

201426010A

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26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27(2015)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	27
------------------------------	----

工藤 由起子

(1) 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 . . .	35
---	----

(2) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎的検討	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	141
-------------------------------	-----

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26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、①2013年12月から2014年12月に国内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌は、分離頻度の高い順に0157、026、0145、0103、0121、0111、091、0165、であること、②重症者由来株は上記の8血清群のうち091を除く7血清群であること、③マルチプレックスPCR検出系は患者便からの検出法として、少なくとも0157、0165の抗原遺伝子、*stx2*、*eae*について応用可能であること、④抗原遺伝子が同定できれば、免疫磁気ビーズを用いた菌分離が可能であること、が明らかになった。また、（2）病原大腸菌の統括的検査法の開発として、コロボレイティブ・スタディにて、増菌培養、免疫磁気ビーズ法、選択分離培地の組み合わせによる分離培養および遺伝子検出によって腸管出血性大腸菌6血清群が総じて比較的高率に検出されることが確認された。これによって効率的な腸管出血性大腸菌の検査法を策定に貢献した（食安監発1120第1号 平成26年11月20日発「腸管出血性大腸菌026、0103、0111、0121、0145及び0157」）。腸管毒素原性大腸菌の増菌培養には腸管出血性大腸菌の試験法と同じく増菌培養はmECでの42℃培養が優れることが示された。今後、より正確にスクリーニング法（リアルタイムPCR法など）や優れる選択培地の開発が必要であることが明らかになった。さらに、（3）病原大腸菌の分布および病原性解析として、腸管病原性大腸菌は腸管出血性大腸菌よりもはるかに高い率で家畜から家禽にいたるまで分布することが判明し、腸管毒素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。

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
鄭 冬明	大阪市立大学大学院生活科学研究科
李 茂	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
岡畑一幸	兵庫県食肉衛生検査センター
鈴木雅和	兵庫県食肉衛生検査センター
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
佐伯厚記	大阪市食肉衛生検査所
前原智史	大阪市食肉衛生検査所
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
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
牧島満利子	杉並区衛生試験所
山崎匠子	杉並区衛生試験所
榎原広里	静岡県環境保健研究所
鈴木史恵	静岡県環境保健研究所
金谷潤一	富山県衛生研究所
磯部順子	富山県衛生研究所
永井佑樹	三重県保健環境研究所
増田加奈子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
山田裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
坂本 綾	広島市衛生研究所
田内敦子	広島市衛生研究所
上田泰史	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
稲垣俊一	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
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
高田 薫	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 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。昨年度までに、日本での主要 6 血清群について食品での検査法の各項目について検討した。今年度はコラボレイティブスタディーを実施し、通知法（食安監発 1120 第 1 号 平成 26 年 11 月 20 日発「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157」）策定に貢献した。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（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推定のための研究を実施した。

研究組織としては、(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）、(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析（西川禎一）の 3 つの分担研究とした。

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

1. 日本国内で分離されたヒト由来株の O 血清群の分布を定法に従って解析した。
2. 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、これらの患者由来株の O 血清群について集計した。

3. 0157、026、0111、0103 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、0121、0145、0165 は本研究で新たにデザインしたものを使用し、マルチプレックス PCR を構築した。

4. HUS 患者血清における抗大腸菌抗体価解析を行った。

5. 0165 および 076 の免疫磁気ビーズを調製し、増菌培養液に混合して各 O 群の大腸菌を濃縮した。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 腸管出血性大腸菌の試験法のコラボレイティブ・スタディーによる検討

13 試験検査機関において試験対象 6 血清群を 3 回に分けて実施された。腸管出血性大腸菌接種の牛挽肉、カイワレダイコンを検体とした。mEC 培地を加え 42°C にて 22±2 時間培養し、培養液をアルカリ熱抽出法に供した。得られた DNA 液をリアルタイム PCR (VT 遺伝子、IC および O 抗原遺伝子を検出) に用いた。また、培養液を免疫磁気ビーズ法に供し、濃縮液を CT-SMAC 寒天培地および CT-クロモアガー-STEC 寒天培地に画線した。培養後、生育したコロニーを観察し免疫血清またはラテックス凝集試薬にて凝集反応を確認した。結果は集計され、検出方法間の有意差検定 (χ^2 乗検定) にて解析された。

