

総合研究分担研究
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 24-26 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 2007 年から 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=20,727)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 (66%), O26 (18.4%), O111 (3.6%), O103 (2.6%), O121 (2.4%), O145 (2.2%), O91 (1.1%), O165 (0.4%), その他 (3.3%)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 系を構築すると共に、これらを用いた重症例における EHEC 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。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た。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た。

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。

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) 2007-2014 年における主要な EHEC の分布解析

日本国内で 2007 年から 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=20,727) 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 (66%), O26 (18.4%), O111 (3.6%), O103 (2.6%), O121 (2.4%), O145 (2.2%), O91 (1.1%) , O165 (0.4%), その他 (3.3%)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 (主要 7 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 98%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* 遺伝子および (または) *stx2* 遺伝子以外にも接着遺伝子として Intimin をコードする *eae* を保有することが明らかとなっている。2007-2014 年では主要 7 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 28, 血便由来分離数 8) , O177 (総分離数 11, 血便由来分離数 7) , O91 (総分離数 229, 血便由来分離数 5) , OUT (総分離数 152, 血便由来分離数 18) となっており、これら以外は、総分離数 506, 血便由来分離数 50 であった (詳細は省略)。

2) マルチプレックス PCR

1)で同定した重症者由来の主要 7 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 (または) *stx2*、および *eae* の検出用 PCR プライマーとして既知のものを使用した (資料 2)。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 1,042 bp) で検出可能なプライマー配列を設

計した。その結果、資料 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 (資料 4)。資料 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。

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 血清群以外のすべての大腸菌 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。

3) HUS 患者便検体からの増菌液を用いた解析

2013-2014 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) O157, 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、a) 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。

c) 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。この患者便から 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、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 に拡げたコロニー (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(資料 6)。

d) 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 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、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(試料 7)。

以上 a)-d)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 2007 年から 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 40 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 O157 や O26 に比べて少ないものの、いずれも重症例の割合が多い(EHEC 全体で 36.7%だが、O121 で 38.8%、O165 で 50.6%である) 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 (未発表データ)。

上記の主要 7 血清群の抗原遺伝子に加えて *stx1*, *stx2*, *eae* の 10 種類の遺伝子が検出可能なマルチプレックス PCR 系はいずれの遺伝子も異なる増幅産物のサイズで同時に検出できる系である。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

・2007 年から 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 (66%), O26 (18.4%), O111 (3.6%), O103 (2.6%), O121 (2.4%), O145 (2.2%), O91 (1.1%) , O165 (0.4%), その他 (3.3%)であることが判明した。

・2007 年から 2014 年 12 月までに重症者（血便または HUS 発症者）由来の EHEC として分離数が 40 以上の血清群は、O91 を除く 7 血清群であることが判明した。食品からの EHEC の検出にはこれら主要 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、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(2007年-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	13,680	6,289
O26	3,809	635
O121	492	191
O111	739	153
O145	462	125
O103	543	89
O165	87	44
O55	28	8
O177	11	7
O91	229	5
OUT	152	18
others	506	50
total	20,727	7,607

HUS:
hemolytic
uremic
syndrome

BD:
bloody
diarrhea

資料2. PCRプライマー

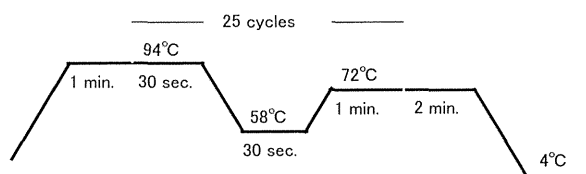
O血清群	標的遺伝子	プライマー配列	PCR産物のサイズ(bp)	参考文献
O157	<i>rfbE</i> (perosamine synthetase)	CAGGTGAAGTGGAATGGTTGTC TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	296	Bertrand R. and Roig B. Water Res. 2007 41:1280-6
O26	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	GGGGGTGGGTACTATATTGG AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	241	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O111	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT AACGCAAGACAAGGCAAAC	451	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O103	<i>wzx</i> (O-polysaccharide export protein)	TAAGTACGGGGTGCTTTTT AAGCTCCCAGACAGTATAA	716	Paddock Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O121	<i>wzy</i> (O-polysaccharide polymerase)	Unpublished data	193	in this study
O145	<i>wzy</i> (O-polysaccharide polymerase)	Unpublished data	132	in this study
O165	<i>wcnU</i> (glycosyltransferase)	Unpublished data	1042	in this study
病原性遺伝子	標的遺伝子			
Stx1	<i>stx1</i>	LP30: CAGTTAATGTGGTGCGAAGG LP31: CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	Cebula T. et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-250
Stx2	<i>stx2</i>	LP43: ATCCTATTTCCCGGAGTTTACG LP44: GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584	Cebula T. et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-250
intimin	<i>eae</i>	SK1: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC SK2: CCCGGATCCGTCTGCCAGTATTCG	881	Oswald E. et al. J Clin Microbiol. 2000 68:64-71

資料3. マルチプレックスPCR法の反応液組成と反応条件

反応液組成 (KAPATaq Extra, ExTaq)

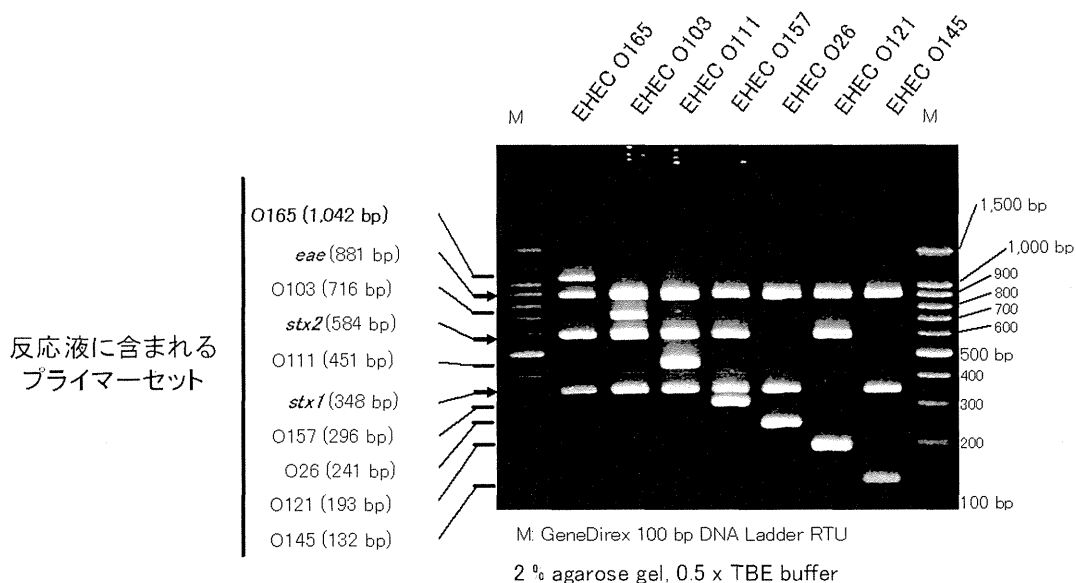
試薬など	組成(μl)
D. W.	17.18
5x KAPA Extra Buffer	6
MgCl ₂ (25mM)	3
dNTP mix (10mM)	0.9
primer(O157とO165) (100μM)	0.16 x 4 (0.64)
primer(<i>stx1</i> と <i>stx2</i>) (100μM)	0.04 x 4 (0.16)
primer(その他) (100μM)	0.08 x 12 (0.96)
KAPA Taq Extra	0.16
Template DNA (10ng/μl)	1
total	30 μl

反応条件

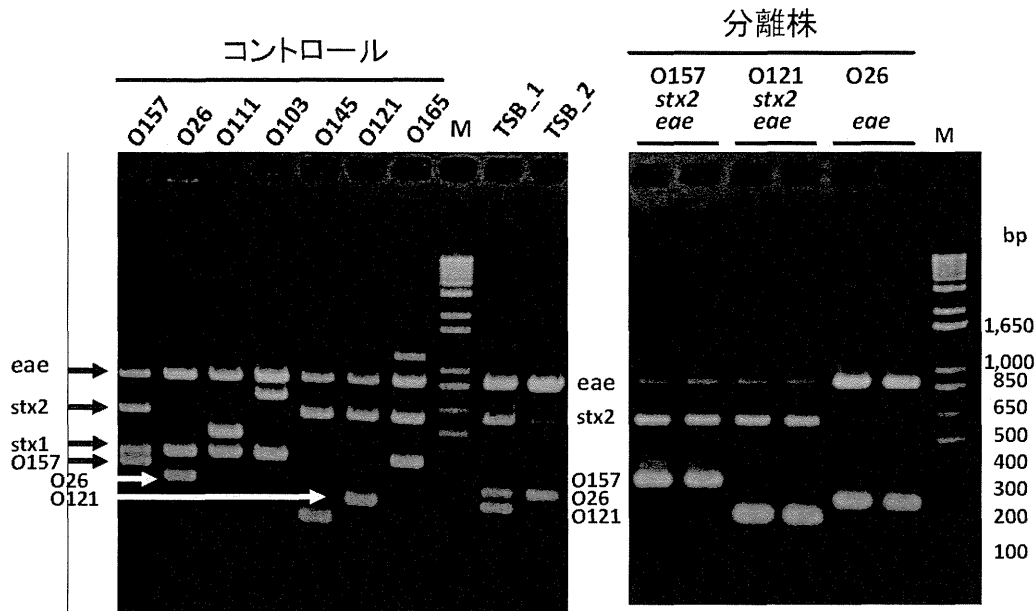


資料4. EHEC One-shot PCRの泳動像

反応液に加えたテンプレートDNA



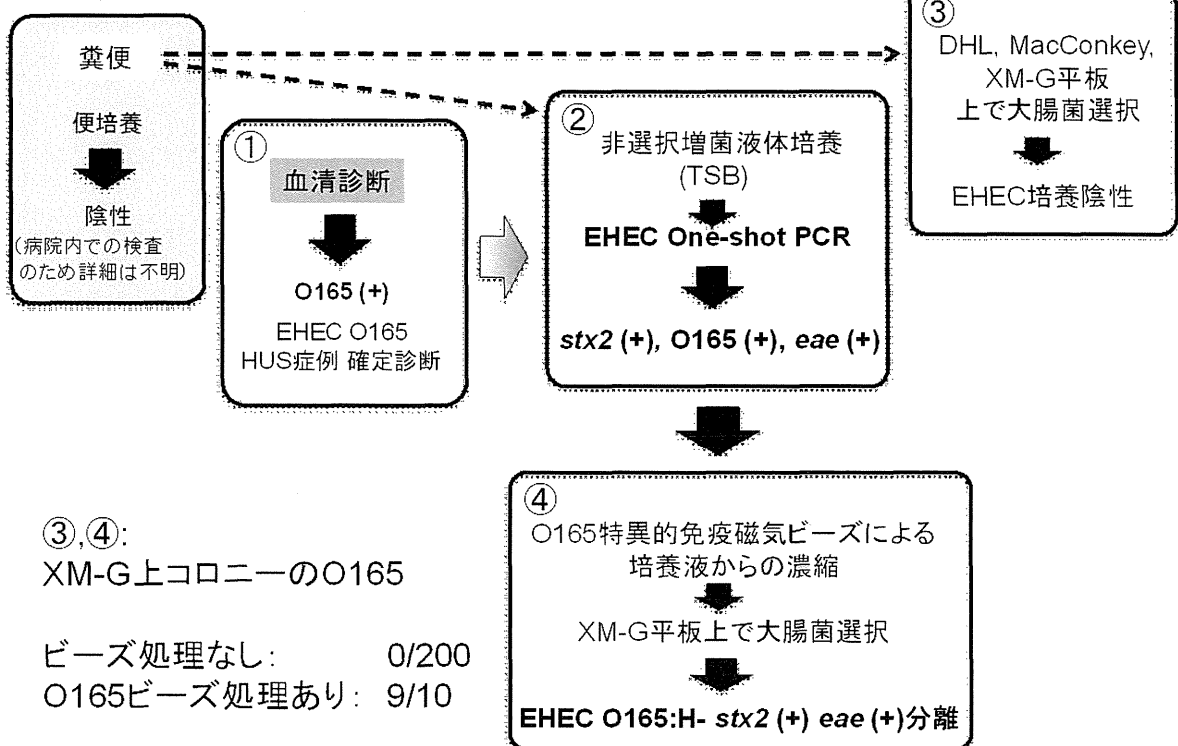
資料5. マルチプレックスPCR法の応用 (便検体からの分離)



