 の増幅産物は 1,160 bp としてデザインしたが、いずれの条件においても、O165 の抗原遺伝子の増幅効率が他の遺伝子のそれと比較して低いことが判明した。O157 の抗原遺伝子の増幅産物は *stx1* の増幅産

物とサイズが近接しており、アガロース電気泳動の条件によっては識別が難しくなることが判明した。

D. 考察

本研究から、日本国内で 2007 年から 2011 年までにヒトから分離された EHEC のうち、分離頻度の高い EHEC は血清群 O157, O26, O111, O103, O145, O121, O91 または O165 までであることが明らかとなった。これらの主要な O 血清群のうち、O91 は現時点では重症者由来株としては頻度が低いため、その他の 7 血清群が今後の食品検査に重要な EHEC の O 血清群と考えられる。このうち、O121 と O165 は分離数こそ少ないものの、重症例の割合が多いこと、O121 は集団発生の原因株となっていることが多いことから、今後注意を要する。O165 はこれまでに文献的にも海外での重症例はほとんど無い。米国やヨーロッパでは有症者由来の主要な EHEC の O 血清群として、O157, O26, O111, O103, O145, O121 に加え、O165 の代わりに O45 が高頻度で分離されているが、日本国内で O45 の EHEC はほとんど分離されていない。

本年度構築したマルチプレックス PCR 法は 10 種類の遺伝子を異なる増幅産物のサイズで同時に検出できる系である。しかし、以下の点、1) O165 の抗原遺伝子の検出効率が他の遺伝子と比較するとやや弱いこと、2) O157 と *stx1* の遺伝子産物のサイズが近接しているため、電気泳動で

識別が困難な場合があること、3) 本研究で用いている *stx* 検出プライマーのうち、*stx1* のバリエーションである *stx1b*、および *stx2* のバリエーションである *stx2f* がいずれも増幅出来ないこと、などの点について改良が必要であると考えられる。本年度では各 O 血清群の臨分離株 10 株をそれぞれ用いて各 O 群識別のための遺伝子、*stx1/2* および *eae* がそれぞれ特異的な増幅が行われることを確認したが、各プライマーのマルチプレックス検出系における検出感度については解析が行わなかったため、今後の検討が必要である。さらに、他の細菌種が混在していると考えられる臨床検体または食品等からの増菌液を用いた検出感度および特異性についても今後の検討課題である。

上記の 7 つの O 血清群のうち、ヒト由来のものについては H (べん毛) 型が特定のものがほとんどであり、血清型としてはほとんどが O157:H7/H-, O26:H11/H-, O111:H-, O103:H2/H-, O145:H-, O121:H19/H-, または O165:H- のいずれかである。しかし、ヒト以外の動物や環境中から分離されるこれらの O 血清群の EHEC またはそれ以外の大腸菌には他の H 型を保有する株が存在することが報告されており、その分布状況については不明な点が多い。ヒト以外の動物や環境中の EHEC についてはこれら O 血清群の分布状況についても解析を進め、分布状況を明らかにしておく必要がある。今年度構築したマルチプレックス PCR 系を改良

した系を用いた解析によってそれらが明らかになることが期待される。

E. 結論

・2007年から2011年に国内でヒトから分離された EHEC は、頻度の高い順に O157 (69.3%), O26 (15.5%), O111 (3.3%), O103 (2%), O145 (1.8%), O121 (1.7%), O91 (1.2%), O165 (0.4%) であることが判明した。

・2007年から2011年までに重症者（血便または HUS 発症者）由来の EHEC として分離数が 10 以上の血清群は、上記の 8 血清群のうち O91 を除く 7 血清群であることが判明した。食品からの EHEC の検出にはこれら 7 血清群を標的とすることが望ましいと考えられる。

・上記の 7 血清群と *stx1*, *stx2* および *eae* のマルチプレックス PCR 系を構築した。

・今年度構築したマルチプレックス PCR 系は、O165 の遺伝子増幅効率や増幅産物のサイズ、O157 の増幅産物のサイズ等で改良が必要であると共に、特異性および感度についてはさらに詳細な検討が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M; Molecular characterization reveals three distinct

clonal groups among clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O103. *J Clin Microbiol.* 2012. 50: 2894-2900.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし