

201327021A

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25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26(2014)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	19
--------------------------------	----

大西 真

2. 病原大腸菌の統括的検査法の開発	31
--------------------	----

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	61
-------------------------------	----

(3) 多血清群での増菌培養および分離培養の検討	85
--------------------------	----

(4) 腸管出血性大腸菌の試験法のコラボレイティブ・スタディによる検討	97
-------------------------------------	----

3. 病原大腸菌の分布および病原性解析	105
---------------------	-----

西川 禎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	129
---------------------	-----

IV. 若手研究者育成活用事業成果	133
-------------------	-----

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25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

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、（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として、昨年に構築した血清群 0157、026、0111、0103、0121、0145 および 0165 の O 抗原遺伝子、志賀毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*)、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 系の改良を行い、重症例検出における有用性について解析を行った。また、（2）病原大腸菌の統括的検査法の開発として、①食品培養液からの Vero toxin (VT) 遺伝子（または *stx*）検出によるスクリーニング法について、リアルタイム PCR 法、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法、コンベンショナル PCR 法についてインターナル・コントロールを含む優れた系を確立した。②血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 特異的遺伝子を対象とした食品での検出法の具体的な条件を明らかにした。③多血清群株を供試し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて特徴を有する発色性によって対象血清群を一括または鑑別した分離が可能であること、新規に開発された 0103、0121、0145 に対する免疫磁気ビーズの回収率を検討し優れた濃縮効果が明らかになった。④多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価を計画し一部を実施した。日本での腸管出血性大腸菌の主要な血清群を対象にした食品での検査法の開発につながる成果が得られた。さらに、（3）病原大腸菌の分布および病原性解析として、腸管病原性大腸菌の分子疫学指標はウシ由来株と患者由来株の関連を示しており、ブタや健康者の分離株は下痢原性が低い可能性が示唆された。健康者では毒素原性大腸菌の保菌は見つからず、ブタや食鳥が高率に毒素原性大腸菌を保菌している実態が明らかとなった。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病原大腸菌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
張 少博	大阪市立大学大学院生活科学研究科
王 麗麗	大阪市立大学大学院生活科学研究科
坂 瑛里香	大阪市立大学大学院生活科学研究科

松崎壮宏	大阪市立大学大学院生活科学研究科
藤原佐美	独) 国立病院機構 大阪南医療センター
若林明世	兵庫県食肉衛生検査センター
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	大阪市食肉衛生検査所
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
原田 誠	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
上田泰史	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
岩渕香織	岩手県環境保健研究センター
菊地理慧	福島県衛生研究所
山崎匠子	杉並区衛生試験所
富田敦子	静岡市環境保健研究所
楠原 一	三重県保健環境研究所
山田裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
齊藤志保子	秋田県健康環境センター
磯部順子	富山県衛生研究所
古川一郎	神奈川県衛生研究所
権平文夫	デンカ生研株式会社
佐々木美智子	国立医薬品食品衛生研究所
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。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 0 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。昨年度の研究において、日本での主要な血清群を決定し、それらを対象と

した食品での検査法を確立するために今年度に各種方法の検討を行った。本年度も（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）に分担研究として取り組んだ。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（下痢原性大腸菌）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調査を行い、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。

なお、本報告書ではこれまでの報告や試薬名の表現に従い、VT 遺伝子または *stx* の両方の表現を使用している。

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

日本国内で分離されたヒト由来の腸管出血性大腸菌の 0 血清群の分布を定法に従って解析した。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った。また、7 血清群の 0 抗原遺伝子、腸管出血性大腸菌の病原性因子として必須な志賀毒素遺伝子（*stx1* および *stx2*）および 7 血清群の腸管出血性大腸菌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