TSB_1, TSB_2; 便増菌液(同一サンプル由来)

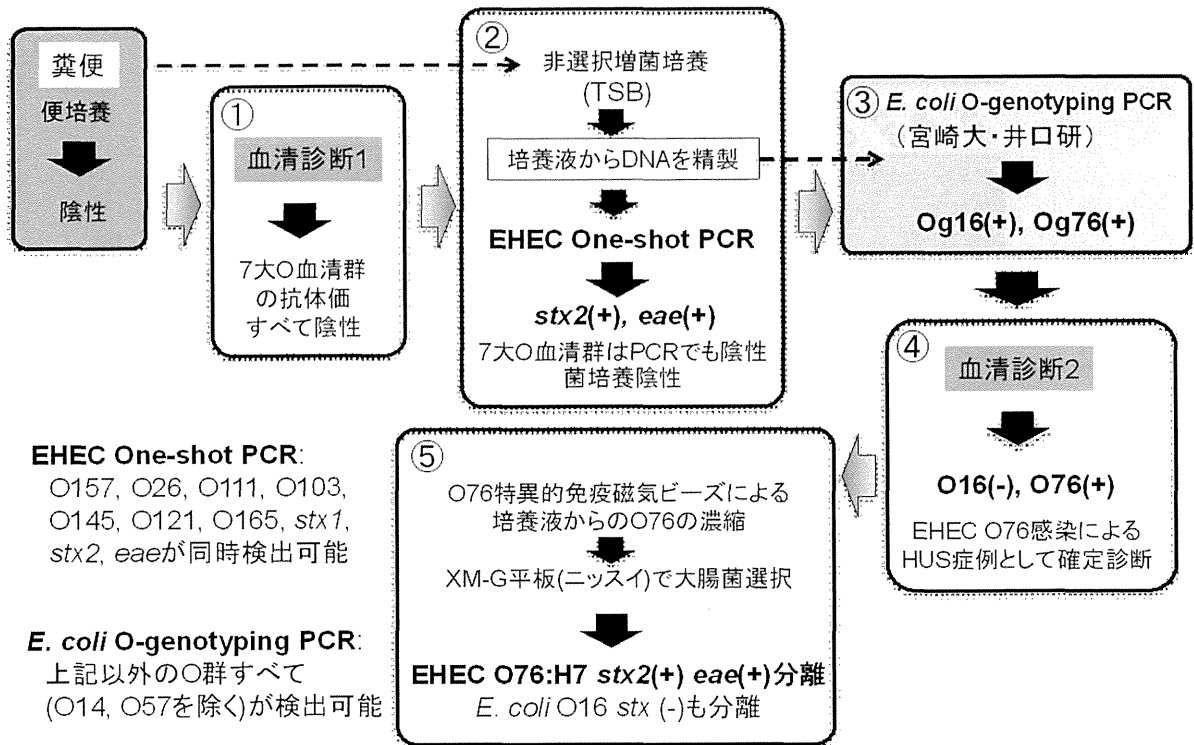
資料6. HUS症例からのEHEC O165 分離例

菌不分離HUS症例として血清診断依頼



資料7. HUS症例からのEHEC O76 分離例

菌不分離HUS症例として血清診断依頼



総合研究分担研究
報告書

病原大腸菌の統括的検査法の開発

工藤 由起子

平成24～26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

総合研究分担研究報告書

病原大腸菌の統括的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌はヒトへの病原性が強く、重症者や死者が発生する食中毒事例が社会的に問題になっており、食中毒事例では原因食品確定が不可欠である。食品での検査法は、平成9年に0157を対象として通知されたが、それ以降も必要に応じて他血清群を対象に通知されている。近年は諸外国において、5～7種類の血清群を対象にした検査が行われており、日本においても主要な血清群を対象にして食品の検査を行う必要がある。このため、本研究では以下の研究を行った。(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を検討し、自家調製法の反応系の縮小化、試薬および機器の組み合わせによる高い検出感度の検討、試薬調製による増幅ベースラインの安定化を行った。この成果は通知法の策定に取り入れた。また、食品培養液からVT遺伝子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) 腸管出血性大腸菌多血清群でのO抗原特異的遺伝子対象検出法を検討し、日本での多血清群でのO抗原遺伝子を対象にした検出法の確立には、諸外国の政府機関の検査法を参照した。そして、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) 腸管出血性大腸菌多血清群での増菌培養および分離培養の検討し、mECでの42℃培養が適すること、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。それによって腸管出血性大腸菌の検査法を策定した。(5) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討によって、本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。

研究協力者

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、甲斐明美	東京都健康安全研究センター
牧島満利子、山崎匠子	杉並区衛生試験所
榎原広里、鈴木史恵、富田敦子	静岡県環境保健研究所
金谷潤一、磯部順子	富山県衛生研究所
永井佑樹、楠原 一	三重県保健環境研究所
増田加奈子、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、田内敦子	広島市衛生研究所
齊藤志保子	秋田県健康環境センター
古川一郎	神奈川県衛生研究所
林 昭宏	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
上田泰史、稲垣俊一、原田 誠	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
権平文夫	デンカ生研株式会社
高田 薫、小林直樹	
