

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）

平成 28 年度 総括研究報告書

ゲノム情報を基盤とした国内外で流行する病原大腸菌の  
データベース化と検査態勢の整備に関する研究

研究代表者 井口 純（宮崎大学農学部・准教授）

研究要旨

海外からの食品の輸入や旅行者の往来が頻繁な昨今において、国際的な流行状況にも注意を払いながら、我が国における病原大腸菌の侵入や汚染実態を監視し、食の安全を確保する必要がある。本研究では、世界で流行する毒素原性大腸菌（ETEC）に注目し、世界流行株と国内分離株の細菌学的または遺伝学的な解析を行い、国際的な流行状況下における国内の動向を把握することを目的とした。本年度は、大阪府立公衆衛生研究所などで分離された代表株 146 株を輸入事例と国内事例に区分して O 血清群の分布などを比較するとともに、系統解析結果と、O 血清群やエンテロトキシン型、分離年との関連性を明らかにした。さらに、海外分離株のゲノム情報を基に新規 10 種類の O 血清群遺伝子型（Og タイプ）を見出し、その一つである OgN5 は世界で流行する ETEC の主要 Og タイプの一つであることを明らかにした。ETEC の新たな検査法として、3 種類の新規 Og タイプ（OgN5、OgN4、OgSB16）を特異的に判定出来る PCR 法を開発した。さらに、国内事例で最優勢である O159 を標的とした免疫磁気ビーズを作製し、その実用性を評価した。以上の成果により、世界的に流行する ETEC の動向と、国内で流行する ETEC の傾向、そしてそれぞれの表現型や遺伝子型の特徴が明らかとなった。

研究分担者

・勢戸 和子

（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）

・西井 啓修

（宮崎大学・農学部・学生）

研究協力者

・中村 寛海

（大阪市立環境科学研究所・研究主任）

・原田 哲也

（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）

A. 研究目的

海外からの食品の輸入や旅行者の往来が頻繁な昨今において、国際的な流行状況にも注意を払いながら、我が国における病原微生物の侵入や汚染実態を監視し、食の安全を確保する必

要がある。

腸管毒素原性大腸菌（enterotoxigenic *Escherichia coli* : ETEC）は発展途上国を中心に世界中に広く感染事例が報告されている下痢原性大腸菌である<sup>1</sup>。ETECの特徴はエンテロトキシンの産生と定着因子抗原（colonization factor antigen : CFA）であり、一般的にはそのどちらもが可動的遺伝因子であるプラスミド上にコードされている。エンテロトキシンは、粘膜上皮細胞に傷害を与えることなく水分と電解質の漏出をもたらす毒素で、60～30分の加熱で活性を失う易熱性毒素（heat labile enterotoxin : LT）と、100～15分の加熱に耐える耐熱性毒素（heat stable enterotoxin : ST）の2種があり、ETECはこの両方または片方を産生して下痢を引き起こす<sup>2</sup>。STは塩基配列の違いによって、ブタ由来株で発見された *stp*（実際には、ヒトやウシなどから分離されるETECにもみられる）と、ヒト由来株にみられる *sth* に分けられる<sup>2</sup>。ETECの感染には粘膜上皮細胞への接着が必要で、線毛型または非線毛型のCFAがそれを担っている。CFAは現在のところ、少なくとも25種類が確認されている<sup>3,4</sup>。

発展途上国では乳幼児や小児における感染で重症例がみられ、コレラと同様に脱水症状に陥ることもある。2010年の報告によると、発展途上国において年間157,000人の乳幼児がETECを原因として死亡していると推計されており、これは下痢症を原因とする死亡者の9%に相当し、28日齢から3歳齢の死亡要因の約1%を占める<sup>5</sup>。ETECは先進国からの旅行者が流行地域で感染する下痢症原因菌としても有名であり、特に上下水道が整備されていない地域への旅行者が、生水やサラダ、果物などの

汚染食品を喫食したことによって感染すると考えられている。

我が国でのETECによる重症化事例は稀である。主な症状は水様性下痢であり、一部に嘔吐を伴うこともある。現在、感染症法においてETEC感染症は「感染性胃腸炎（5類感染症）」に該当し、小児科定点医療機関（全国約3,000カ所の小児科医療機関）による届け出が必要となっている。国立感染症研究所においては「VTECを除く病原大腸菌」としてその報告数が集計されており、2000年から2014年の15年間に地方衛生研究所および保健所から報告されたETECの検出数は約2400件であり、そのうちの約350件は海外旅行からの帰国者から分離されたものであった<sup>6</sup>。海外旅行者に関連しない国内事例では100名を超える大規模な集団食中毒事例も散発しており、2012年にはETEC O148 (ST+)による500名以上の感染者を出す事例が発生した<sup>7</sup>。本事例は単独の会社が営業する複数の給食施設を原因とし、7自治体にまたがる広域集団食中毒事例となった。

東京都ではETECの調査・研究が継続して行われており、1966年から2005年に都内で発生したETEC集団下痢症は121事例にのぼる<sup>8</sup>。そのうちST単独産生菌によるものが最も多く97事例、次にLTとST両毒素産生菌によるものが39事例、LT単独産生菌によるものが12事例となっている。血清型としてはO6:H16/NM (LT+, ST+)によるものが35事例を占め、次いでO169:H41/HNM (ST+)が31事例、O27:H7/H20/HNM (ST+)が23事例、O148:H28 (ST+)が17事例、O25:HNM (ST+ または LT+) が12事例、O159:H20/H34/HNM (ST+)が10事例となっている。O169およびO25のETECは1990年