系について、昨年度構築した系の改良を行うと共に、実際の重症例検出における有用性について解析を行った。

（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

菌液での検討では血清群 026 および 0111 の各 2 株、0157 の 1 株を、食品での検討では血清群 0157 の 5 株を試験に供試した。食品検体（牛挽肉、牛レバー、豚スライス、ヤギ・ナチュラルチーズ、レタス、カイワレダイコン、トマト、ホウレンソウ）と 9 倍量の mEC 培地を $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養した。菌液および食品培養液での 10 倍階段希釈液を作製しアルカリ熱抽出法にて DNA 液を調製した。自家調製試薬では、リアルタイム PCR 法の *stx1* および *stx2* は Nielsen らの方法を、*eae* および 16SrRNA は米国農務省（USDA）法を参照し、コンベンショナル PCR 法の *stx1*、*stx2* および *eae* については欧州食品安全機関（EFSA）法を、16SrRNA については USDA 法を参照した。リアルタイム PCR 法、コンベンショナル PCR 法および loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の各種試作キットについても検討した。

2. 多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

菌液での検討では血清群 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の各 2 株、食品での検討では血清群 0157 の 5 株を試験に供試した。食品検体は、前述の 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、と同様に培養した。自家調

製試薬では、リアルタイム PCR 法は、0157 については EFSA 法を、0157 以外の 5 血清群については USDA 法を参照した。LAMP 法は、Wang らの方法を参照し、また市販キットについても検討した。

3. 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

VT 産生性 (87 株) および非産生性 (3 株) 大腸菌の計 90 株 (25 種類の O 血清群と OUT) を mEC 培地中での 42°C で 22 時間培養後の増殖の確認に、これらに加えて 64 株 (計 154 株) を 10 種類の酵素基質培地でのコロニー形態および生育性の確認に供試した。また、新規に開発された血清群 0103、0121、0145 に対する試作免疫磁気ビーズの回収率を検討した。

4. 腸管出血性大腸菌の試験法のコラボレイティブ・スタディによる検討

本分担研究の他協力研究において検討されている増菌培養法、遺伝子検出法、免疫磁気ビーズ法、分離培養法の結果を鑑みてコラボレイティブ・スタディの方法の各項目を検討した。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

平成 24・25 両年度の下痢症患者便 595 検体、健康者便 313 検体、食用鶏の盲腸便 200 検体とブタの便 110 検体の合計 1218 検体を検査に供した。

各検体の増菌培養液からの 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。

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

日本国内で 2012 年から 2013 年 11 月までにヒトから分離された腸管出血性大腸菌 (n=5,790) を解析したところ、分離頻度の高い O 血清群は順に 0157、026、0111、0103、0121、0145、091、0165、であり、091 を除く上記 7 つの O 血清群は、重症者由来株の 95% 以上を占めることが明らかとなった。また、昨年度に開発した 7 つの O 血清群マルチプレックス PCR の 0165 プライマーを改良し、0165 感染による HUS 事例および 0157、026、0121 同時感染 HUS 事例において便培養検体からの遺伝子検出結果によって菌分離に至った。

(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

はじめに菌液を供試して、リアルタイム PCR 法およびコンベンショナル PCR 法を検討し、得られた優秀な条件をもとに食品培養液中での検討を行った。なお、市販食品での *stx* および *eae* の検出率を調査した結果、両方を測定する効果が低いことが判明し、食品での検討では *eae* を含めない系で検討した。自家調製試薬でのリアルタイム PCR 法における duplex 反応系の各種機器による検出感度の検討

では、*stx* および 16SrRNA とともにいずれの食品でも、またいずれの機器でもおおむね高い検出感度であった。試作キットでの LAMP 法におけるインターナル・コントロールの検出および duplex 反応系試作キットでのコンベンショナル PCR 法における *stx* も良好に検出された。

2. 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

菌液での検討で得られた優秀な条件をもとに食品培養液中での検討を行った。リアルタイム PCR 法の duplex 反応系における各種機器での検討では、8 種類のいずれの食品においても、また検討した 5 機種の内いずれにおいても、3 種類の duplex 反応系のいずれも 10^4 cfu/ml 以上の感度であることが確認された。また、LAMP 法における自家調製試薬および市販キットでの適切な反応温度が判明した。

