

表13 PBSおよび食品培養液の影響試験に供試した菌液の菌数

菌株名	標的遺伝子	PBS	食品培養液
		(cfu/mL)	
ESC625	STp	8.2×10^8	5.5×10^8
ESC626	STp	8.9×10^8	5.5×10^8
ESC627	LT, STh	7.9×10^8	4.9×10^8
ESC628	STp	7.9×10^8	3.2×10^8
ESC630	LT, STh	N.D.	2.8×10^8
ESC632	STh	N.D.	4.7×10^8

N.D.: データなし

平成27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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

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

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討2

研究要旨

毒素原性大腸菌は、食中毒の病因物質のひとつであり、腸管出血性大腸菌と並び、事件発生頻度や事件当たりの患者数が多いものの、食品からの検査法は未だ確立されていない。本研究では、毒素原性大腸菌の病原因子である毒素遺伝子の検出系を利用した、食品からの本菌検出を目指し、食品の培養条件、遺伝子検出系の構築に係る基礎データの収集を行った。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子、門脇奈津子、星野梢、榊田希、大阪美紗

A. 研究目的

日本では、年間1,000件ほどの食中毒事件が発生し、患者約2万人が食中毒の被害に合っている。食中毒の病因物質のひとつである病原大腸菌は、その病原機構に基づき少なくとも5つ以上のグループに分類されている。また、大腸菌はヒトの常在菌として腸内に定着しており、下痢等を引き起こす病原性のある大腸菌と鑑別することは難しい。

病原大腸菌のひとつである「腸管出血性大腸菌」は、ヒトに重篤な危害を与えることが周知されたことを契機に、平成9年に食品からの腸管出血性大腸菌検査法が

厚生労働省通知として発出された。その後、近年の患者発生状況を踏まえ、病原機構を利用した遺伝子スクリーニング検出法を取り入れ、検出感度・精度を向上させた検査法へと改良を行い、原因食品の特定や汚染食品の調査に用いられている。一方、「毒素原性大腸菌」は、「腸管出血性大腸菌」と並び食中毒の発生頻度の多い病原大腸菌であるが、食品からの検査法は未だ確立されていない。

本研究では、毒素原性大腸菌の病原因子である耐熱性エンテロトキシン(ST)及び易熱性エンテロトキシン(LT)の遺伝子検出系を利用した、食品からの本菌検出を

目指し、食品の培養条件、遺伝子検出系の構築に係る基礎データの収集を目的とした。

B. 研究方法

1. 毒素原性大腸菌の増菌培養条件の検討

都内で発生した食中毒事例に由来する6種のO血清群12株を供試菌株とし(表1)、mEC培地(OXOID)における36℃及び42℃での動態を試験した。増殖の有無の確認は、各菌株をmEC培地に接種し18時間培養後、培養液20 μ Lをソルビトールマッコンキー寒天培地(OXOID)、DHL寒天培地(栄研化学)、ドリガルスキー改良培地(栄研化学)に画線塗抹し37℃、20時間培養した。

また、培養後の菌数を測定するため、mEC培養液はリン酸緩衝希釈水((株)LSIメディアエンス)で10倍階段希釈し、 10^{-4} 及び 10^{-5} 希釈液100 μ LをTrypticase Soy Agar (BD)各2枚に塗抹し、37℃、20時間培養後、平板上に発育したコロニーを計測した。

供試菌株は、今回の検討にあたり、ST及びLT遺伝子の保有状況をコンベンショナルPCR及びリアルタイムPCRにて確認した。

コンベンショナルPCRは、毒素原性大腸菌(STh gene) One Shot PCR Kit (Takara, 製品コードRR104A)、毒素原性大腸菌(STp gene) One Shot PCR Kit (Takara, 製品コードRR108A)、毒素原性大腸菌(LT gene) One Shot PCR Kit (Takara, 製品コードRR109A)を使用した。キット説明書に従い増幅反応を行った後、ゲル電気泳動にて各々123bp、131bp、263bpの増幅産物を確

認した。リアルタイムPCRはHidakaらが報告した(J. Appl. Microbiol., 106, 410-420) ST遺伝子(*est* STp, *est* STh)及びLT遺伝子(*elt*)を標的とし、マルチプレックス反応で行った。反応試薬はQuantiTect Multiplex PCR Kit (QIAGEN)を使用し、プライマー終濃度0.1~0.5 μ M、プローブ終濃度0.1~0.12 μ Mに反応液を調製した。リアルタイムPCR機器はABI ViiA7 (ライフテクノロジーズジャパン)を使用し、95℃15分の熱変性の後、95℃1分、60℃1分で40サイクルの増幅反応後、Auto又はManual設定にて解析しCt値を得た。

2. ST及びLT遺伝子検出法の検出感度試験

試験の方法を図1に示した。

上述の1.増菌培養条件の検討において、O血清群による差異がなかったことから、食中毒事件で発生件数の上位を占めるO血清群であるO6:HNM(菌株番号T6, LT及びST産生)、O148:H28(菌株番号T11, ST産生)、O169:H41(菌株番号T5, ST産生)を供試菌株とした。菌株はTrypticase Soy Broth (BD) 5mLにて37℃、16~18時間培養後、リン酸緩衝希釈水で 10^{-1} から 10^{-6} 希釈液まで10倍階段希釈し、原液とともに接種菌液(想定菌濃度 $10^9 \sim 10^3$ cfu/mL)とした。

接種菌液の菌数測定には、 10^{-6} 希釈菌液及び 10^{-7} 希釈菌液100 μ LをTSA各2枚に塗抹し、37℃、18~22時間培養後、平板上に発育したコロニーを計測した。

非加熱で摂取される食品であるミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめを対

象食品とした。食品は滅菌ストマッカー袋に 25g ずつ採取し、mEC 培地 225mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃、20 時間培養して食品培養液を作製した。各食品培養液 0.9mL に接種菌液 0.1mL を接種して菌接種食品培養液（想定 $10^8 \sim 10^2$ cfu/mL 食品培養液）を作製した。