以降に認められるようになり、2000 年以降では O169 が最優勢の血清群であった。EPEC による集団事例の中には、複数の血清型・毒素型を示す菌株が分離されることもあり<sup>9,10</sup>、雑多な EPEC に汚染した食品や飲料水の摂取が原因と推測されるケースも多い。

世界で流行する EPEC については、特に発展途上国で分離される EPEC の各国における特徴などが報告されている。また、2015 年には研究代表者（井口）も参加した国際ゲノムプロジェクトにおいて、1980 年から 2011 年にかけて世界 20 カ国で分離された EPEC 362 株のゲノム情報と菌株の分離年・分離地などに基づく解析が行われ、EPEC の時空間的な変遷とゲノム進化の概要が報告された<sup>4</sup>。その中で、主要な系統群と、それぞれのエンテロトキシン型および CFA が関連していることから（O6/ST2353/*lt+sth*/CS1+CS3、O25/ST1312/*lt* or *sth*/CS6+CS8、O27/ST398/*stp*/CS6 など）、それぞれの系統に EPEC の病原遺伝子を含むプラスミドが比較的高度に保存されていることが明らかとなった。

国内で分離される EPEC（国内分離株）の中には、国外旅行先で感染して帰国後に分離されるケース（輸入事例）と、海外旅行に関連しない国内で感染したと思われるケース（国内事例）が含まれるが、それらの関係性や傾向について詳細に比較した報告は、上述した東京都の調査を含めてこれまでに無く、それら国内分離株と世界的に流行する EPEC との共通点や相違点も不明である。わが国における EPEC 感染症対策を考える上で、まずは上記で述べたそれぞれの特徴を明らかにすることが必要である。そこで本研究では、ゲノム情報を有効に利用し、国

内外で分離される EPEC の特徴と傾向を明らかにするとともに、EPEC の検査や監視の強化に資する分離法や細分類法の開発を目指した。

## B. 研究方法

### 1. EPEC 供試菌株（国内分離株）

1995 年から 2015 年にかけて大阪府立公衆衛生研究所または大阪市立環境科学研究所において、下痢症患者から分離された EPEC 263 株のうち、昨年度の本研究で得た O 血清群とエンテロトキシン型の結果を基に、各事例内で選抜した代表株 146 株を用いた（表 1）。

### 2. PCR など

PCR などの遺伝学的な試験には、Wizard Genomic DNA Purification Kit（プロメガ）により精製した菌株 DNA（10ng/μl）を使用した。すべての PCR では KAPATaq EXtra PCR キット（日本ジェネティクス）を使用した。エンテロトキシン型（*lt/stp/sth*）は、Sjoling ら<sup>11</sup>が報告したプライマーを用い、マルチプレックス PCR 法により検出した。O 血清群遺伝子型（Og タイプ）の判定は、20 種類のマルチプレックス PCR を用いた *E. coli* O-genotyping PCR 法により判定した<sup>12</sup>。

### 3. 進化系統解析

染色体上の 7 つの housekeeping 遺伝子（*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *perC*, *recA*）の塩基配列を決定し、Web ツール（<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>）により Sequence Type（ST）を決定した（Multilocus sequence typing；MLST）<sup>13</sup>。さらに上記 7 遺伝子の配列情報を用いて、MEGA6.06 ソフトによる Neighbor-joining 法

で系統樹を作成した。Bootstrap value は 1000 に設定し、Tamura-Nei モデルを使用した。

#### 4. ETEC のゲノム解析 (海外分離株)

von Mentzer<sup>4</sup> らが 2015 年に報告した、1980 年から 2011 年にかけて世界 20 カ国で分離された ETEC 362 株 (16 株の日本分離株を含む) の菌株情報およびゲノム情報を用いた。Og タイプは、大腸菌全 O 血清群標準株 (O1-O187) の O 抗原合成遺伝子領域から抽出した *wzx/wzy* および *wzm/wzt* 遺伝子の配列セットを用い<sup>14</sup>、BLASTN による相同性検索により判定した。次世代シーケンサーにより得られた配列情報のアセンブリには Velvet を用いた。遺伝子予測には IMC (インシリコクローニング) を用い、DNA データベースへの BLASTN または BLASTP による相同性検索によりアノテーションを行った。

#### 5. 家畜・野生動物の糞便検体

大阪市食肉市場でと畜された家畜牛から収集した糞便 48 検体、家畜豚から収集した糞便 9 検体、宮崎県内の猟友会の協力により野生のニホンジカから収集した糞便 114 検体、イノシシから収集した糞便 7 検体を用いた。検体は収集後、本研究に使用するまで 4℃ で輸送・保存した。

#### 6. ETEC スクリーニング試験

糞便検体を同量の生理食塩水で懸濁後、懸濁液約 20  $\mu$ l を DHL 寒天平板培地に塗抹して培養した。培地上に生育した菌床をかき集めて生理食塩水 1ml に懸濁し、その懸濁液を用いてアルカリ熱抽出法により DNA を調製し

た。ETEC のマーカーとなるエンテロトキシンを標的とした マルチプレックス PCR 法により ETEC 存在の有無を確認した (コロニースweep PCR 法)。さらにスクリーニング試験で ETEC 陽性となった検体については、残しておいた菌床をかき集めた懸濁液を段階希釈して別の DHL 寒天平板培地に塗抹して培養し、生育した単コロニー (95-190 コロニー) についてエンテロトキシン毒素遺伝子を検出する PCR を行い、ETEC であるか否かの確認を行った。単離された ETEC はエンテロトキシン型<sup>11</sup> および O-genotyping PCR により Og タイプ<sup>12</sup> を判定した。