3. 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

増菌培地の検討では、mEC 培地中で 0103、0121 および 0145 は十分に増殖することが確認された。分離培養の検討では、弱選択性の 6 種類の培地では、クロモアガー-STE_C、クロモアガー-0157、Vi RX026 および BCM0157 はそれぞれ 2、3 種類の色に分かれたが、クロモアガー-026/0157 およびレインボーアガー-0157 では多様な色を呈した。強選択性の 4 種類の培地では、いずれの培地も主要な 6 血清群以外の多くの大腸菌の生育は抑制され、6 血清群が効率的に分離されることが期待できた。免疫磁気ビーズ法の検討では、6 血清群ともに牛挽肉培養液中で約 21 から 60%と

ビーズ法による回収率としては優れていた。

4. 腸管出血性大腸菌の試験法のコラボレイティブ・スタディによる検討

各回 2 血清群を対象として 6 血清群を 3 回にわけてコラボレイティブ・スタディを 12 試験研究機関の協力のもとに実施することとした。試験方法は、検体に mEC 培地にて 42 ± 1 °C、 22 ± 2 時間培養し、リアルタイム PCR 法による *stx*/インターナル・コントロール検出、O 抗原遺伝子検出、免疫磁気ビーズ法後に選択分離培地に塗抹し、培養後に生育したコロニーを免疫血清またはラテックス試薬にて凝集反応を確認した。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

腸管病原性大腸菌は、先に報告したウシやブタと同程度の高い頻度で食用鶏の盲腸便から検出された。STE_C は平成 24・25 年度の健康者便からは検出されなかったが、患者では 2 検体が陽性となった。これら 2 検体は *eae* 陰性であり、定型的な腸管出血性大腸菌とは異なっていた。腸管毒素原性大腸菌はブタとニワトリからの検出率が高く、ST 遺伝子 (*est*) はブタ検体から、LT 遺伝子 (*eIt*) はニワトリからより多く検出される傾向が見られた。ブタの 6 検体は腸管毒素原性大腸菌の毒素遺伝子と腸管病原性大腸菌の *eae* が同時に陽性となっていた。ヒト健康者からは全く検出されず低率ではあるが下痢症患者からのみ検出された

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腸管出血性大腸菌の 0 血清群と考えられる。本年度の研究から、本研究で構築したマルチプレックス PCR 検出系は、他の細菌種が混在していると考えられる患者便からの増菌液においても十分使用可能であることが、少なくとも 0157、026、0121、0165 の抗原遺伝子、*stx2*、*eae* の病原性遺伝子の検出について明らかとなった。今後も継続して同様な検体におけるマルチプレックス PCR 検出系の評価を行う必要がある。

(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

今年度では、経済性をさらに高めることを考え、現通知法における *stx2* 検出用プローブ濃度を半減し経済性を高めることが可能であることが明らかになった。また、インターナル・コントロールを設定した自家調製試薬またはキットのリアルタイム PCR 法、LAMP 法およびコンベンショナル PCR 法を検討し、優れた検出感度の方法が設定された。本研究および研究分担者（西川禎一教授）の調査結果での *stx* および *eae* の食品や家畜などからの検出率、1 次スクリーニングの対象遺伝子がひとつ多いことによる使用機器の限