佐々木美智子、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。日本では、平成 17

年に通知された腸管出血性大腸菌 026 および 0157 の検出法において各国に先駆け取り入れられたが、その後の通知法の改正では培養等の部分が主であり、VT 遺伝子のスクリーニング法については改正されていない。このため、まず (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を行った。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。さらに、多血清群に適した増菌培養法および選択分離培地が必要である。このため、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各種方法の検討を行い、優れた方法を組み合わせて多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価することとした。

また、腸管毒素原性大腸菌による食中毒の発生は、年間の事例数は数件程度であることが多いが、患者数の多い事例が発生することが少なくないことが知られている。しかし、食品での検査法が確定されていないため、原因食品の調査や流通食品の汚染調査などにおいて有用な方法が求められている。本研究では、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と試験手順や培地などをできるだけあわせることも考え、効率的で効果的な試験法の基礎を検討した。

以上のことから本研究では、(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、(2) 腸管出血性大腸菌多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討、(3) 腸管出血性大腸菌多血清群での増菌培養および分離培養の検討、(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、(5) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討を行った。

B. 研究方法

(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

食品(牛レバー、牛挽肉、豚スライス肉、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)を mEC 培地(日水製薬)を加え 42°C にて 20 時間培養して食品培養液を作製し、アルカリ熱抽出法にて DNA

抽出原液を得た。これを用いて反応系の縮小化および試薬・機器の組み合わせによる検出感度の改良を行った。機器としては、CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0、タカラバイオ) および Nielsen らの方法の 2 種類のリアルタイム PCR 法にて VT 遺伝子を検出した。リアルタイム PCR 機器として、ABI シリーズの ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)、LightCycler 480 (LC480、ロシュ・ダイアグノスティックス) または Thermal Cycler Dice Real Time System II (Dice、タカラバイオ) を使用した。機種によって auto 解析および manual 解析の設定にて解析した。