#### 7. 免疫磁気ビーズ法

デンカ生研で販売されている O159 抗血清と Dynabeads M-280 (ダイナル社) を用いて、抗 O159 免疫磁気ビーズを作製した。詳細については、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル (2017 年 2 月改訂) に記載の手順に従った<sup>15</sup>。O159 (O 血清群標準株) の純培養液を用いた評価では、LB ブロスで一晩培養した菌液 1ml と作製した免疫磁気ビーズ 25  $\mu$ l を混和後、10 分おきに転倒混和して 30 分間室温で反応させた。その後マグネット板でビーズを間壁に接着させて上清を除去し、生理食塩水 1ml に再懸濁した。この操作を 2 回行った後に、菌液を段階希釈して LB 寒天平板培地に塗抹した。培養液 (原液) も段階希釈して LB 寒天平板培地に塗抹した。それぞれの菌液の生育コロニー数を比較することで、免疫磁気ビーズ法による回収率を評価した。糞便検体の場合は、検体 2g を TSB 培地 18ml で 6 時間 37℃ で培養後、その上清 1ml と免疫磁気ビーズを混和し、その後は上記と

同じ手順で操作した。ただし寒天平板培地には DHL 培地を用いた。

(倫理への配慮)

ヒト由来株については、既に連結不可能匿名化されている情報のみを用いて研究を行った。

## C. 結果

### 1. 国内分離株の特徴

#### (1) 代表株の選抜

国内で分離された ETEC 263 株について、エンテロトキシン型と O 血清群の結果を基に、散発事例由来株について、同一患者由来株が複数含まれる場合 (10 患者由来 21 株) エンテロトキシン型および O 血清群が同一であるときは代表株一株を選抜し (9 患者由来 9 株) エンテロトキシン型および O 血清群が異なるときはそれぞれ一株を選抜した (1 患者由来 2 株)。一患者由来一株の場合 (90 株) は、すべてを代表株とした。集団事例由来株について、同一事例由来株が複数含まれる場合 (19 事例由来 144 株) エンテロトキシン型および O 血清群が同一であるときは代表株一株を選抜し (11 事例由来 11 株) エンテロトキシン型および O 血清群が異なるときはそれぞれのタイプおよび群から一株を代表株として選抜した (8 事例由来 29 株)。同一事例由来株が一株のみの場合 (5 事例由来 5 株) は、すべてを代表株とした。以上の結果、散発事例由来株では 100 事例由来 101 株、集団事例由来株では 24 事例由来 45 株の計 146 株を代表株として (表 1)、以下の試験に用いた。

#### (2) 輸入事例株と国内事例株の特徴

代表株 146 株を患者の旅行歴を基に区分す

ると (表 1) 輸入事例株は 84 事例由来 97 株、国内事例株は 40 事例由来 49 株であった。散発事例株のうち輸入事例株が 78 事例由来 79 株、国内事例株が 22 事例由来 22 株であった。集団事例株のうち輸入事例株が 6 事例由来 18 株、国内事例株が 18 事例由来 27 株であった。分離年別でみると、1995-2006 年に分離されたものが 97 事例由来 109 株、2007-2015 年に分離された株が 27 事例由来 37 株であった。

輸入事例株 97 株の患者渡航先は、東南アジア 48 株 (インドネシア 21 株、シンガポール 1 株、タイ 15 株、フィリピン 2 株、ベトナム 5 株、マレーシア 2 株、ベトナムとカンボジア 2 株) 中国 (香港を含む) 21 株、南アジア 21 株 (インド 17 株、ネパール 3 株、バングラディシュ 1 株) アフリカ 6 株 (エジプト 5 株、タンザニア 1 株) イタリア 1 株であった。

輸入事例株と国内事例株別に O 血清群分布を調べたところ、輸入事例株の上位 3 血清群は O6 (25%)、O25 (20%)、O126 (15%) であり、国内事例株は O159 (24%)、O25 (18%)、O169 (16%) であった。輸入事例株で 15% を占めていた O126 は、国内事例株には 1 株も含まれていなかった。輸入事例株で 25% を占めた O6 は、国内事例株では 8% しか含まれていなかった。対照的に、輸入事例株で 6% しか含まれていなかった O159 は、国内事例株では 24% を占めた (図 1)。

輸入事例株を 4 つの渡航地域別 [中国 (n=21)、東南アジア (n=48)、南アジア (n=21)、アフリカ (n=6)] に区分して O 血清群分布を調べると、それぞれの最優勢 O 血清群は、中国では O25、東南アジアでは O126、南アジアでは O6、アフリカでは O153 であった (図

2)。

### (3) 系統群と O 血清群の関係

7 遺伝子の配列情報(計 3423 bp)を基にした系統解析の結果、3 株以上で形成される相同性 100%の系統群は 12 種類確認され、それぞれ既報の ST に該当した(ST4、10、94、173、182、218、316、443、1312、1491、2353、3931)(図 3)。O6 の ST2353 と ST4 のように同一血清群の中で近縁ではあるが異なる ST に分かれるものや、O25 の ST1312、ST1491、ST3931 から成る系統群と ST1201 のように同一 O 血清群であるが系統的に明らかに異なるグループに属しているものも確認された。また O167 と O115 が含まれる ST443 や、O126 と O128 が含まれる ST173 のように同一 ST 内に複数の O 血清群を含むものも確認された。

### (4) 系統群とエンテロトキシン型の関係

系統群とエンテロトキシン型を図 3 で示す。O6/ST4 に属するすべての株は *It* と *sth* の両方が陽性であり、O6/ST4 と近縁な O6/ST2353 に属する株でも、1 株 (*It* 単独陽性)を除くすべての株で *It* と *sth* の両方が陽性であった。O25/ST1312 に属する株の 14 株中 13 株(93%)は、*sth* 単独陽性であった。O25/ST1491 および ST3931 に属する株は O25/ST1312 と同じ血清群であるにもかかわらず、すべて *It* 単独陽性であった。その他、O159/ST218 に属するすべての株が *sth* 単独陽性、O27/ST316 に属するすべての株が *stp* 単独陽性、O169 および O167/ST182 に属する 14 株中 13 株(93%)が *stp* 単独陽性(93%)、O126 および O128/ST173 に属するすべての