DNA 抽出はアルカリ熱抽出にて行った。菌接種食品培養液 100 μ L は遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85 μ L 加え混和後、100℃ 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ L 加え、その遠心上清をリアルタイム PCR のテンプレートとした。

リアルタイム PCR は、上述の 1. と同様に Hidaka らが報告したマルチプレックス反応にて行った。

3. 食品からの培養法及び毒素遺伝子スクリーニング検出法による毒素原性大腸菌検査法の検討

検討の方法を図 2 に示した。

供試菌株及び使用した食品は、上述の 2. 検出感度試験と同一とした。

菌株は Trypticase Soy Broth (BD) 5 mL にて 37℃、16~18 時間培養後、リン酸緩衝希釈水で 10^{-5} 希釈し、接種菌液（想定菌濃度 10^4 cfu/mL）とした。

食品はストマッカー袋に 25g ずつ採取し、接種菌液 250 μ L を加えた後（想定菌濃度 10^2 cfu/g）、mEC 培地 225mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃、20 時間培養した。培養液 20 μ L は、4 種類の分離平板培地、クロモアガー STEC 培地（関東化学）、ソルビトールマッコニー寒天培地（OXOID）、DHL 寒天培地（栄研化学）、ドリガルスキー改良培地（栄研化学）各 2

枚に画線塗抹し、37℃及び 42℃で 18~24 時間培養した。菌の同定は、各分離平板培地に発育した定型的コロニー 5 個を TSI 寒天培地、LIM 培地、普通寒天培地に釣菌後、病原大腸菌免疫血 06、0148、0169 との凝集反応にて行った。

毒素遺伝子スクリーニング検出法は、各食品の mEC 培養液をアルカリ熱抽出し、遠心上清をテンプレートとした。リアルタイム PCR は上述の 1. と同一のマルチプレックス反応で行い、Ct 値を得た。

2. の検出感度試験で作製した 10 倍段階希釈菌液接種の食品培養液のアルカリ熱抽出試料を用い、n3 にて検量線を作成し、42℃20 時間培養した mEC 培養液中の菌数を算出した。

食品の一般細菌数及び大腸菌群数測定には、食品 25g にリン酸緩衝希釈水 225mL を加え 1 分間ストマッカー処理し 10^{-1} 乳剤を作製後、 10^{-5} まで希釈した。各 10 倍段階希釈液 1mL は 2 枚ずつ標準寒天培地で混釈し、35℃、48 時間培養した。また 10^{-1} 乳剤 1mL は 2 枚ずつデスオキシコレイト培地で混釈・重層し、35℃、20 時間培養後、平板に発育したコロニーを計測した。

C. 研究結果

1. 毒素原性大腸菌の増菌培養条件の検討

供試した 12 菌株の分離年、血清型及び今回の検討時点における毒素産生性を表 1 に示した。

供試した 6 種の O 血清群 12 菌株はすべて、mEC 培地 36℃及び 42℃の両温度にて 7 乗から 8 乗のオーダに増殖した。

3 種類の分離平板培地における発育状況は、差が認められなかった（表 1）。

2. ST 及び LT 遺伝子検出法の検出感度試験

菌液を接種した食品培養液からの ST 遺伝子及び LT 遺伝子検出におけるマルチプレックス反応系の検出感度は、試験した 4 食品すべて、また供試菌株 3 株すべて、 10^3 cfu 以上/mL で両遺伝子を検出できた。

3. 食品からの毒素原性大腸菌検出試験法の検討

供試した T5 (0169)、T6 (06)、T11 (0148) の 3 菌株は、食品 g 当たり各々 1.2×10^2 cfu、 8.3×10^1 cfu、 1.2×10^2 cfu 接種した。

食品からの各種分離平板培地による菌検出の結果を表 2 に示した。ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生食用ボイルわかめに接種した 3 菌株はすべて、 37°C 及び 42°C で培養した 4 種類の分離平板培地にて分離することができた。生食用ボイルわかめを除く 3 種類の食品では、各種の分離平板培地から釣菌した 5 コロニーすべてが当該接種菌と同定された。しかし、生食用ボイルわかめに接種した菌株、とりわけ T5 (0169) はクロモアガーSTEC 培地、DHL 寒天培地及びドリガルスキー改良培地から釣菌した 5 コロニーのうち、1 コロニーあるいは 2 コロニーのみが当該接種菌であり、効率的な鑑別はできなかった。

使用した食品の一般生菌数及び大腸菌群数は、ミニトマト 2.6×10^3 cfu/g 及び 1.7×10^3 cfu/g、大根の漬物 1.4×10^2 cfu/g 及び 0 cfu/g、長ネギ 2.5×10^2 cfu/g 及び 0 cfu/g、生食用ボイルわかめ 7.4×10^2 cfu/g 及び 1.9×10^2 cfu/g であった。

食品に接種した 3 菌株は、mEC 培養液のリアルタイム PCR 検査にて、全食品から ST 及び LT 遺伝子を検出することができた（表 3）。

各食品のリアルタイム PCR 検量線を基に、 42°C 20 時間培養した後の mEC 培養液中の菌数を算出した結果、ミニトマトに接種した T5 は 6.9×10^8 cfu/mL (ST 検量線) に増殖し、T6 は 2.8×10^8 cfu/mL (ST 検量線)、 2.1×10^8 cfu/mL (LT 検量線)、T11 は 5.7×10^8 cfu/mL (ST 検量線) であった。生食用ボイルわかめに接種した T5 は 2.9×10^8 cfu/mL (ST 検量線) に増殖し、T6 は 2.3×10^8 cfu/mL (ST 検量線)、 2.2×10^8 cfu/mL (LT 検量線)、T11 は 4.2×10^8 cfu/mL (ST 検量線) であった（図 3～図 10）。

D. 考察

H27 年度の研究では、過去の国内における食中毒発生状況資料（厚生労働省 NESFD）を検索し、毒素原性大腸菌を病原因物質とするものでは O 血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 による事件の発生が多いことが明らかとなった。これら O 血清群の増菌培養温度について検討し、mEC 培地、 42°C で発育することが判明した。本培養条件は、すでに通知で示されている食品からの腸管出血性大腸菌検査法と同一な増菌培地で、同一の培養温度である。そのため、市販食品の汚染調査において、病原機構の異なる複数の病原大腸菌検査を並行して行うことができ、検査の効率性を高め、また検査費用の削減にもなる。