定や反応試薬のコストの上昇などを鑑みると、*eae* を検出対象の遺伝子に含まない方が合理的であると考えられた。

2. 多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

Duplex リアルタイム PCR 法は、対象遺伝子の組み合わせによって検出性が劣る場合もあり、これは遺伝子増幅の組み合わせに原因があるとも考えられた。また、機器によって使用する蛍光試薬を考慮した方が高い蛍光強度やベースラインの安定が認められる場合も示された。さらに、食品によっては、duplex リアルタイム PCR 法のいくつかの反応系において検出感度が複数の機器で 10^4 cfu/ml であるものもあった。複数機関で食品または機器を分担して実施しており、DNA 抽出や反応が同時でない場合もあるため、さらに試験回数を増やすなどの検討も重要であると考えられる。本研究では、リアルタイム PCR 法については自家調製試薬を中心に多様な機種を含めて経済性および汎用性も考慮した上で、食品での検出感度の優れる反応系を検討した。一方で、市販キットの使用も試験の試薬調製や反応手順などを簡易化する上で重要であるため、今後の開発が待たれる。

3. 多血清群での増菌培養および分離培養の検討

mEC 培地での 42°C 培養下にて概ね腸管出血性大腸菌が増殖することが明らかになった。また、酵素基質培地での発色性を利用した分離法として、① CT などの選択剤を加えて選択性を強めた培地が有用であることが示された。また、② 血清

群を鑑別せずに単色または2、3の指標となる色によって分離した後に血清群を確認する方法、ある程度は血清群を鑑別する培地を使用して分離する方法のふたつの方向性が示された。O165は重症化率も高く6血清群に次いで患者から分離される重要な血清群であるが、CTに感受性が高く他の選択分離培地においても生育が弱いことから食品からの分離には新たな培地の開発が必要であると考えられた。さらに、新たに開発されたO103、O121およびO145の免疫磁気ビーズでの回収率は良好であり、食品からの検出において効果的であることが期待される。

4. 腸管出血性大腸菌の試験法のコラボレイティブ・スタディによる検討

本研究では、12機関ではあるが食肉と野菜について実検体での汚染が想定される菌数レベルを鑑み低菌数および高菌数レベルの2段階を設定した。各血清群について各機関での試験検体数を12検体とし、感度および特異性を検討することとした。今後、6血清群全てについてのコラボレイティブ・スタディを行う予定である。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

本研究の結果から、ウシやブタのみならず食用のニワトリも高率に腸管毒素原性大腸菌に汚染されていることを示唆している。また、健康なブタから比較的高率に検出された腸管毒素原性大腸菌遺伝子陽性検体が、ブタのみに感染する本菌に由来するものか、あるいはヒトの汚染源となる可能性があるのか否か、今後検

討する必要がある。以前からニワトリに下痢症を起こす腸管毒素原性大腸菌があることは報告されていたが、今回の調査において健康な食鳥の盲腸便から予期したよりも高い率で腸管毒素原性大腸菌遺伝子が検出された。トリの検体でLT遺伝子が単独で検出される率が高かったことも先行研究と関連する可能性がある。

E. 結論

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、(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として、昨年に構築した血清群O157、O26、O111、O103、O121、O145およびO165のO抗原遺伝子、志賀毒素遺伝子（*stx1* および *stx2*）、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系の改良を行い、重症例検出における有用性について解析を行った。また、(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発として、①食品培養液からのVT遺伝子（または*stx*）検出によるスクリーニング法について、リアルタイムPCR法、LAMP法、コンベンショナルPCR法についてインターナル・コントロールを含む優れた系を確立した。②血清群O26、O103、O111、O121、O145およびO157特異的遺伝子を対象とした食品での検出法の具体的な条件を明らかにした。③多血清群株を供試し、選択剤を添加した複数種類の酵素基質培地にて特徴を有する発色性によって対象血清群を一括または鑑別した分離が可能であること、新

規に開発された 0103、0121、0145 に対する免疫磁気ビーズの回収率を検討し優れた濃縮効果が明らかになった。④多機関によるコラボレイティブ・スタディによる評価を計画し一部を実施した。日本での腸管出血性大腸菌の主要な血清群を対象にした食品での検査法の開発につながる成果が得られた。さらに、(3)病原大腸菌の分布および病原性解析として、腸管病原性大腸菌の分子疫学指標はウシ由来株と患者由来株の関連を示しており、ブタや健康者の分離株は下痢原性が低い可能性が示唆された。健康者では毒素原性大腸菌の保菌は見つからず、ブタや食鳥が高率に毒素原性大腸菌を保菌している実態が明らかとなった。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病原大腸菌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