株が *sth* 陽性であった。以上の結果より、ST とエンテロトキシン型にはある程度の関連性が確認された。

### (5) 系統群と CFA の関係

系統群と CFA の関係を図 3 で示す。O6/ST2353 に属する株はすべて CS1 を保有しており、10 株中 9 株(90%)は CS21 も保有していた。O25/ST1312 および ST1491 に属するすべての株が CS21 を保有しており、O25/ST1491 に属するすべての株は CS6 も保有していた。O25/ST1201 に属する株はすべて CS4 を保有していた。O169 および O167/ST182 に属する株の 14 株中 11 株(78%)が CS6 を保有していた。O126 および O128/ST173 に属する株の 17 株中 13 株(76%)が CFA/I を保有しており、17 株中 16 株(94%)は CS21 を保有していた。O159/ST218 に属するすべての株は CFA が検出されなかった。以上の結果より、CS1、CS4、CS6、CS21、CFA/I は特定の系統群に集中して分布していることが確認された。

### (6) 系統群と薬剤感受性との関係

系統群と薬剤感受性との関係を図 3 で示す。O159/ST218 に属するすべての株は NA に耐性を示した。O169 および O167/ST182 に属するすべての株は TC に耐性を示した。O126 および O128/ST173 に属する株の 17 株中 13 株(76%)が SM に耐性を示し、14 株(82%)が TC に耐性を示し、13 株(76%)が Su に耐性を示した。以上の結果より、薬剤の耐性は各系統群でまばらであるが、TC、NA、Su など一部で特定系統群との関連性が確認された。

## (7) 系統群と分離年の関係

系統群と分離年の関係を図3で示す。O126およびO128/ST173に属する株はすべて2000年以前に分離された株であった。O6/ST2353に属するすべての株は2000年以前に分離されているのに対し、O6/ST4に属する株は2000年以前の分離株と2007年以降の分離株が含まれていた。O25の近縁な3つのST(ST1312、ST1491、ST3931)では、ST3931に属する株はすべて2000年以前に分離されているのに対し、ST1312に属する株は2000年以前の株と2001年以降の分離株が含まれており、ST1491に属する株においてはすべてが2007年以降の分離株であった。O159/ST218に属する株の9株中7株(78%)は2007年以降に分離された株であった。以上の結果より、O25/ST1491とO159/ST218は特に近年流行しているSTであることが確認された。

## 2. 海外分離株から見出した新規Ogタイプ

### (1) O抗原合成遺伝子群の解析

主に海外で分離されたETEC 362株のゲノム情報に対して、既知のO抗原合成遺伝子情報を用いた*in silico*での相同性検索を行ったところ55株でOgタイプが判定出来なかった(表2)。これら判定不能であった全株のドラフトゲノムからO抗原合成遺伝子領域を抽出して解析したところ、10種類のO抗原合成遺伝子領域にまとめられた(図4)。*wzx/wzy*を抽出して既知の*wzx/wzy*セット(Ogタイプを判定する遺伝子マーカー)と比較したところ、相同性は低く(70%以下)(図5)。9種類が新規Ogタイプであることが確認された

(OgN2、OgN3、OgN4、OgN5、Ogn13、OgN14、OgN15、OgN16、OgN17)(図4)。さらに1種類は*Shigella boydii* type 10のO抗原構成遺伝子領域と高い相同性(97%以上)を示し、OgSB16と名付けた。

### (2) 新規Ogタイプの分布

全362株のうち、最優勢であるO6(38株、10.5%)に続き、OgN5は29株(8%)を占めた(図6)。OgN5に属するETECの分離地は、グアテマラ(12株)、アルゼンチン(5株)、メキシコ(4株)、エジプト(5株)、インドネシア(4株)であった(表2)。さらにOgN3は8株〔グアテマラ(2株)、アルゼンチン(2株)、メキシコ(2株)、エジプト(1株)、バングラディッシュ(1株)〕、OgSB16は8株〔グアテマラ(4株)、アルゼンチン(3株)、エジプト(1株)〕(いずれも2.2%)であった(表2)。その他、OgN13は3株〔インドネシア(2株)、グアテマラ(1株)〕、OgN15は2株〔グアテマラ(2株)〕、OgN2〔インドネシア(1株)〕、OgN4〔ボリビア(1株)〕、OgN14〔日本(1株)〕、OgN16〔インドネシア(1株)〕、OgN17〔インドネシア(1株)〕であった(表2)。

## 3. 検査法の開発

### (1) 新規O血清群判定PCR法の開発

3種類のO血清群(OgN5、OgN3、OgSB16)を対象に、それぞれを特異的に検出できるPCR法の開発を行った。それぞれの*wzy*上にプライマーセットをデザインし(表3)、[94°C-30秒、58°C-30秒、72°C-1分]×25サイクルの反応条件で、参考株(OgN5; EHOUT43、OgN3; OT-37、OgSB16;

EH-OSB16)で増幅するとともに(整合性の確認)(図7)、大腸菌全O血清群標準株(O1-O188)および対象外の参考株では増幅しないことを確認した(特異性の確認)。本法を用いて国内分離株でPCRを実施したところ、2000年にエジプトからの帰国者から分離された2株(いずれもO群ではO153と判定)がOgN3と判定された。