(2) 腸管出血性大腸菌多血清群での 0 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

菌接種食品培養液からの DNA 抽出原液を、0 抗原特異的遺伝子検出法および *eae* 検出法に供試した。0 抗原特異的遺伝子検出法には、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) 参照法の 2 種類を用いた。測定後、Auto 解析にて Ct 値を算出し、その Ct 値から検量線を作成した。また、通知法で求められている最低検出感度である 10^4 cfu/ml での Ct 値を作成した検量線から算出した。

また、食品を用いた検討では、リアルタイム PCR 法では自家調製試薬、LAMP 法では各 0 抗原対象自家調製プライマーセットと DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いた自家

調製試薬および大腸菌 0157 検出試薬キット（栄研化学）について検出感度の検討を行った。なお、各種機器と試薬の組み合わせを設定し、かつ解析方法も併せて検討した。

（3）腸管出血性大腸菌多血清群での増菌培養および分離培養の検討

菌株培養液 10^{-7} 希釈菌液 0.1 ml を mEC 培地 10 ml に接種して 42°C にて 22 時間培養し、培養後の mEC 培地の混濁を目視にて判定した（++：強い増殖、+：やや弱い増殖、-：増殖なし）。また、菌株培養液を弱選択性および強選択性の 10 種類の酵素基質培地に画線した。 37°C にて 24 時間培養し、生育したコロニーの発色、大きさなどを観察した。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（デンカ生研）の回収率を、参照に市販（デンカ生研）の血清群 026、0111、0157 のビーズとならべて検討した。

（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

1. 参加機関数：13 試験検査機関
2. 実施回数：3 回

試験対象血清群：第 1 回；血清群 026、0157、第 2 回；血清群 0103、0111、第 3 回；血清群 0121、0145。

3. 試験食品検体：牛挽肉、カイワレダイコン

高菌数接種 2 検体、低菌数接種 2 検体、非接種 2 検体。

4. 試験実施手順

検体入りのストマッカー袋にあらかじめ室温（ 20°C 位）以上に温めた mEC 培地

225ml を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。培養液 0.1 ml からアルカリ熱抽出にて DNA を抽出しリアルタイム PCR（VT 遺伝子、IC および O 抗原遺伝子を検出）に用いた。また、免疫磁気ビーズ法をマニュアル（デンカ生研）に従って行った。最終浮遊液を 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。 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 18～24 時間培養した。各種類の平板から疑われるコロニー 3 個を普通寒天平板培地等に接種し培養した。生育したコロニーを免疫血清（血清群 026、0103、0121、0145、0157）及びラテックス凝集試薬（血清群 0111）にて凝集反応を確認した。国立衛研で試験結果を集計後、outlier（外れ機関）を除いた機関の結果での検出方法間の有意差検定（ χ^2 乗検定）を行った。

（5）腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

毒素原生大腸菌株を TSB10 mL にて 37°C にて 18 時間培養した（約 1.0×10^9 cfu/mL）。その菌液を PBS 9 mL で 10 倍階段希釈して 10^{-5} (10^4 cfu/ml)、 10^{-6} (10^3 cfu/ml)、 10^{-7} (10^2 cfu/ml) 希釈液を調製し 3 レベルの菌数の接種菌液を作製した。牛挽肉、カイワレダイコン 25 g に接種菌液 0.1 mL (10^{-5} : 1000 cfu、 10^{-6} : 100 cfu、 10^{-7} : 10 cfu) を接種した。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 18～24 時間培養した。生育した大腸菌と思われるコロニーから熱抽出法で DNA を抽出し ST 遺伝子および LT 遺伝子の PCR 法に供した。食

品培養液からのアルカリ熱抽出法により DNA を抽出した。Stacy-Phipps らの方法 (J Clin Microbiol. 1995. 33:1054-1059) を参照して PCR を実施した。