Isobe J, Shima T, Kanatani JI, Kimata K, Shimizu M, Kobayashi N, Tanaka T, Iyoda S, Ohnishi M, Sata T, Watahiki M. Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic

Escherichia coli O111 and O157. J. Clin. Microbiol. In press

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

Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Kamata, K., Miyahara, M., Takatori, K., Onoue, Y. Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. Prevalence of main foodborne pathogens in retail food under the National Food Surveillance System in Japan. Food Addit. Contam. Part A, Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 30(8): 1450-1458, 2013.

Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Ogata, K., Saito, S., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S. Differences in the stress tolerances of *Vibrio parahaemolyticus* strains due to their source and harboring of virulence genes. J. Food Prot. 76:1456-62, 2013.

Kobayashi, N., Lee, K., Yamazaki, A., Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., Maeda, E., Isobe, J., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga

- toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 51: 4022-4028, 2013.
- Jones, J. L., Benner, R. A., DePaola, A. and Hara-Kudo, Y. *Vibrio* densities in the intestinal contents of finfish from coastal Alabama. Agriculture, Food and Analytical Bacteriology. 3: 186-194, 2013.
- 工藤由起子、小田みどり. 第2節 生肉のリスク 原因菌と食中毒事件. 第3章 生食のリスクとは. 一色賢司 監修 生食のおいしさとリスク.p. 329-337. (株) エヌ・ティー・エス 東京.
- 工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査法の変遷と今後. 食品衛生研究. Vol. 63, p25-34, 2013.
- 工藤由起子. 食品での腸管出血性大腸菌検査法の最新の動向について. 日本食品微生物学会雑誌. 日本食品微生物学会雑誌. Vol. 30, 89-92, 2013.
- 小林直樹、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の分子生物学的研究と食品での検査法の発展. 日本食品微生物学会雑誌. 30(3):147-155. 2013年.
- Komura, T., Ikeda, T., Yasui, C., Saeki, S., and Nishikawa, Y. (2013) Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*. Biogerontology 14: 73-87. doi: 10.1007/s10522-012-9411-6
- Nakamura, H., Takakura, K., Sone, Y., Itanol, Y., and Nishikawa, Y. (2013) Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. J. Food Prot. 76 (7) : 1179-1186.
- 菊田英明、涌嶋三津子、西川禎一. (2013) 小児の散発性下痢症から分離され、O群血清型分類が可能であった大腸菌の病原遺伝子保有率の評価. 小児感染免疫25 (4) : 413-419.
- Yaguchi, Y., Komura, T., Kashima, N., Tamura, M., Kage-Nakadai, E., Saeki, S., Terao, K., Nishikawa, Y. (2014) Influence of oral supplementation with sesamin on longevity of *Caenorhabditis elegans* and the host defense. Eur. J. Nut. DOI: 10.1007/s00394-014-0671-6
2. 学会発表
- 工藤由起子、長尾清香、小林直樹. 多血清群の腸管出血性大腸菌の病原因子遺伝子およびO抗原特異的遺伝子検出法の検討. 第106回日本食品衛生学会学術講演会. 平成25年11月.
- 工藤由起子. 多血清群の腸管出血性大腸菌試験法の検討. 食品衛生登録検査機関協会平成25年度微生物研修会. 平成25年12月
- Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Konishi, N., Mori, T., Nakagawa, H., Iizuka, S., Taga, K., Kai, A. Universal enrichment followed by real-time PCR assay and plating for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in food. 127th AOAC