#### (2) 抗O159免疫磁気ビーズ法

国内分離株の最優性O血清群であるO159を特異的かつ効率的に検出できる手法として、抗O159免疫磁気ビーズを作製した。O159株を用いて免疫磁気ビーズを介した培養液からの回収率を評価したところ、6回実施した独立試験の平均回収率は36%であった(26%~46%)。本手法を用いて牛糞便6検体、豚糞便9検体、野生シカ糞便6検体でO159の分離を試みた。免疫磁気ビーズで処理後、DHL寒天平板上に塗抹して生育した94コロニーについて、O159に特異的なPCRで確認したところ、豚由来1検体(19コロニー)、野生シカ由来5検体(19、93、1、24、43コロニー)でO159が分離された。しかし、エンテロトキシン遺伝子を検出するPCRで確認したところ、いずれも陰性でありETECでは無かった。

#### 4. 家畜・野生動物におけるETECの調査

コロニースリーブPCR法による陽性検体数および陽性検体からの分離数を表4に示す。牛48検体のうち、*sth*陽性が18検体(38%)、豚9検体のうち、*It*陽性が1検体(11%)、*sth*陽性が3検体(27%)であった。シカ114検体では*sth*陽性が1検体(1%)、*stp*陽性が10検体

(9%)であった。分離できたETECについては、現在OgタイプやCFAの判定を実施中である。

#### D. 考察

本研究では輸入事例株と国内事例株に分けて解析したことで、海外渡航者から分離されるO血清群と国内で流行するO血清群の傾向と特徴が明らかとなった。Wolfら<sup>16</sup>は、エジプト、タイ、ブラジル、サウジアラビアなどの国々を含む世界17地域で集められたETECのデータ(988株)を解析し、上位O血清群はO6(16.8%)、O78(11.7%)、O8(10.7%)、O128(7.6%)、O25(6.7%)であると報告している。また国別での調査結果を見てみると、東南アジアに位置するタイでは1996-2000年に12歳未満の下痢症患者から集められた78株のETECを調査し、上位O血清群はO6(13%)、O25(9%)、O169(8%)、O126(5%)であると報告している<sup>17</sup>。南アジアに位置するバングラディシュではヒト患者から集められた99株のETECを調査し、O6(28%)、O115とO128(ともに22%)が主要なO血清群であると報告している<sup>18</sup>。アフリカに位置するエジプトでは3歳未満の下痢症患者から集められた915株のETECを調査し、O78(5.6%)、O6(5.5%)、O8(4.8%)、O128(4.7%)が主要なO血清群であると報告している<sup>19</sup>。中国では2009-2012年にヒト患者から集められた62株のETECを調査し、上位O血清群はO6(18%)、O148(15%)、O159(11%)、O25(10%)であると報告している<sup>20</sup>。本研究において、O6とO25は東南アジア、南アジア、中国およびアフリカへの渡航者からの分離株に含まれていた(図2)。またO128は南アジア(インド5



株、ネパール 1 株)とアフリカ(エジプト 1 株) O159 は中国(香港を含む)(5 株) O126 は東南アジア(タイ 1 株、ベトナムまたはカンボジア 1 株、インドネシア 13 株)への渡航者から分離されており(図 2) 上記の地域や国で報告された主要な O 血清群と一致していることから、海外渡航者がそれぞれの国を訪れた際に各国で流行する主要な ETEC に感染したものと推測された。また本研究における国内事例株の上位 O 血清群は O159(24%)、O25(18%)、O169(16%)であった(図 1)。国内事例株の主要な O 血清群に含まれる O159 と O25 は、Chen ら<sup>20</sup>が報告した中国の主要な O 血清群に含まれており、さらに国内事例で多く分離された O159/ST218 と O25/ST1491 は中国のヒト患者からも確認されている<sup>20,21</sup>。このことから、中国で流行する ETEC と同一 O 血清群かつ同一系統の株が、わが国でも流行している可能性が示唆された。

ETEC は子豚や子牛などの家畜に下痢症を引き起こす原因菌としても分離される。Katsuda ら<sup>22</sup>は日本で 2001 年から 2003 年に下痢症の子豚から分離された 83 株の大腸菌から 76 株の ETEC を同定し、O 血清群は O149(43.4%)、O141(18.4%)、O20(17.1%)、O8(11%)、O9(9.2%)、O64(1.3%)であると報告している。Matayoshi ら<sup>23</sup>は日本の沖縄で 1989 年から 1998 年に下痢症の子豚から分離した 79 株の ETEC を解析し、O 血清群は O149(72.1%)、O8(10.1%)、O20(8.8%)、O9(3.8%)、O141(3.8%)、O64(1.3%)であると報告している。また大橋ら<sup>24</sup>は日本で 1987 年から 1988 年に下痢症の子牛から分離された 270 株の大腸菌から 33 株の ETEC を同定し、O 血清群は O101(54.5%)、O9(42.4%)、

O8(3.0%)であると報告している。ヒト患者から分離される ETEC と下痢症の家畜から分離される ETEC の O 血清群の傾向は異なっており、それぞれ異なる系統群が原因になっていると予想された。しかしヒト患者由来株の中には O8(1.4%)、O9(0.7%)、O20(0.7%)、O64(1.4%)など下痢症の家畜由来株と共通する O 血清群が存在することも確認された。上記の報告では ST などを判定しておらず両者の詳細な関連性は不明であるが、人獣共通感染症の原因となる ETEC の存在も疑われたことから、その関係を明らかとするために MLST などを用いたさらなる解析が必要であると考えられた。