食品の接種試験では、喫食前に加熱工程を要しない食品であるミニトマト、漬物、

長ネギ、わかめに毒素原性大腸菌を接種し、mEC 培地 42℃培養後、リアルタイム PCR による ST 遺伝子及び LT 遺伝子検出並びに、分離平板培地による菌検出を行った。全食品からリアルタイム PCR にて標的の遺伝子を検出でき、用いたマルチプレックスリアルタイム PCR は有用なスクリーニング検査法であることが明らかとなった。

今後は、一般細菌数や大腸菌群数が多い、食肉などの加熱調理を必要とする食材についてもリアルタイム PCR 検出系の評価を行う必要がある。

また、供試した菌株はすべて、分離培養法で全食品から菌検出できた。生食用ボイルわかめはミニトマトと同様に、mEC 培地 42℃20 時間培養後に 10⁸cfu/mL の菌数に増殖したと検量線から推定されるが、分離培養法では効率的な菌検出ができなかった。両食品の一般細菌数及び大腸菌群数は差が見られず、むしろミニトマトの方が値は大きい。低い検出率は、生食用ボイルわかめの加工工程で付加された夾雑菌のため、目的菌の分離が阻害されたと考えられる。

毒素原性大腸菌による食中毒の原因食品は、特定されることが殆どなく、汚染菌量も不明である。今回の検討では、接種菌数 100cfu/g としたが、汚染菌数が少数の場合には夾雑菌の影響を受け菌分離が難しくなることは十分に考えられ、今後 10cfu 程度の少ない菌数接種での検討も必要である。また、食品からの菌分離には、腸管出血性大腸菌検査法と同様、免疫磁気ビーズによる集菌や選択性のある分離平板培地の開発が必須である。

E. 結論

毒素原性大腸菌は、腸管出血性大腸菌と並び、食中毒の事件発生頻度や事件当たりの患者数が多い、重要な食中毒の病因物質である。本研究では、毒素原性大腸菌食中毒の主要な O 血清群について解析を行い、食品の本菌検査法を開発することを目的とした。

日本で食中毒の原因となる主要な O 血清群について増菌培養条件を検討した結果、腸管出血性大腸菌と同一な条件で増殖することが確認され、mEC 培地 42℃培養は病原大腸菌を網羅的に検出する有用な増菌培養方法であること、検討したリアルタイム PCR は検出感度に優れた毒素遺伝子検出法であることが判明した。

今後は、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地や免疫磁気ビーズの開発が課題である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

星野 梢、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、菊地理慧、岩渕香織、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、大塚佳代子、工藤由起子. 食品における腸管出血性大腸菌 6 血清群試験法のコラボレイティブスタディによる評価. 第 19 回腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症研究会. 平成 27 年 7 月. 東京.
大塚佳代子、森 哲也、上田泰史、中川 弘、清水大輔、甲斐明美、小西典子、長

尾清香、寺嶋 淳 、工藤由起子. 食品の腸管出血性大腸菌検査における VT 遺伝子検出機器及び試薬の検討.
第 36 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 27 年 11 月. 川崎.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

表 1 供試菌株の性状及び mEC 培地における増殖結果

菌株 No.	分離年	血清型	毒素産生性*		分離平板培地での発育			mEC 培地の菌数 (菌数 cfu/mL)	
			コンベンショナル PCR	リアルタイム PCR	SMAC 寒天 培地	DHL 寒天 培地	トリガールスキー 改良培地	培養温度 36℃	培養温度 42℃
T1	2003	0148 : H28	STh	ST	+	+	+	+ (3.0×10 ⁸)	+ (1.8×10 ⁷)
T2	2004	0169:HNM	-	-	+	+	+	+ (6.2×10 ⁷)	+ (3.1×10 ⁸)
T3	2004	025:HNM	STh	ST	+	+	+	+ (9.0×10 ⁷)	+ (5.7×10 ⁷)
T4	2004	027:H7	STp	ST	+	+	+	+ (3.0×10 ⁸)	+ (2.3×10 ⁸)
T5	2005	0169:H41	STp	ST	+	+	+	+ (5.0×10 ⁸)	+ (5.5×10 ⁷)
T6	2006	06:HNM	LT、STh	LT、ST	+	+	+	+ (9.1×10 ⁷)	+ (4.7×10 ⁷)
T7	2006	0159:H34	STp	ST	+	+	+	+ (2.8×10 ⁸)	+ (2.4×10 ⁷)
T8	2007	027:H7	STp	ST	+	+	+	+ (2.2×10 ⁸)	+ (1.4×10 ⁸)
T9	2007	06:HNM	LT、STh	LT、ST	+	+	+	+ (7.2×10 ⁷)	+ (9.5×10 ⁶)
T10	2008	025:HNM	STh	ST	+	+	+	+ (2.9×10 ⁸)	+ (9.8×10 ⁷)
T11	2011	0148 : H28	STh	ST	+	+	+	+ (5.4×10 ⁸)	+ (6.8×10 ⁷)
T12	2015	0159:H34	STh	ST	+	+	+	+ (2.4×10 ⁸)	+ (2.3×10 ⁷)

*コンベンショナル PCR は、耐熱性エンテロトキシン (STp、STh) の検出を、個別の増幅反応で行うため、両者を区別して検出することができる。

リアルタイム PCR は、STp 及び STh を検出するが、リポーター蛍光色素が同じ FAM であるため、マルチプレックス反応の系では区別して検出することができない。