2. 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

毒素原生大腸菌を、牛挽肉、カイワレ

ダイコン 25 g に接種した。その後、mEC 225 mL を加え、42°C にて 22 時間培養した。検体培養液を SMAC、CT-SMAC 各 1 枚に画線し、37°C にて培養し、生育した大腸菌と思われるコロニーから DNA を抽出し ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。また、食品培養液からの DNA 液を ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

大阪府および兵庫県での下痢症患者便、健康者便、食用鶏の盲腸便、ブタの便を検査に供した。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

2013 年 12 月から 2014 年 12 月に国内でヒトから分離された株は、分離頻度の高い順に 0157 (58.1%)、026 (23%)、0145 (4.7%)、0103 (4%)、0121 (2.9%)、0111 (2.8%)、091 (0.8%)、0165 (0.3%)、その他 (3.5%) であることが判明した。さらに、2013 年から 2014 年までに重症者 (血便または HUS 発症者) 由来株として分離

数が 5 以上の血清群は、上記の 8 血清群のうち 091 を除く 7 血清群であることが判明した。また、HUS 患者便検体からの増菌液を用いた解析において、マルチプレックス PCR 検出系は患者便からの検出法として、少なくとも 0157、0165 の抗原遺伝子、*stx2*、*eae* について応用可能であることが明らかとなった。さらに、病院の検査室において腸管出血性大腸菌が分離の散発 HUS 患者検体の解析において、主要 7 血清群以外についても 0 抗原遺伝子が同定できれば、特異的な免疫磁気ビーズを用いた菌分離が可能であり、実際に *stx2*、*eae* 陽性の 076 の HUS 症例が検出された。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発 1. 腸管出血性大腸菌の試験法のコラレイティブ・スタディによる検討

血清群 0157・026 では、牛挽肉での低・高菌数接種、カイワレダイコンでの高菌数接種の検出感度は、VT 遺伝子、0 抗原遺伝子および免疫磁気ビーズ法で 1.00、カイワレダイコンでの低菌数接種は各検出法において 0.86 以上であった。血清群 0103・0111 では、牛挽肉での低菌数接種は、0103 の 0 抗原遺伝子で 0.91、免疫磁気ビーズ法で 0.96、その他各検出法は 1.00、高菌数接種ではいずれの検出法も 1.00、カイワレダイコンでの低菌数接種は、各検出法 0.64 以上、高菌数接種ではいずれの検出法も 1.00 であった。血清群 0121・0145 では、牛挽肉での低・高菌数接種はいずれの検出法も 1.00、カイワレダイコンでの低菌数接種は、0121 のビーズ法で 0.55、その他各検出法は 0.73 以上、

高菌数接種では0121の免疫磁気ビーズ法で0.86、その他各検出法は1.00であった。統計解析を行った結果、血清群026、0103、0111、0145および0157については、いずれの検出法も同等の検出率が期待できることが示唆された。血清群0121については、汚染菌数が低い検体で遺伝子検出法が培養法よりも検出性が優れる場合があることが示された。しかし、比較的汚染菌数が高い場合は、どの検出法についても同等の検出率が期待できることが示された。

2. 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

牛挽肉およびカイワレダイコンともにmEC培地での増菌培養で十分に腸管毒素原性大腸菌が増殖したと考えられた。牛挽肉では、SMACでの分離が優れていたが、カイワレダイコンではSMACおよびCT-SMACでは分離が難しいことが明らかになった。

(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。

腸管毒素原性大腸菌はブタからの検出率が高く、各年度ともに*est*が*elt*よりも2倍近い検出率であった。ニワトリの腸管毒素原性大腸菌保菌に注目し調査を進めたが、今年度は検出されなかった。腸管毒素原性大腸菌の毒素遺伝子3種類の内訳を見たところ、ST2種にLTの遺伝子を合わせて3種全てがブタの5検体、ST2種が8検体、ST1種またはLTがそれ