- Annual meeting and exposition. Aug. 25-28, 2013. Chicago, USA.
- 小林直樹、齊藤志保子、古川一郎、河野智美、青木佳代、前田詠里子、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子。腸管出血性大腸菌の病原因子保有パターンと臨床症状の対応についての解析。第105回日本食品衛生学会。平成25年5月。
- 小林直樹、前田詠里子、河野智美、齊藤志保子、古川一郎、青木佳代、江藤良樹、堀川和美、小西良子、工藤由起子。腸管出血性大腸菌の高病原性の指標となる病原因子についての解析。第17回腸管出血性大腸菌感染症研究会。平成25年7月。
- 李謙一、N. P. French、工藤由起子、伊豫田淳、小林秀樹、小西良子、局博一、熊谷進。多変量解析によるヒトまたはウシ由来志賀毒素産生性大腸菌0157の遺伝的差異の究明。第17回腸管出血性大腸菌感染症研究会。平成25年7月。
- 小林直樹、李謙一、小西良子、工藤由起子。集団解析により明らかになった腸管出血性大腸菌の高病原性 genotype。第15回日本進化学会。平成25年8月。
- 森哲也、市川希美、難波豊彦、吉成知也、工藤由起子。ゼリー状飲料の細菌試験における課題。第34回日本食品微生物学会学術総会。平成25年10月。
- 小西典子、森哲也、中川弘、大塚佳代子、小林直樹、長尾清香、甲斐明美、工藤由起子。複数のリアルタイムPCR機器を用いた食品培養液中VT遺伝子検出感度の検討。第34回日本食品微生物学会学術総会。平成25年10月。
- 長尾清香、小林直樹、工藤由起子。大腸菌のO抗原特異的遺伝子を対象としたマルチプレックス・リアルタイムPCR法の検討。第34回日本食品微生物学会学術総会。平成25年10月。
- 小林直樹、江藤良樹、前田詠里子、齊藤志保子、古川一郎、工藤由起子。臨床症状の異なる腸管出血性大腸菌株間での病原性と遺伝型の解析。第106回日本食品衛生学会。平成25年11月。
- 大塚佳代子、中川弘、森哲也、小西典子、甲斐明美、小林直樹、長尾清香、工藤由起子。食品からのベロ毒素遺伝子検出に使用するリアルタイムPCR機器及び試薬の組み合わせと反応条件の検討。第106回日本食品衛生学会学術講演会。平成25年11月。
- 齊藤志保子、古川一郎、磯部順子、長尾清香、小林直樹、工藤由起子。各種血清群の腸管出血性大腸菌の酵素基質培地における生育性およびコロニーの特徴的形態の検討。第106回日本食品衛生学会学術講演会。平成25年11月。
- Ban, E., Yoshida, Y., Wada, T., Ichikawa, N., Hamabata, T., Wajima, T., and Nishikawa, Y. (2013) DNA sequence and analysis of virulence plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41 that adhere to HEp-2 cells in unique aggregative manner. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) 2013: 5th Congress of

- European Microbiologists, Leipzig, Germany, Abstract: 124. 2013/7/21-25
- Matsuzaki, T., Tanimoto, Y., and Nishikawa Y. (2013) IL-8 secretion induced by flagellin in HEK-293 cells and the inhibition by diffuse adherent *Escherichia coli*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) 2013: 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, Abstract: 298. 2013/7/21-25
- 坂 瑛里香、吉田優香、和田崇之、市川直樹、濱端 崇、輪島丈明、西川禎一. HEp-2細胞に対して特異な凝集接着を示す腸管毒素原性大腸菌O169:H41の病原性プラスミドのDNAシーケンス、第34回日本食品微生物学会学術総会、平成25年10月3-4日 東京 p. 42
- 矢口由紀恵、小村智美、加嶋倫子、田村美帆、寺尾啓二、西川禎一. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) におけるセサミンの寿命延長機構に関する研究、日本栄養・食糧学会第52回近畿支部大会、平成25年10月26日 滋賀県立大学 p. 34
- 田村美帆、小村智美、加嶋倫子、矢口由紀恵、西川禎一. 抗酸化物質が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の酸化ストレスに与える影響、日本栄養・食糧学会第52回近畿支部大会、平成25年10月26日 滋賀県立大学 p. 34
- 藤原翔吾、鍋島明日香、寺尾啓二、西川禎一. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) におけるアスタキサンチンの寿命延長効果、日本栄養・食糧学会第52回近畿支部大会、平成25年10月26日 滋賀県立大学 p. 41
- 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