海外分離株のゲノム解析から 10 種類の新規 Og タイプを見出し、さらに主要な 3 種類の新規 Og タイプ(OgN5、OgN3、OgSB16)を判定出来る PCR 法を開発した。本手法は ETEC の O 血清群を細分類する上で有用な手法になると考えられた。今後は残る新規 Og タイプを判定出来る PCR 法も開発していきたい。

食品や患者から ETEC を効率的に分離する手法として選択培地などの分離法が必要となるが、ETEC における分離手法はまだ確立されておらず、その開発が求められる。前年度の本研究において ETEC の薬剤感受性試験を行ったところ、選択培地への添加剤として有効な抗菌薬は見出せなかった。そこで、O 血清群の判定結果を基に、国内事例で最優勢である O159 を標的とした免疫磁気ビーズを作製し、その評価と実用試験を行った。評価においては回収率が 26%以上を維持したことから、検体中に低濃度で含まれる O159 を効率的に回収できることが期待された。免疫磁気ビーズを用いた家畜と野生動物の糞便検体からの分離試験では、残念

ながら ETEC は分離できなかったが、特にシカ検体から O159 が高率に分離できたことから、その実用性が期待された。今後の課題として、ETEC にみられる複数の O 血清群を標的としたマルチプレックス免疫磁気ビースが、ETEC を標的としたより実用的な手法になるのではないかと考えられた。

#### E. 結論

国内で分離された ETEC の輸入事例株と国内事例株の特徴が明らかとなり、国内事例株の傾向は中国へ旅行した帰国者から分離される ETEC の傾向と共通していた。さらに海外で分離される ETEC の特徴も明らかとなり、10 種類の新規 Og タイプを見出した。ETEC 検査法として、主要な 3 種類の Og タイプを判定出来る PCR 法を開発した。さらに国内事例で主要な O159 を標的とした免疫磁気ビースを作製してその実用性を評価した。以上の成果は ETEC の検査や監視を強化する上で重要な基盤情報になると考えられた。

#### F. 健康危惧情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

西井啓修、勢戸和子、原田哲也、中村寛海、加藤結子、井口純、国内で分離された腸管毒素原性大腸菌の特徴解析、日本細菌学会九州支部総会、2016 年 9 月 1-2 日、宮崎市

西井啓修、勢戸和子、原田哲也、中村寛海、加藤結子、井口純、国内で分離された腸管毒素原性大腸菌の特徴解析、日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月 14-16 日、東京

井口純、秋吉充子、三澤尚明、野生シカから高頻度に分離される腸管出血性大腸菌 O146、日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月 14-16 日、東京

#### H. 知的財産権の出願

なし

#### 参考文献

1. World Health Organization. Diarrhoeal Diseases (Updated February 2009) (World Health Organization, Geneva, 2009).
2. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 18: 465–483 (2005).
3. Gaastra W & Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* 4: 444–452 (1996).
4. von Mentzer A, Connor T, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm A, Sjöling A, Dougan G. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution.

- Nat Genet 46: 1321–1326 (2014)
5. Initiative for Vaccine Research (IVR) Diarrhoeal Diseases (Updated February 2009): Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): World Health Organization; 2009. Available: [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/diarrhoeal/en/index4.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index4.html).
  6. 国立感染症研究所 IASR 集計  
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/230-iasr/iasr-data/3037-iasr-table-b-pm.html>
  7. 病原微生物検出情報月報 (IASR) 腸管毒素原性大腸菌 O148 の大規模広域食中毒事例の概要 33(1): 9-12 (2012)
  8. 東京都健康安全研究センター 東京都微生物検査情報 (月報) 東京都における毒素原性大腸菌集団下痢症、第 27 巻 4 号 (2006)
  9. 財津修一、椿本亮、池田嘉子、栗原淑子、小田隆弘、4 種類の毒素原性大腸菌が分類された海外渡航者下痢症例、福岡市保健研報 22: 115-118 (1997,8)
  10. 小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、門間千枝、甲斐明美、辻孝雄、6 種類の毒素原性大腸菌が検出された仕出し弁当を原因とする集団食中毒事例と Colony-sweep PCR 法を応用した検査法について、感染症学雑誌 83(5): 490-495 (2009)
  11. Sjöling A, Wiklund G, Savarino SJ, Cohen DI, Svennerholm AM Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. J Clin Microbiol. 45: 3295-3301 (2007)
  12. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M; Pathogenic *E. coli* working group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping J Clin Microbiol. 53: 2427-2432 (2015)
  13. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol. 60:1136-1151 (2006)
  14. Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. DNA Res 22:101-107 (2015)
  15. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル (2017 年 2 月改訂) 伊豫田淳ら . <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20170215.pdf#search=%27%E8%85%B8%E7%AE%A1%E5%87%BA%E8%A1%80%E6%80%A7%E5%A4%A7%E8%85%B8%E8%8F%8C+%E3%83%9E%E3%83%8B%E3%83%A5%E3%82%A2%E3%83%AB+%E6%A4%9C%E6%9F%BB%27>
  16. Wolf MK. b Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 10:569-84 (1997)
  17. Ratchtrachenchai OA, Subpasu S,