ぞれ16検体から検出された。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。ヒト健康者から腸管毒素原性大腸菌は全く検出されず、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2013年12月から2014年12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0157、026、0145、0103、0121、0111、091、0165であることが明らかとなった。このうち、重症例由来株が5株以上あった主要な7つのO血清群(0157、026、0111、0103、0121、0145、0165)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。

また、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、0165の抗原遺伝子、*stx1*、*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。

さらに、今年度はHUS症例の1つから、EHEC 076を検出した。主要7血清群のみならず、O抗原遺伝子が検出されれば、当該抗大腸菌O血清を用いて免疫磁気ビーズによる濃縮培養が可能となることから、今回076を分離した同様な手法で菌の分

離が可能になるものと考えられる。

(2) 病原大腸菌の統括的検査法の開発

1. 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

高菌数接種レベルの菌数であればいずれの方法でも高率に検出されることが判明した。低菌数接種 (4.3-5.8 cfu/25 g) では、牛挽肉において血清群 O103 の O 抗原遺伝子検出リアルタイム PCR 法、免疫磁気ビーズ法で検出感度が 0.917 であったが、他の血清群と検出法の組み合わせで検出感度が 1.0 であり、菌数が一桁のレベルであっても高率に検出されることが判明した。本コラボレイティブ・スタディで使用された mEC 培地 (42°C) での増菌培養、免疫磁気ビーズ法、各選択分離培地の組み合わせによる分離培養および遺伝子検出によって 6 血清群全ての比較的高率な検出が認められた。

2. 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

今後、mEC で 42°C 培養によってどの程度の菌数レベルになっているのか確認を行い、本研究で用いた PCR 法の検出感度を明確にする必要がある。また、より正確にスクリーニングするためにプローブを含むリアルタイム PCR 法の設定が望まれる。また、腸管毒素原性大腸菌に適した選択性を保有する分離培地の開発が必要と考えられる。

(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析

腸管毒素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。健康者では腸管毒素原性大腸菌の保菌は見つからず、25 年度の調査ではブタのみならず食鳥が想定以上に高い率で腸管毒素原性大腸菌を保菌している実態が明らかとなった。これら家畜家禽がヒトの汚染源となっているのかどうか、分子疫学解析によって今後結論を出す予定である。腸管侵入性大腸菌は検出されずわが国でのリスクは低いこと、腸管凝集接着性大腸菌や分散接着性大腸菌も汚染源はもっぱらヒトであり家畜が関与している可能性は低いことが示された。

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、①国内でヒトから分離された株は、分離頻度の高い順に O157、O26、O145、O103、O121、O111、O91、O165、その他であることが判明した。②重症者由来株としては、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。③マルチプレックス PCR 検出系は患者便からの検出法として、少なくとも O157、O165 の抗原遺伝子、*stx2*、*eae* について応用可能であることが明らかとなった。④主要 7 血清群以外についても O 抗原遺伝子が同定できれば、特異的な免疫磁気ビーズを用いた菌分離が可能であり、実際に *stx2*、*eae* 陽性の O76 の HUS 症例が検出された。また、(2) 病原大腸

菌の統括的検査法の開発として、コラボレイティブ・スタディにて、増菌培養、免疫磁気ビーズ法、選択分離培地の組み合わせによる分離培養および遺伝子検出によって腸管出血性大腸菌 6 血清群が総じて比較的高率に検出されることが確認された。これによって効率的な腸管出血性大腸菌の検査法を策定に貢献した（食安監発 1120 第 1 号 平成 26 年 11 月 20 日発「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157」）。腸管毒素原性大腸菌の増菌培養には腸管出血性大腸菌の試験法と同じく増菌培養は mEC での 42°C 培養が優れることが示された。今後、より正確なスクリーニング法（リアルタイム PCR 法など）や優れる選択培地の開発が求められる。さらに、(3) 病原大腸菌の分布および病原性解析として、腸管病原性大腸菌は腸管出血性大腸菌よりもはるかに高い率で家畜から家禽にいたるまで分布することが判明し、腸管毒素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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Lee, K., Kobayashi, N., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Tsubone, H., Kumagai, S. and Hara-Kudo, Y. Spread

and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157 on mould colonies. *Microbial Biotechnology*. 7:621-629, 2014.

Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. Impact of seafood regulations for *Vibrio parahaemolyticus* infection and the verification by analyses of the seafood contamination and infection. *Epidemiology and Infection*. 142:2237-2247, 2014.

小林直樹、工藤由起子、寺嶋淳. 腸管出血性大腸菌感染症. 話題の新興・再興感染症. 臨床と微生物. 近代出版. Vol. 41(1), 27-31, 2014.

Watanabe, M., Ohnishi, T., Araki, E., Kanda, T., Tomita, A., Ozawa, K., Goto, K., Sugiyama, K., Konuma, H. and Hara-Kudo, Y. Characteristics of bacterial and fungal growth in plastic bottled beverages under a consuming condition model. *J. Environ. Sci. Health, Part A*. 49:819-826, 2014.

Yaguchi, Y., Komura, T., Kashima, N., Tamura, M., Kage-Nakadai, E., Saeki, S., Terao, K., Nishikawa, Y. Influence of oral supplementation with sesamin on longevity of *Caenorhabditis elegans* and the host defense. *Eur. J. Nut.* 53 (8):1659-1668, 2014.

Saito, S., Iwade, Y., Tokuoka, E., Nishio, T., Otomo, Y., Araki, E.,

- Konuma, H., Nakagawa, H., Tanaka, H., Sugiyama, K., Hasegawa, A., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Epidemiological Evidence of lesser role of thermostable direct hemolysin (TDH)-related hemolysin than TDH on *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12:131-138, 2015.
- 工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査法の改正 主要6血清群に対応した検査法. *食品衛生研究*. 65巻3号、13-20, 2015.
2. 学会発表
- Hara-Kudo, Y., Furukawa, I., Isobe, J., Nagao, S., Sasaki, M., Saito, S. Characteristics morphologies of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 026, 0103, 0111, 0121, 0145 and 0157 on chromogenic agars for efficient isolation from food. *Food Micro*, September, 2014.
- 工藤由起子. なぜ日本の腸炎ビブリオ食中毒は減少したのか. 第42回日本食品微生物学会学術セミナー. H26年7月.
- 張少博、王麗麗、鄭冬明、藤原佐美、若林明世、中村寛海、前原智史、工藤由起子、西川禎一. 網羅的検出手法による下痢原性大腸菌の汚染源調査. 第35回日本食品微生物学会学術総会. 平成26年9月.
- 磯部順子、齊藤志保子、古川一郎、権平文夫、長尾清香、佐々木美智子、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 検出のための培養法の検討. 第35回日本食品微生物学会学術総会. 平成26年9月.
- 小西典子、大塚佳代子、森哲也、上田泰史、清水大輔、原田誠、中川弘、甲斐明美、長尾清香、寺嶋淳、工藤由起子. 食品における志賀毒素遺伝子の検出感度の検討. 第35回日本食品微生物学会学術総会. 平成26年9月.
- 長尾清香、森哲也、清水大輔、上田泰史、小西典子、大塚佳代子、中川弘、原田誠、甲斐明美、寺嶋淳、工藤由起子. 食品における0抗原遺伝子検出法の検出感度の検討. 第35回日本食品微生物学会学術総会. 平成26年9月.
- 清水大輔、岩淵香織、菊地理慧、大塚佳代子、小西典子、山崎匠子、鈴木史恵、磯部順子、永井佑樹、山田裕子、坂本綾、上田泰史、森哲也、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価 (1). 第35回日本食品微生物学会学術総会. 平成26年9月.
- 上田泰史、永井佑樹、磯部順子、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、大塚佳代子、菊地理慧、岩淵香織、山田裕子、田内敦子、森哲也、中川弘、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価 (2). 第35回日本食品微生物学

会学術総会. 平成 26 年 9 月.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌主要 6 血清群の検査法. 厚生労働省食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会. 平成 26 年 10 月.

加藤舞子、小村智美、中臺枝里子、西川禎一. 宮入菌給餌が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の寿命と各種ストレス耐性に及ぼす影響. 日本栄養食糧学会第 53 回近畿支部大会. 平成 26 年 10 月.