C. 研究結果

(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

1. 反応系の縮小化

Nielsen らの方法での総反応液量が 50 および 30 μ l において、希釈菌液を接種した牛挽肉およびカイワレダイコン検体から抽出した DNA 溶液を用いて検出した結果、牛挽肉について 50 μ l 反応系で auto 解析の場合の 10^2 cfu/ml での 1 反応およびカイワレダイコンについて 50 μ l 反応系で manual 解析の場合の 10^2 cfu/ml での 1 反応で検出されなかったが、それ以外の菌接種食品培養液 (約 10^8 - 10^2 cfu/ml) では 2 反応の両方で検出された。このように、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。

2. 試薬および機器の組み合わせによる検出感度

CycleavePCR 0-157 Kit Ver. 2.0 の反応結果を ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480 および Dice の 5 機種において auto 解析したところ、LC480 および Dice においては 10^4 cfu/ml で VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出されたが、LC480 および Dice 以外においては 8 食品種中 5 食品種以下の検出であり、得られた増幅曲線では不安定なベースラインが散見され、妥当な解析結果が得られな

った。ABI7500、ABI7900 および ABI7500fast の 3 機種において manual 解析したところ、 10^4 cfu/ml で VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出され、適切な解析結果が得られた。

Nielsen らの方法の反応結果を、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast、LC480、LCnano および Dice の 6 機種において auto 解析したところ、 10^4 cfu/ml では VT1 および VT2 遺伝子検出ともに 8 食品種全てで検出され、適切な解析結果が得られた。次に、ABI7500、ABI7900、ABI7500fast および LC480 の 4 機種において manual 解析したところ、適切な解析結果が得られた。

(2) 腸管出血性大腸菌多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

菌接種食品培養液からの O 抗原特異的遺伝子の検出について感度を確認した。USDA 参照法および EFSA 参照法での最大陽性菌数は、全ての O 血清群について両食品培養液で 10^3 cfu/ml であった。また、牛挽肉とカイワレダイコン培養液の Ct 値には顕著な差は認められなかった。

また、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 機種のいずれにおいても、026 および 0157、0103 および 0111、0121 および 0145 の 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検討では、自家調製試薬での反応は 026、0103、0111、0121 および 0145 では 65°C 反応で、0157 のみ 63°C

で良好な結果であった。また、市販の O157 検出キットでは反応条件が 65℃であり自家調製試薬と同等の検出感度であった。

(3) 腸管出血性大腸菌多血清群での増菌培養および分離培養の検討

mEC 培地での増殖は、O103 では 16 株中全株が、O145 では 17 株中 16 株が強く増殖した。しかし、O121 では 21 株中 2 株が強い増殖を示したが 19 株がやや弱い増殖であり、O145 では 1 株が増殖しなかった。他血清群では多くの株が強い増殖を示した。

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STEC、クロモアガーO157、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O26/O157 およびレインボーアガーO157 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 血清群以外の大腸菌の生育は多くの血清群で抑制され、6 血清群の効率的な分離が期待できた。

免疫磁気ビーズ法の検討では、6 血清群ともに PBS では約 37 から 100%、牛挽肉培養液では約 21 から 60%とビーズ法による回収率としては優れていた。PBS と牛挽肉培養液での回収率の差は一概に傾向を表すことができず、総じて同等に近い結果であった。

(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

1. 血清群 O26

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数とも

に VT 遺伝子および O26 抗原遺伝子で 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数で 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.917 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、低菌数で両寒天培地ともに 0.875 であったが、高菌数では CT-クロモアガーSTEC で 1.0 であった。統計解析を行った結果、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。

2. 血清群 O103

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子で 1.0 であったが、O103 抗原遺伝子では 0.917 であった。カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.667 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では高菌数は両寒天培地ともに 1.0 であったが、低菌数は両寒天培地ともに 0.917 であった。カイワレダイコンでは、高菌数は両寒天培地ともに 1.0 であったが、低菌数は両寒天培地ともに 0.667 であった。統計解析を行った結果、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。