表2 分離平板培地別、培養温度別の菌検出結果

食品	血清型 (菌株 No.)	37℃				42℃			
		クロモアガー STEC 培地	SMAC 寒天培地	DHL 寒天培地	トリガルスキー 改良培地	クロモアガー STEC 培地	SMAC 寒天培地	DHL 寒天培地	トリガルスキー 改良培地
ミニトマト	0169 (T5)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	06 (T6)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	0148 (T11)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
大根の漬物	0169 (T5)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	06 (T6)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	0148 (T11)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
長ネギ	0169 (T5)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	06 (T6)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	0148 (T11)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
生食用ボイル わかめ	0169 (T5)	2 / 5	4 / 5	2 / 5	1 / 5	3 / 5	5 / 5	1 / 5	2 / 5
	06 (T6)	4 / 5	5 / 5	3 / 5	3 / 5	2 / 5	5 / 5	4 / 5	5 / 5
	0148 (T11)	5 / 5	3 / 5	4 / 5	3 / 5	4 / 5	5 / 5	5 / 5	3 / 5

表 3 リアルタイム PCR による毒素遺伝子の検出結果

食品	血清型 (菌株 No.)	リアルタイム PCR	
		ST	LT
ミニトマト	0169 (T5)	+	—
	06 (T6)	+	+
	0148 (T11)	+	—
大根の漬物	0169 (T5)	+	—
	06 (T6)	+	+
	0148 (T11)	+	—
長ネギ	0169 (T5)	+	—
	06 (T6)	+	+
	0148 (T11)	+	—
生食用ボイル わかめ	0169 (T5)	+	—
	06 (T6)	+	+
	0148 (T11)	+	—

* T5 (ST 遺伝子保有株)、T6 (LT、ST 遺伝子保有株)、T11 (ST 遺伝子保有株)