坂 瑛里香、吉田優香、和田崇之、輪島文明、濱端 崇、市川直樹、堀口安彦、中臺枝里子、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 0169 : H41 の接着因子. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 月.

小村智美、水野靖子、池田高紀、安井智佳子、佐伯 茂、西川禎一.

Caenorhabditis elegans (線虫) におけるビフィズス菌の長寿効果とその機構. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 月.

松崎壮宏、能重 匠、玉井沙也加、中臺枝里子、西川禎一. 培養上皮細胞におけるべん毛による IL-8 産生誘導に対する健康者由来分散接着性大腸菌の抑制効果. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 月.

加藤舞子、小村智美、中臺枝里子、西川禎一. *Caenorhabditis elegans* (線虫) の寿命と各種ストレス耐性に及ぼす宮

入菌給餌の影響. 第 67 回日本細菌学会関西支部学術集会. 平成 26 年 11 月.

工藤由起子. 多血清群の腸管出血性大腸菌試験法. 食品衛生登録検査機関協会. 平成 26 年度微生物研修会. 平成 26 年 11 月.

大塚佳代子、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、菊地理慧、岩淵香織、永井佑樹、磯部順子、山田裕子、坂本 綾、上田泰史、森 哲也、中川 弘、工藤由起子. 食品における腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 および 0157 試験法のコラボレイティブスタディ. 第 108 回日本食品衛生学会金沢. 平成 26 年 12 月.

工藤由起子. 食品検査における腸管出血性大腸菌の公定法変更について. 地方衛生研究所全国協議会・関東甲信静支部細菌研究部会. 平成 27 年 2 月.

3. 講習会

工藤由起子、大塚佳代子、小西典子、門脇奈津子、榊田 希、尾畑浩魅、高田薫、甲斐明美. 腸管出血性大腸菌 (6 血清群) の検査法実習. 日本食品衛生協会. 平成 27 年 3 月.

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

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進事業)

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 26 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・農学部)

研究要旨

日本国内で 2013 年 12 月から 2014 年 12 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=2,773)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 (58.1%), O26 (23%), O145 (4.7%), O103 (4%), O121 (2.9%), O111 (2.8%), O91 (0.8%), O165 (0.3%), その他(3.5%)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 2007-2012 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、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 6 つの血清群は O157, O26, O111, O121, O145, O103 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 血清群を各年度を通じて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 系を構築し、その有

用性について明らかに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 (論文投稿中で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。

6) 免疫磁気ビーズ法による EHEC の濃縮培養法

EHEC 検査マニュアルに記載の方法によって O165 および O76 の免疫磁気ビーズを調製し、増菌培養液に混合して各 O 群の大腸菌を濃縮した。

C. 研究結果

1) 2013-2014 年における主要な EHEC の分布解析

日本国内で2013年12月から2014年12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=2,773) 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 (58.1%), O26 (23%), O145 (4.7%), O103 (4%), O121 (2.9%), O111 (2.8%), O91 (0.8%), O165 (0.3%), その他(3.5%)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 2007-2012 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。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。2013-2014 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 O172 (総分離数 3, 血便由来分離数 3), O177 (総分離数 3, 血便由来分離数 3), O55 (総分離数 9, 血便由来分離数 3), O5 (総分離数 3, 血便由来分離数 3), O91 (総分離数 21, 血便由来分離数 2), OUT (総分離数 14, 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) HUS 患者便検体からの増菌液を用いた解析