3. 血清群 O111

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および O111 抗原遺伝子の検出率は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では両遺伝子は 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.750 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉

では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに1.0であった。カイワレダイコンでは、高菌数で1.0であったが、低菌数では0.708であった。統計解析を行った結果、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。

4. 血清群 0121

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 0121 抗原遺伝子の検出感度は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.727 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、低菌数で CT-SMAC とは 0.455、CT-クロモアガー STEC は 0.545 であった。統計解析を行った結果、カイワレダイコンの低菌数接種検体について、VT 遺伝子および 0121 遺伝子の検出率は免疫磁気ビーズ法の CT-SMAC での分離と比べて有意に高かった。牛挽肉およびカイワレダイコンの高菌数接種検体については、いずれの検出法間でも有意差は認められなかった。これらの結果から、血清群 0121 の検出方法については、汚染菌数が低い検体においては、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。

5. 血清群 0145

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに

VT 遺伝子および 0145 抗原遺伝子の検出感度は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.864 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、高菌数で 1.0 であったが、低菌数では 0.818 であった。統計解析を行った結果、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。

6. 血清群 0157

検出感度は、リアルタイム PCR 法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに VT 遺伝子および 01145 抗原遺伝子の検出感度は 1.0 であったが、カイワレダイコンでは高菌数では 1.0 であったものの低菌数では両遺伝子とも 0.833 であった。免疫磁気ビーズ法において、牛挽肉では低菌数および高菌数ともに両寒天培地ともに 1.0 であった。カイワレダイコンでは、高菌数で 1.0 であったが、低菌数では 0.818 であった。統計解析を行った結果、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。

(5) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討

食品培養液からの ST 遺伝子および LT 遺伝子の検出結果、牛挽肉検体では、いずれの菌接種レベルにおいても両遺伝子とも容易に増幅産物像が確認された。しかし、カイワレダイコンでは、 10^{-7} 菌液では、両遺伝子ともに検出されなかった。また、 10^{-6} 菌液の場合には、LT 遺伝子は明瞭に観察されたが、ST 遺伝子では不明瞭であった。 10^{-6} 菌

液の場合には、LT 遺伝子は明瞭に、ST 遺伝子は若干不明瞭であった。

分離平板培地上のコロニーの ST 遺伝子および LT 遺伝子の検出結果、牛挽肉検体では、SMAC においていずれの菌接種レベルにおいても両遺伝子とも検出された。しかし、CT-SMAC では、いずれの菌接種レベルにおいても ST 遺伝子は検出されず、LT 遺伝子はいずれの菌接種レベルにおいても増幅産物像が不明瞭または 3 コロニーのうち 1 コロニーのみで検出される結果であった。

D. 考察

(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、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。しかし、さらに経済性を高めることを目的として反応系の縮小化を食品培養液を使用して検討ところ、反応系を 30 μ l にすることによって経済性を高められることが判明した。

試薬と機器の組み合わせにより適切な解析を行った結果について食品種で比較したところ、牛挽肉、豚スライス肉、チーズ、レタス、カイワレダイコンおよびハウレンソウについては、 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。牛レバーとトマトにおいては、DNA 抽出や PCR 反応を阻害する成分等が含まれている可能性が考えられた。今後、要因の解明と改善方法の検討が必要である。

また、詳細は略するが、市販食品で *eae* 陽性率が *stx* 陽性率よりも高かったことから、1 次スクリーニングの対象遺伝子がひと

つ多いことによる機器の限定、反応試薬のコストの上昇などを鑑みると、*eae* を含まない方が日本では合理的であると考えられた。

(2) 腸管出血性大腸菌多血清群での O 抗原特異的遺伝子対象検出法の検討

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。

(3) 腸管出血性大腸菌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。しかし、目的の 6 血清群の腸管出血性大腸菌を選択的に増殖させることは期待できないことが示された。また、酵素基質培地での発色性を利用した分離の方法として、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の分離の多い重要な血清群ではあるが、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、