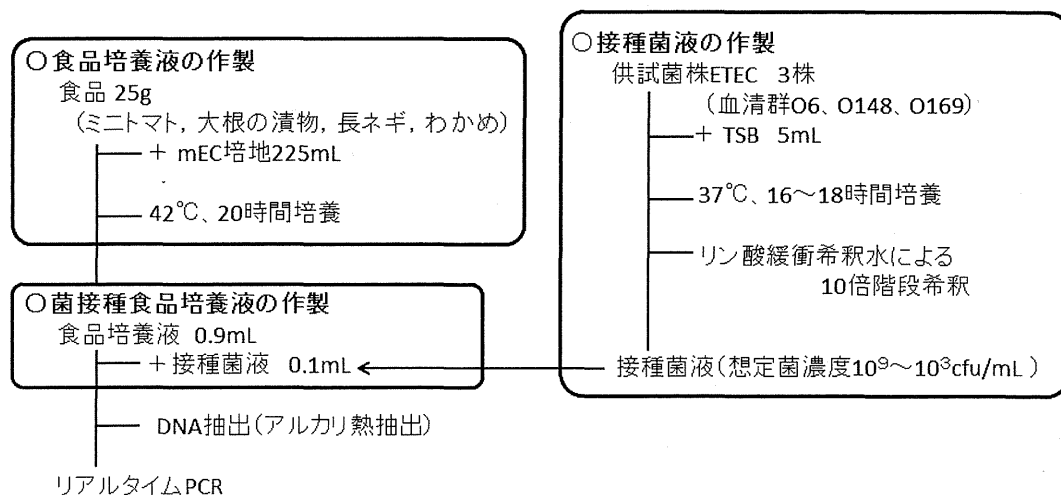


図1 ST及びLT遺伝子検出法の検出感度試験

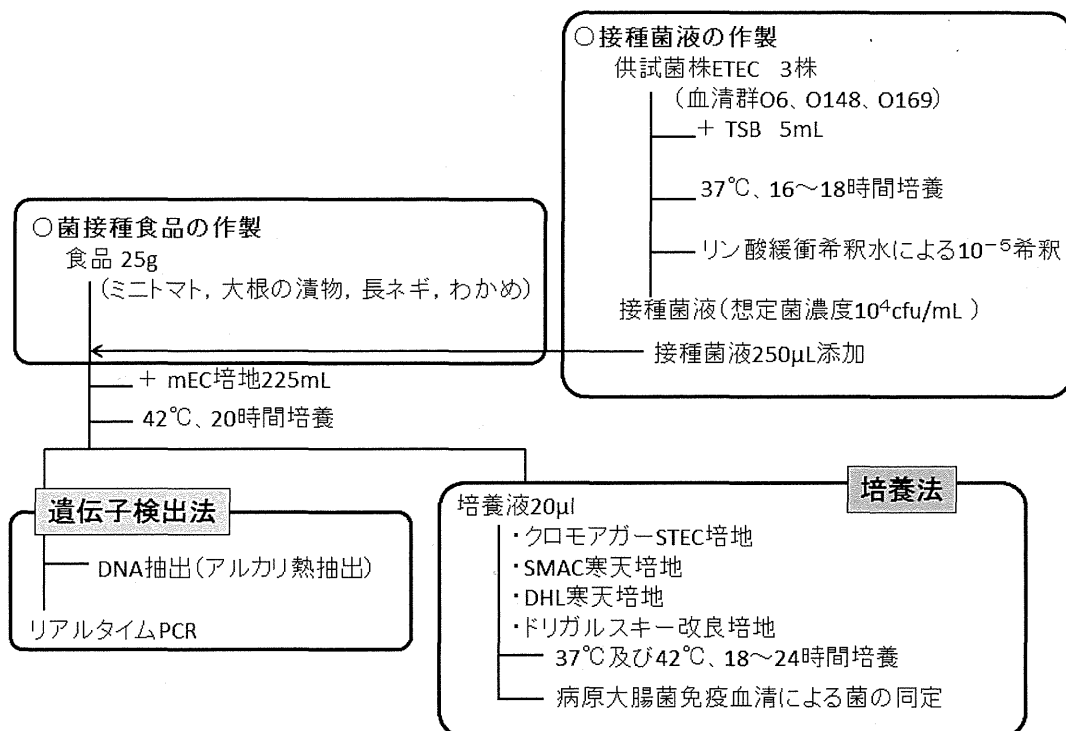


図2 食品からの培養法及び毒素遺伝子スクリーニング検出による毒素原性大腸菌検査法の検討

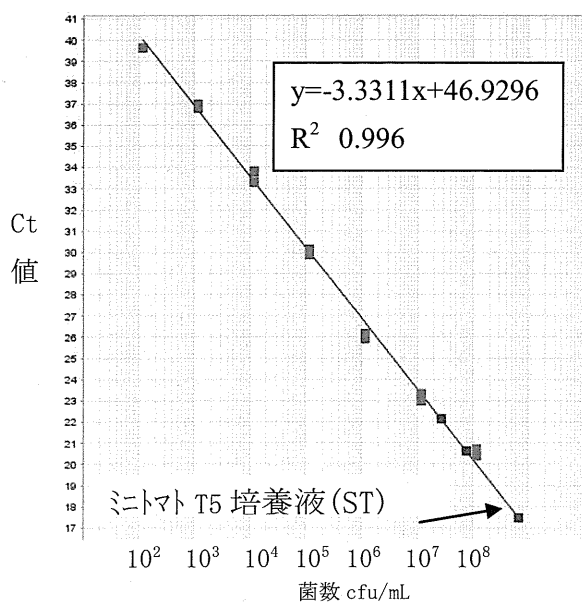


図 3 シンマト T5 による検量線 (ST)

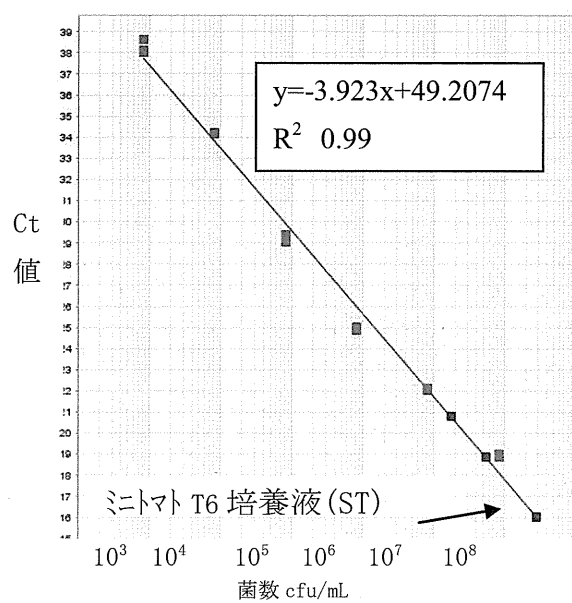


図 4 シンマト T6 による検量線 (ST)

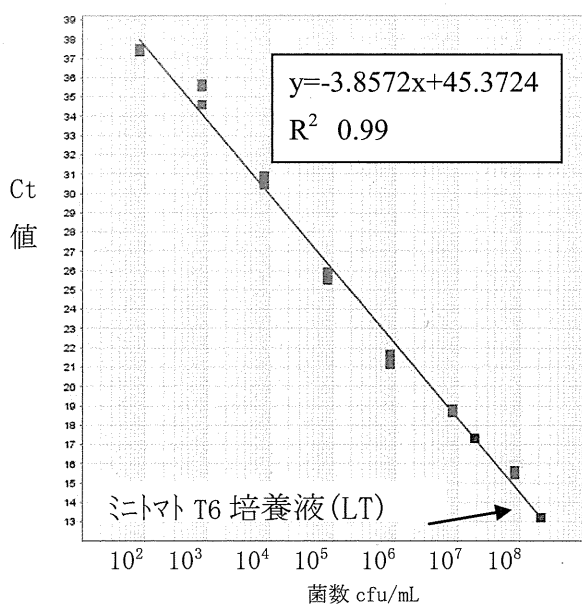


図 5 シンマト T6 による検量線 (LT)

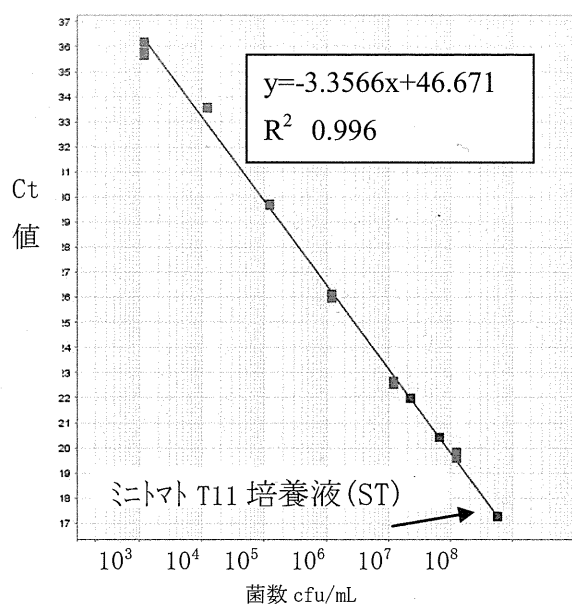


図 6 シンマト T11 による検量線 (ST)

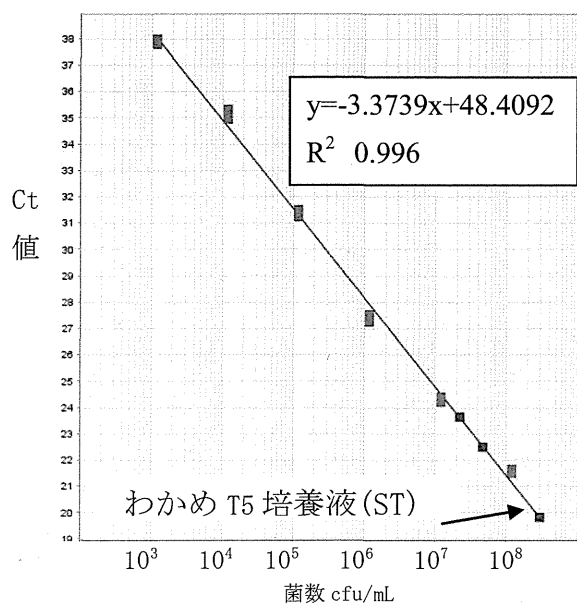


図 7 わかめ T5 による検量線 (ST)