研究課題名(課題番号):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(24220901)

平成25年度 分担研究報告書

分担研究課題名:「腸管出血性大腸菌のO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)

研究要旨

日本国内で2012年から2013年11月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=5,790)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(58.8%), O26(19.9%), O111(5.6%), O103(4.2%), O121(3.3%), O145(3.1%), O91(0.92%), O165(0.41%), その他(3.4%)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2007-2011年までと同様、重症者(血便または溶血性尿毒症症候群)由来EHECの95%以上を占めることが明らかとなった。従って、日本国内における食品からのEHEC検出には依然としてこれらの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。これら7血清群のO抗原遺伝子, 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*) および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系について、昨年度構築した系の改良を行うと共に、実際の重症例検出における有用性について解析を行った。

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既に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、これらのO血清群に属するEHEC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血清群を継続的に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O抗原遺伝子および病原性遺伝子の情報を提供することを目的としている。さらに、これらの遺伝子の検出系への応用を目指し、7つの主要O血清群(O157, O26, O111, O103, O121, O145, O165)のEHECを包括的に検出可能な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ている。

B. 研究方法

1) 大腸菌の血清型別

大腸菌の血清型は菌体膜表層の糖鎖抗原(O抗原)とべん毛抗原(H抗原)の組み合わせ(O:H)で決定される。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 があり、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に始まり、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 (診断基準として、血小板減少、溶血性貧血、急性腎不全の 3 主徴) 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った。

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 の条件等は以下を参照されたい。

O157, O26, O111, O103 の抗原遺伝子と志賀毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*) および接着因子 Intimin をコードする *eae* のプライマー配列は既知のものを使用し、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。

5) HUS 患者血清における抗大腸菌抗体価解析

EHEC 検査マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC.pdf>) に記載の方法によって HUS 患者血清中の 7 つの主要 O 血清群の抗体価について解析を行った。

C. 研究結果

1) 2012-2013 年における主要な EHEC の分布解析

日本国内で 2012 年から 2013 年 11 月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=5,790) 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 (58.8%), O26 (19.9%), O111 (5.6%), O103 (4.2%), O121 (3.3%), O145 (3.1%), O91 (0.92%), O165 (0.41%), OUT (0.9%), その他 (2.5%) であることが判明した (資料 1)。さらに、O91 を除く上記 7 つの O 血清群は重症者由来 EHEC の 95% 以上を占めることが明らかとなった。これまでの我々の報告から、これら 7 つの O 血清群に属する EHEC は *stx1* および (または) *stx2* 以外にも接着遺伝子として *eae* を保有することが明らかとなっている。2012-2013 年では 7 大血清群に続いて重症者由来株として多い O 血清群として O55 (総分離数 8, 血便由来分離数 3), O91 (総分離数 53, 血便由来分離数 2), OUT (総分離数 52, 血便由来分離

数 3) となっており、これら以外は、O 群ごとに血便由来株数が 1 以下であった（詳細は省略）。

2) マルチプレックス PCR の改良

昨年度構築したマルチプレックス PCR 系と同様、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 プライマーは既知のものを使用した（資料 2）。O121, O145, O165 の抗原遺伝子のうち、O121 と O145 については、昨年度独自にデザインしたプライマーを使用した。O165 については昨年度デザインしたプライマー（1,160 bp の増幅産物）では増幅感度が低かったため、新たに 1,042 bp の増幅産物が得られるプライマーをデザインした（反応条件については資料 3 の通り）。その結果、O165 の検出感度が従来よりも上昇したマルチプレックス PCR 系を構築することが出来た（資料 4, 5）。