- Hayashi H, Ba-Thein W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *J Med Microbiol.* 53:237-243 (2004)
18. Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Begum YA, Kühn I, Nair GB, Sack DA, Svennerholm AM, Qadri F. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrhoeal patients in Bangladesh using phenotyping and genetic profiling. *J Med Microbiol.* 56:217-222 (2007)
19. Shaheen HI, Khalil SB, Rao MR, Abu Elyazeed R, Wierzba TF, Peruski LF Jr, Putnam S, Navarro A, Morsy BZ, Cravioto A, Clemens JD, Svennerholm AM, Savarino SJ. Phenotypic profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with early childhood diarrhea in rural Egypt. *J Clin Microbiol.* 42:5588-5595 (2004)
20. Chen Y, Chen X, Zheng S, Yu F, Kong H, Yang Q, Cui D, Chen N, Lou B, Li X, Tian L, Yang X, Xie G, Dong Y, Qin Z, Han D, Wang Y, Zhang W, Tang YW, Li L. Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. *Clin Microbiol Infect.* 20:52-58 (2014)
21. Pan H, Zhang J, Kuang D, Yang X, Ju W, Huang Z, Guo J, Li Y, Zhang P, Shi W, Jin H, Shi X, Xu X, Meng J. Molecular analysis and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrheal patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 81:126-131 (2015)
22. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest.* 18:350-354 (2006)
23. 又吉正直、貝賀眞俊、大城聡、中澤宗生、沖縄県で分離された子豚下痢由来腸管毒素原性大腸菌(ETEC)の細菌学的性状と病原遺伝子保有状況、*日本獣医学会誌* 54:595-600 (2001)
24. 大橋秀一、山田裕、芝文彦、芳賀嘉久、味戸忠春、わが国における子牛下痢からの毒素原性大腸菌検出状況、*東北家畜臨床研究会誌* 15:1-4 (1992)

表 1 . 国内分離 ETEC 株の代表 146 株の概要

	散発/集団	輸入事例	国内事例	計	
株数(事例数)	計	97(84)	49(40)	146(124)	
	散発	79(78)	22(22)	101(100)	
	集団	18(6)	27(18)	45(24)	
分離年別株数(事例数) 1995-2006年	散発	74(73)	13(13)	87(86)	109 (97)
	集団	6(3)	16(8)	22(11)	
分離年別株数(事例数) 2007-2015年	散発	5(5)	9(9)	14(14)	37 (27)
	集団	12(3)	11(10)	23(13)	