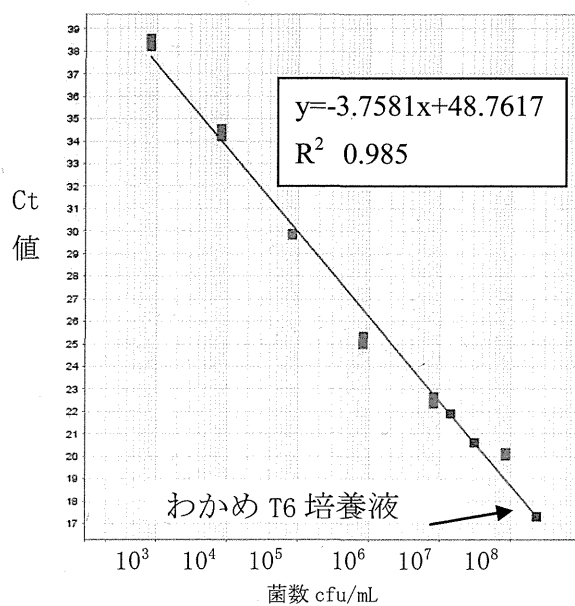


図 8 わかめ T6 による検量線 (ST)

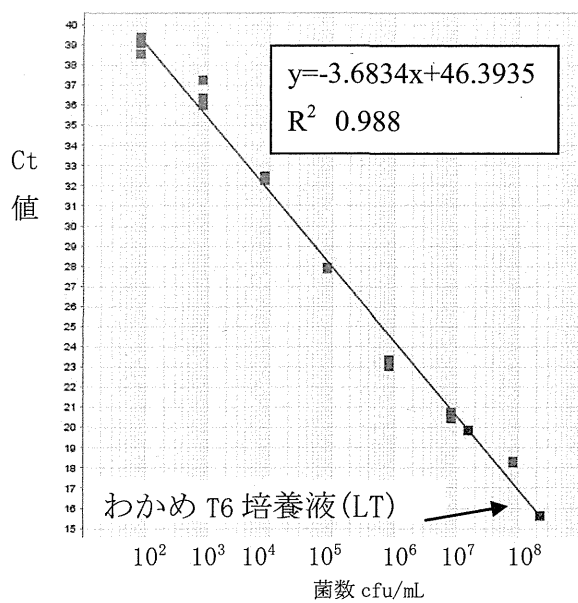


図 9 わかめ T6 による検量線 (LT)

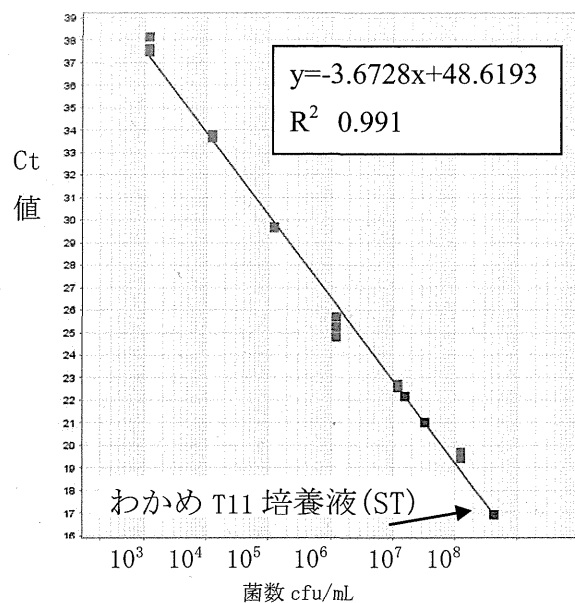


図 10 わかめ T11 による検量線 (ST)

分 担 研 究 報 告 書

ヒトの感染に関与する家畜の探索

西川 禎一

平成27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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究者代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ヒトの感染に関与する家畜の探索

研究分担者 西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

ETEC 0169:H41の病原プラスミドの全塩基配列を決定した．全長145,082 bpで，GC含量は，46.15 %であった．182のタンパク質コード配列がアノテーションにより推定された．また，本プラスミドにはincFIIグループの*repA1*と*repA2*複製遺伝子がコードされており，RepFIIプラスミドファミリーに属することが分かった．F線毛に関連する遺伝子は，ほとんど存在せず，*traI*，*traY*のわずか2遺伝子のみであった．他のRepFIIファミリーのヒトETECプラスミドと比較して，本菌のプラスミドは，サイズが大きいこと，挿入配列の割合が高いこと，プラスミドの安定性に関する遺伝子が少ないこと，が明らかになった．プラスミドの安定性に関する遺伝子は，*psiAB*，*relE*と4つのresolvase遺伝子のみであり，*hok/mok/sok*システムや*sopAB*のようなプラスミドの維持に関係する遺伝子は，コードされていなかった．本菌がin vitroで容易にプラスミドを喪失する原因と考えられる．一方，本菌にはCS6，CS8-like，K88-like，以上3種類の腸管定着因子がコードされていることが明らかとなった．極めて不安定で脱落しやすいプラスミドであるにもかかわらずin vivoではよく維持されている理由として，異なる宿主に対応できる定着因子をコードし，0169の感染適応力を増強する上で本プラスミドが大きく寄与しているためと推察される．ETECの宿主特異性について改めて見直すことも必要と判断する．

研究協力者

坂 瑛里香 大阪市立大学大学院生活科学研究科

吉田優香 大阪市立大学生活科学部

涌嶋美津子 大阪市立大学大学院生活科学研究科

輪島丈明 東京薬科大学薬学部

濱端 崇 国立国際医療センター研究所

市川直樹 大阪市立大学大学院生活科学研究科

安倍博之 大阪大学微生物病研究所

堀口安彦 大阪大学微生物病研究所

中臺枝里子 大阪市立大学大学院生活科学研究科

山本太郎 長崎大学熱帯医学研究所

和田崇之 長崎大学熱帯医学研究所

A. 目的

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、恒温動物の腸内に広く分布しており、ヒトにおいても出生と同時に腸管内へと急速に広がり常在菌として定着する(1)。しかしながら、大腸菌の一部には特殊な病原因子によって人に下痢症を起こすものがあり、行政的には病原大腸菌、学術的には下痢原性大腸菌 (Diarrheagenic *E. coli*, 以後 DEC と略す) と呼ばれる。