2014 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。

a) O157 感染による HUS 事例における検出例
2 例の HUS 症例 (いずれも、病院の検査室では EHEC 分離不能事例であった) で患者

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、1 事例では O157 抗原遺伝子と *stx2*, *eae* が検出され、これらを保有する EHEC O157 が実際に分離された。もう 1 事例でも *stx1*, *stx2*, *eae* が検出され、これらを保有する EHEC O157 が実際に分離された。

b) O165 感染による HUS 事例における検出例

病院の検査室において EHEC が不分離の散発 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。同一患者便から TSB による増菌培養を行った後、アルカリ法にて DNA を抽出し、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* が同時に検出された。以上の結果を受けて O165 特異的な免疫磁気ビーズを作製し、DHL, X-MG 等の非選択性の平板を用い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。免疫磁気ビーズで濃縮しなかった増菌培養液を X-MG に拮げたコロニー (n=200) からは O165 は検出されなかったが、O165 特異的なビーズによって濃縮した培養液から得られたコロニーでは高頻度に O165 が分離されることが判明した。

c) O76 感染による HUS 事例における検出例

病院の検査室において EHEC が不分離の散発 HUS 患者血清中の抗体価の解析を行ったところ、上記の主要 7 血清群の抗体はいずれも陰性であった。そこで、この患者便から

TSB による増菌培養を行った後、アルカリ法にて DNA を抽出し、マルチプレックス PCR 法を試した。その結果、主要 7 血清群の抗原遺伝子はすべて陰性であったものの、*stx2*, *eae* は陽性となった。協力研究者である宮崎大学・農学部の井口准教授の協力を得て、大腸菌 182 種類（全 184 種類）の O 抗原遺伝子が検出可能なマルチプレックス PCR 系（井口ら、未発表データ）を用いて O 抗原遺伝子の検出を行ったところ、O76 と O16 の抗原遺伝子が陽性となった。この結果を受けて、O76 と O16 の大腸菌標準株を用いて、上記の患者血清中における抗体価を解析したところ、O76 抗体だけが検出されることが判明した。次に、抗 O76 抗血清で感作させた免疫磁気ビーズを作製し、便からの TSB 増菌培養液を濃縮した後、X-MG 平板上で培養したところ、*stx2*, *eae* 陽性の EHEC O76 が分離されることが明らかとなった。

以上 a-c) 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 2013 年 12 月から 2014 年 12 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, O145, O103, O121, O111, O91, O165 であることが明らかとなった。このうち、重症例由来株が 5 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（O121 で 52.5%, O165 で 50%）こと、O121 は集団発生の原因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。

昨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、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ている。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* のバリエントである *stx1b*、および *stx2* のバリエントである *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, O165 の抗原遺伝子、*stx1*, *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。さらに、今年度は HUS 症例の 1 つから、EHEC O76 を

検出した。共同研究者である宮崎大・農学部
の井口らは大腸菌のほぼすべての O 抗原遺
伝子が検出可能なPCR系を構築している(井
口ら、未発表)。主要 7 血清群のみならず、
O 抗原遺伝子が検出されれば、当該抗大腸菌
O 血清を用いて免疫磁気ビーズによる濃縮
培養が可能となることから、今回 O76 を分
離した同様な手法で菌の分離が可能になる
ものと考えられる。

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

・2013 年 12 月から 2014 年 12 月に国内
でヒトから分離された EHEC は、分離頻
度の高い順に O157 (58.1%), O26 (23%),
O145 (4.7%), O103 (4%), O121 (2.9%),
O111 (2.8%), O91 (0.8%), O165 (0.3%),
その他(3.5%)であることが判明した。

・2013 年から 2014 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 5 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。

・マルチプレックス PCR 検出系は患者
便からの検出法として、少なくとも O157,
O165 の抗原遺伝子, *stx2*, *eae* につ
いて応用可能であることが明らかとな
った。

・主要 7 血清群以外についても O 抗原
遺伝子が同定できれば、特異的な免疫
磁気ビーズを用いた菌分離が可能であ
り、実際に EHEC O76 *stx2*, *eae* の
HUS 症例が検出された。

・今年度構築したマルチプレックス PCR
系は、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

なし

資料1. ヒト由来EHECのO群(2013年12月-2014年12月)と重症者(血便またはHUS発症者)由来株数

O group	Total number	BD or HUS
O157	1,610	764
O26	638	102
O121	80	42
O111	77	23
O103	112	17
O145	130	16
O165	8	4
others	118	21
total	2,773	989

HUS:
hemolytic
uremic
syndrome

BD:
bloody
diarrhea

資料2. HUS症例からのEHEC O165 分離例

菌不分離HUS症例として血清診断依頼