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いずれの機器を用いた場合でも同じ結果となった。

3) マルチプレックス PCR の特異性の解析

2) で構築した新規マルチプレックス PCR 系の特異性を確認するため、以下 a) から c) までの実験を行った。

a) 7 大 O 群 EHEC 分離株を用いた解析

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 血清群の抗原遺伝子、*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、この結果は上記の酵素またはサーマルサイクラーのいずれでも再現可能であることが明らかとなった。

b) 7 大 O 血清群以外すべての大腸菌 O 群標準株を用いた解析

研究方法の 1) で述べたように、大腸菌の O 群は全 184 種類定義されている。そこで、上記の 7 大 O 群以外の O 群すべての標準株（感染研保存株）を用いて新規マルチプレックス PCR 系の特異性の解析を行った。その結果、他の O 抗原標準株では非特異的な PCR 産物は出現せず、7 大 O 群の抗原遺伝子がそれぞれ特異的に増幅されることが明らかとなった。

c) HUS 患者便検体からの増菌液を用いた解析

2013 年に国内で発生した散発 HUS 症例のうち、感染研・細菌第一部における EHEC 分離事例において上記の新規マルチプレックス PCR 系を応用した。

① O165 感染による HUS 事例における検出例

散発 HUS 患者血清中の抗体価の解析から、O165 抗原に対する血中抗体価の上昇が確認された。この患者便から Trypcase Soy broth (TSB) 培地による液体増菌を行

った後、アルカリ法にて DNA を抽出し、本研究で構築した新規マルチプレックス PCR 法を試した。その結果、O165 抗原遺伝子、*stx2*, *eae* が同時に検出されることが確認された（データ省略）。以上の結果を受けて菌分離を試みたところ、実際に O165 の EHEC（いずれも *stx2* と *eae* の両方が陽性）が実際に分離された。

②O157, O26, O121 同時感染 HUS 事例における検出例

散発 HUS 患者血清中に 3 種類の抗大腸菌抗体（O157, O26, O121）が同時に検出される事例が血清診断法による解析から明らかとなった。この患者便から TSB による増菌を行った後、①と同様に鋳型を作製して新規マルチプレックス PCR 法を試した。その結果、O26, O157, O121 の抗原遺伝子と *stx1*, *stx2* および *eae* の病原性遺伝子が同時に検出されていることが判明した（資料 5）。以上の結果を受けて菌分離を試みたところ、実際に O157, O121 の EHEC（いずれも *stx2*, *eae* の両方が陽性）と O26 の腸管病原性大腸菌（enteropathogenic *E. coli*: EPEC; *stx* 陰性, *eae* 陽性）が上記の TSB 増菌液から分離されることが判明した。

以上①②の結果は、本研究で構築した新規マルチプレックス PCR 法が臨床検体からの検出法として便培養液を使用した場合においても有効であることを示している。

D. 考察

本研究から、日本国内で 2012 年から 2013 年 11 月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, O121, O145, O165, O91 であることが明らかとなった。このうち、重症例由来株が 10 株以上あった主要

な 7 つの O 血清群(O157, O26, O111, O103, O121, O145, O165)が引き続き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、いずれも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、今後も注意を要する。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。

本年度改良を行っ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り、昨年度検出効率が低いとされた O165 の抗原遺伝子についてもプライマーを再度デザインすることによって検出効率が上昇した。一方、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、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、などの点について今後改良が必要であると考えられる。本年度の研究から、本研究で構築したマルチプレックス PCR 検出系は、他の細菌種が混在していると考えられる患者便からの増菌液においても十分使用可能であることが、少なくとも O157, O26, O121, O165 の抗原遺伝子、*stx2*, *eae* の病原性遺伝子の検出について明らかとなった。今後も継続して同様な検体におけるマルチプレックス PCR 検出系の評価を行う必要がある。

上記の 7 つの O 血清群のうち、ヒト由来