DEC は、その病原機構に基づいて①腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC), ②腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), ③志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC), ④腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 以上4群に長らく大別されてきたが、2012年1月からは⑤腸管凝集接着性大腸菌 (Enteragggregative *E. coli*, EAEC), も DEC に認定された。他にも分散接着性大腸菌 (Diffusely adherent *E. coli*, DAEC), 細胞膨化致死毒素産生性大腸菌 (CTEC), 腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素 (EAST1) 遺伝子保有大腸菌 (EAST1EC), 細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) など、新たな DEC の候補とされるサブグループが複数存在する。

このうち ETEC は、大腸菌によるヒト下痢症の最も一般的な原因菌である(2)。その主な感染経路は、汚染された水

や食べ物を体内に摂取することであり、1～3日の潜伏期間を経て水様性下痢を主徴とする症状を発症する(2)。下痢は菌が産生するエンテロトキシンの作用によるもので、胃腸炎症状は原則として見られない(3)。しかしながら、水分や電解質の喪失による脱水症を引き起こし、死亡する場合もある(4)。ETEC は特に発展途上国において頻発し、年間約2億1000万人が罹患して約38万人が死亡するが、死者のほとんどは乳幼児である(5)。これらの国を訪れる旅行者や軍人にも下痢症を引き起こすため、いわゆる旅行者下痢症の原因菌としても知られている(5)。

ETEC の 0169:H41 (以後 0169 と略す) は 1991 年に日本で初めて発見されたが(6)、以後、0169 感染の報告が日米で相次ぎ(7-9)、1990 年代には ETEC による集団感染の多くが本血清型菌によるものとなった(10)。0169 はエンテロトキシン STp を産生し、腸管定着因子 CS6 を保有する。また、巨大なプラスミドを有し、STp はこのプラスミドにコードされていることが確認された(11)。さらに、0169 は既知の付着因子 CS6 を有しているが、他の ETEC では見られない HEp-2 細胞への強い凝集接着性を示すことが報告された。その細胞付着像は EAggEC の HEp-2 細胞への付着像に酷似しているが、EAggEC の凝集接着に関与する線毛の発現を制御する遺伝子 *aggR* を保有してい

ない。このことから、本菌が未知の定着因子を保有する可能性が示唆された(11)。

ETEC には厳密な宿主特異性があるが、ブタやウシの ETEC はブタやウシのみに感染し、ヒトの ETEC はヒトのみに感染すると一般に考えられている。しかしながら、0169 が特異な付着像を示したことから、また 1991 年以降急激に広がったことから、その腸管定着因子が従来の定説とは異なる宿主特異性を有する可能性も否定できない。本研究の目的は 0169 の病原プラスミド (pEntYN10) の全塩基配列を決定し、本菌の付着因子をコードする遺伝子を解明することで、付着因子の性質から 0169 の急激な流行の理由を探ることにある。

B. 方法

1. 使用菌株

下痢症患者の便から独自に分離した ETEC 0169:H41 の YN10 株と ETEC 0159 の IND 株、ETEC の国際的な標準株である H10407 (078:H11) を実験に供した。いずれの株も毒素遺伝子である *est* (STp) を保持していた。

2. プラスミド DNA の抽出

0169 YN10 株を LB ブイヨンに接種し 37℃ で振盪培養した。Plasmid DNA Purification KIT BAC 100 (タカラ) を用いて回収した菌体からプラスミドを抽

出し、アガロースゲル電気泳動によって染色体 DNA と分離した。

3. プラスミドのシーケンス解析

塩基配列の解析はタカラバイオに委託し、シーケンサー (FLX System; 454 Life Sciences, Roche Applied Science, Branford, CT) を用いた解析により 150 のコンティグ (塩基配列断片群) 情報として得た。

各コンティグのつながりは、GS De Novo Assembler (ver. 2.5.3) を用いて調べるとともに、隣接するコンティグを跨ぐ PCR を実施して、その産物のシーケンスを学内の解析サービスまたは FASMAC に委託して検証した。

PCR 産物で依頼する場合は、増幅産物をアガロースゲルから Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) を用いて切り出し、プロトコールに従って精製した。サンプルの濃度などの調整は各委託先の定めに従った。

コンティグの繋がり方が不明になっている個所については、両コンティグに特異的なプライマーを設定し、PCR を用いて連結の有無を検討した。プライマーの設計には GenoFinisher (東北大学大学院生命科学研究科遺伝情報動態研究室: GenomeMatcher プロジェクト) を使用した。contig_link ファイルの情報をもとに、隣接していると考えられるコンティ

グのプライマーを一つずつ用いて、プラスミドをテンプレートに PCR を行った。その後、アガロースゲルで電気泳動を行い、予想通りのサイズの PCR 産物が得られれば、二つのコンティグが連続していると判断した。

一部のコンティグでは、コンティグの塩基配列が酷似していてアセンブラーが 1 種類のコンティグと認識してしまっているが実際には別のコンティグで数か所の塩基が異なる、いわゆるバリエーション問題が存在したり、他のコンティグの配列と相同性が高かったりして特異的なプライマーを設計できず、隣接するコンティグ間で PCR をできなかった。その場合は、そのコンティグをまたぐ形で 3 つのコンティグの間で PCR を行い、PCR 産物をテンプレートにシーケンスで塩基配列を確認した。

4. アノテーション

タンパク質コード配列 (Cording sequence ;CDS) の抽出はアノテーション用パイプライン Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP)を用いて行った。推定された CDS は、BLASTP を用いて GenBank 内に類似のアミノ酸配列を持つタンパクを探索することで確認した。同一塩基が連続する領域でシーケンサー 454 FLX が読み取りミスを起こし、結果としてフレ

イムシフトによる誤ってアノテーションされるのを避けるために、それらの領域について Sanger 法で塩基配列を決めた。すべての塩基配列とアノテーション結果を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession No. AP014654)。

5. ペアワイズアライメント

塩基配列から推定されたアミノ酸配列の類似度は、EMBOSS needle program をウェブサイト EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) で用いることで比較した。

6. 系統樹の作成

アミノ酸配列に基づいた系統発生樹は、Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6.06.41 を使用した 500 レプリケーションブートストラップ分析 (500 replicate bootstrap analysis) および近隣結合法 (Neighbor-Joining method with a poisson) を使用して作成した(12)。ブートストラップコンセンサス系統樹 (Bootstrap consensus trees) には、平均ブートストラップバリューを記入した。

7. 付着性試験

10 % ウシ胎児血清加イーグル MEM 培地 (EMEM, 日水製薬) を用いて 25 cm² のフラスコに HEp-2 細胞がフルシートになる

まで培養した。フルシート後は PBS で洗浄し、トリプシン処理した後 3 倍に希釈して継代した。トリプシン処理したフルシートの HEP-2 細胞を EMEM 12 ml で懸濁し、24 穴プレートの各ウェルに 0.5 ml ずつ分注し、CO₂ インキュベータで 48 時間培養した。その後上清を除き、メチル α -D-マンノピラシド (和光純薬) を 0.5% 含む EMEM を 0.5 ml 加えた。供試菌株を培養した LB ブイオンを 10 μ l ずつ接種し (50 倍希釈)、3 時間培養した。細胞をメタノール固定後、10 % ギムザ液で細胞を染色し、鏡検した。

C. 結果

pEntYN10 の全塩基配列解析

pEntYN10 は、全長 145,082 bp で、GC 含量は、46.15% であった。182 の CDS がアノテーションにより推定された (Table 1, Fig. 1)。また、本プラスミドは、incFII グループの *repA1* と *repA2* 複製遺伝子がコードされていた。つまり、pEntYN10 プラスミドは、RepFII プラスミドファミリーに属することが分かった。F 線毛に関連する遺伝子は、ほとんど存在せず、*traI*、*traY* のわずか 2 遺伝子のみであった。

他の RepFII ファミリーのヒト ETEC プラスミドと比較して、pEntYN10 プラスミドは、サイズが大きいこと、IS の割合が高いこと、プラスミドの安定性に関する遺伝子が少ないことが分かった (Table 2)。

プラスミドの安定性に関する遺伝子は、*psiAB*、*relE* と 4 つの resolvase 遺伝子のみであった (Table 1)。*hok/mok/sok* システムや *sopAB* のようなプラスミドの維持に関する遺伝子は、コードされていなかった。

pEntYN10 上の定着因子遺伝子

pEntYN10 は、推定定着因子として、CS6、CS8 (CFA/III)-like、K88 (F4)-like の 3 遺伝子群を保有していた (Table 3, Fig. 1)。

当研究室の涌嶋の報告 (13) にもあった通り、CS6 の構造サブユニットの 1 つである CssA は、既知のものと比較して 5 つのアミノ酸変異を持っていた (Fig. 2)。CS6 のサブユニットである CssB は既知のものと 100% 一致した。

pEntYN10 の CS8-like は、以前に報告された CS8 の配列と比較すると CS6 よりも低い相同性であった (Table 3)。CS8 の主要構造サブユニットである CofA について pEntYN10 上に認められるアミノ酸配列と、ETEC 株 260-1 が持つプラスミド pSH1134 上の配列を比較すると 73.2% の相同性を有していることが分かった (Fig. 3)。

YN10 の K88 (F4)-like 遺伝子は、主要構造サブユニットとされる、*faeG* が 2 つコードされていることが分かった (Fig. 4)。*faeG* の配列の系統発生樹では、これらの 2 つの *faeG* は、他の大腸菌株よりも

Salmonella *Infantis* のものと近いことが分かった (Fig. 5).

0159 IND 株の定着因子の検討

アノテーションにより pEntYN10 は、3 つの推定定着因子、CS6, CS8 (CFA/III) および K88 (F4)-like を保有することが分かった。0159 IND の CS6 も、pEntYN10 と同じ位置に 5 つのアミノ酸変異を持つことが当研究室の涌嶋によってすでに報告されている (13)。そこで、pEntYN10 の CS8, K88 (F4)-like 上に設計されたプライマーを用いて、PCR を行ったところ、0159 IND も pEntYN10 と同じ CS8-like および K88-like 遺伝子を保有することが示された。K88-like についてシーケンスを行った結果、pEntYN10 の K88-like と 99% 一致していることがわかった。

D. 考察

0169 は容易にプラスミドを落とす。pEntYN10 プラスミドのアノテーションを行った結果、そのサイズの大きさの割にプラスミドの維持に関する遺伝子は少なく、外部からの挿入配列が全体の 45.6% を占めていた。pEntYN10 の属する RepFII プラスミドは、一般的に *stbAB* および *psiAB* を保有している [25] が、pEntYN10 は *stbAB* オペロンが欠落していた。*hok/mok/sok* システムや *sopAB* のようなプラスミドの維持に関する遺伝子もコードされていなかった。これらの結果、

0169 は容易にプラスミドを落としてしまうと考える。また、接合に関する遺伝子をコードしている *tra* 領域も大部分が欠落しており、接合は機能していないと考えられる。

pEntYN10 は、CS6, CS8, K88 (F4)-like の 3 種の定着因子候補遺伝子群を保有していた。CS6 は、*cssA* および *cssB* の 2 つの構造タンパクから構成されている。アミノ酸配列の違いにより、*cssA* は AI, AII, AIII の 3 種に、*cssB* は BI, BII の 2 種に型別できる (14)。pEntYN10 の CS6 の *cssA* は AII タイプと似ているが 5 つのアミノ酸変異を持つ新規サブタイプであった。*cssB* は BII タイプと 100% 一致した。本来、BII は、付着性の弱いタイプと報告されており、本菌の強い凝集接着性と合致しない。*cssA* の変異が特異な細胞接着性に関与している可能性も否定できないが、*in vitro* での細胞接着には他の CS8-like や K88-like のいずれかが主に働いているかもしれない。

CS8 (CFA/III) は、ETEC 表面に線毛を形作り、ヒトの腸細胞に特異的に付着すると報告されている (15, 16)。CS8 の主要構造タンパク質である CofA は、*V. cholerae* の主要線毛構成要素である TcpA と高い構造相同性を有している (17)。pEntYN10 の CofA のアミノ酸配列は、ETEC 260-1 株のプラスミドである pSH1134 がコードする CofA と 73.2% の相