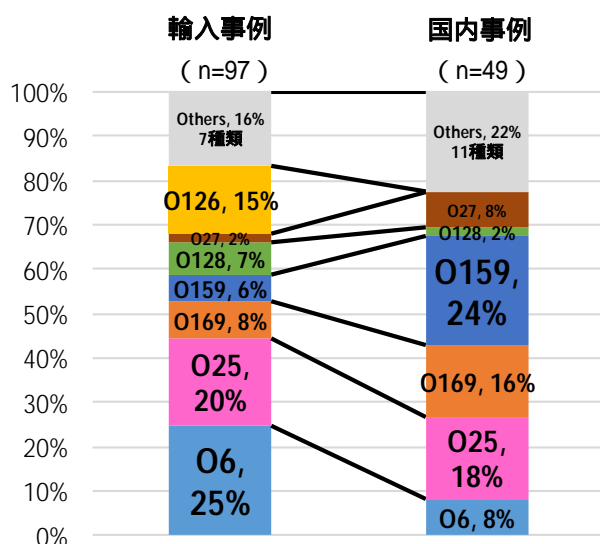


図 1 . 国内分離株の輸入事例と国内事例別にみた O 血清群の分布

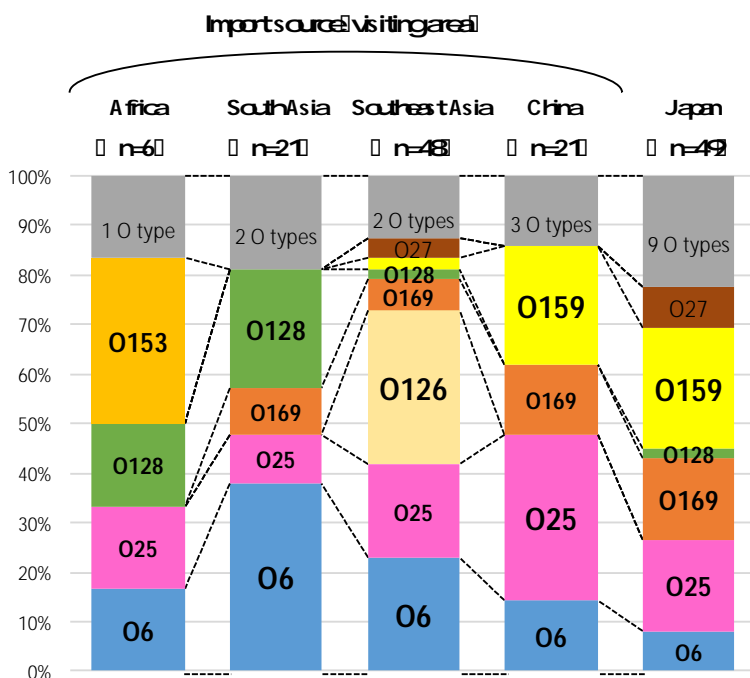


図 2. 輸入事例株の 4 地域別にみた O 血清群の分布



表 2 . 既知の Og タイプに分類されない主に海外で分離された ETEC 55 株のリスト

Strain	O genotype	Origin (Country)	Year of isolation	Toxin profile
E1542	OgN5	Argentina	1989	It
E1594	OgN5	Argentina	1989	ST
E1526	OgN5	Argentina	1989	ST
E1534	OgN5	Argentina	1989	ST
E1599	OgN5	Argentina	1989	ST
E1193	OgN5	Egypt	2001	ST
E1102	OgN5	Egypt	2000	ST
E998	OgN5	Egypt	1997	ST
E1282	OgN5	Egypt	2001	ST
E620	OgN5	Guatemala	2000	ST
E626	OgN5	Guatemala	2000	ST
E704	OgN5	Guatemala	2001	ST
E705	OgN5	Guatemala	2001	ST
E811sc	OgN5	Guatemala	2002	ST
E828	OgN5	Guatemala	2002	ST
E618	OgN5	Guatemala	2000	ST
E703	OgN5	Guatemala	2001	ST
E621sc	OgN5	Guatemala	2000	ST
E710sc	OgN5	Guatemala	2001	ST
E390	OgN5	Guatemala	1999	ST
E890	OgN5	Guatemala	2003	ST
E1623	OgN5	Indonesia	1990	ST
E1637	OgN5	Indonesia	1990	ST
E1674	OgN5	Indonesia	1990	ST
E1638	OgN5	Indonesia	1990	ST
E354	OgN5	Mexico	1998	ST
E356	OgN5	Mexico	1998	ST
E513	OgN5	Mexico	2000	ST
E509sc	OgN5	Mexico	2000	ST
E1548	OgN3	Argentina	1989	sth
E1604	OgN3	Argentina	1989	sth
E562	OgN3	Mexico	2000	sth
E563	OgN3	Mexico	2000	sth
E636	OgN3	Guatemala	2000	sth
E897	OgN3	Guatemala	2003	sth
E956	OgN3	Egypt	1997	It
E2981sc	OgN3	Bangladesh	2010	It
E1525	OgSB16	Argentina	1989	It+sth

E1574	OgSB16	Argentina	1989	lt
E1581	OgSB16	Argentina	1989	lt
E604	OgSB16	Guatemala	2000	lt+stp
E616	OgSB16	Guatemala	2000	lt+stp
E628	OgSB16	Guatemala	2000	lt+stp
E855	OgSB16	Guatemala	2003	lt
E949	OgSB16	Egypt	1997	lt
E1650	OgN13	Indonesia	1990	lt
E1682	OgN13	Indonesia	1990	lt
E645	OgN13	Guatemala	2000	lt
E167	OgN14	Japan	1983	lt
E819	OgN15	Guatemala	2002	lt
E821	OgN15	Guatemala	2002	lt
E1642	OgN16	Indonesia	1990	lt+stp
E1647	OgN17	Indonesia	1990	lt
E1657	OgN2	Indonesia	1997	lt+stp
E2348	OgN4	Bolivia	2007	lt+ST

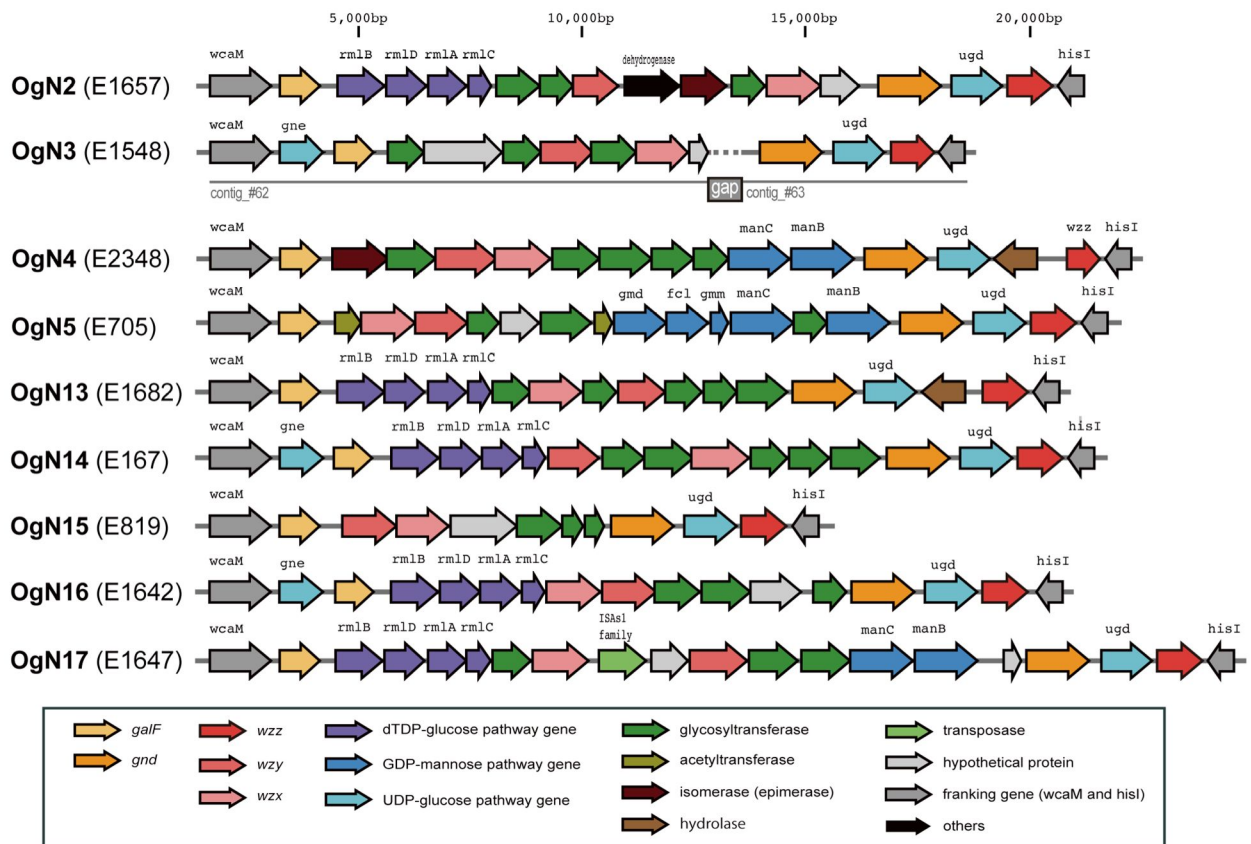


図4. 9種類の新規OgタイプのO抗原合成遺伝子領域



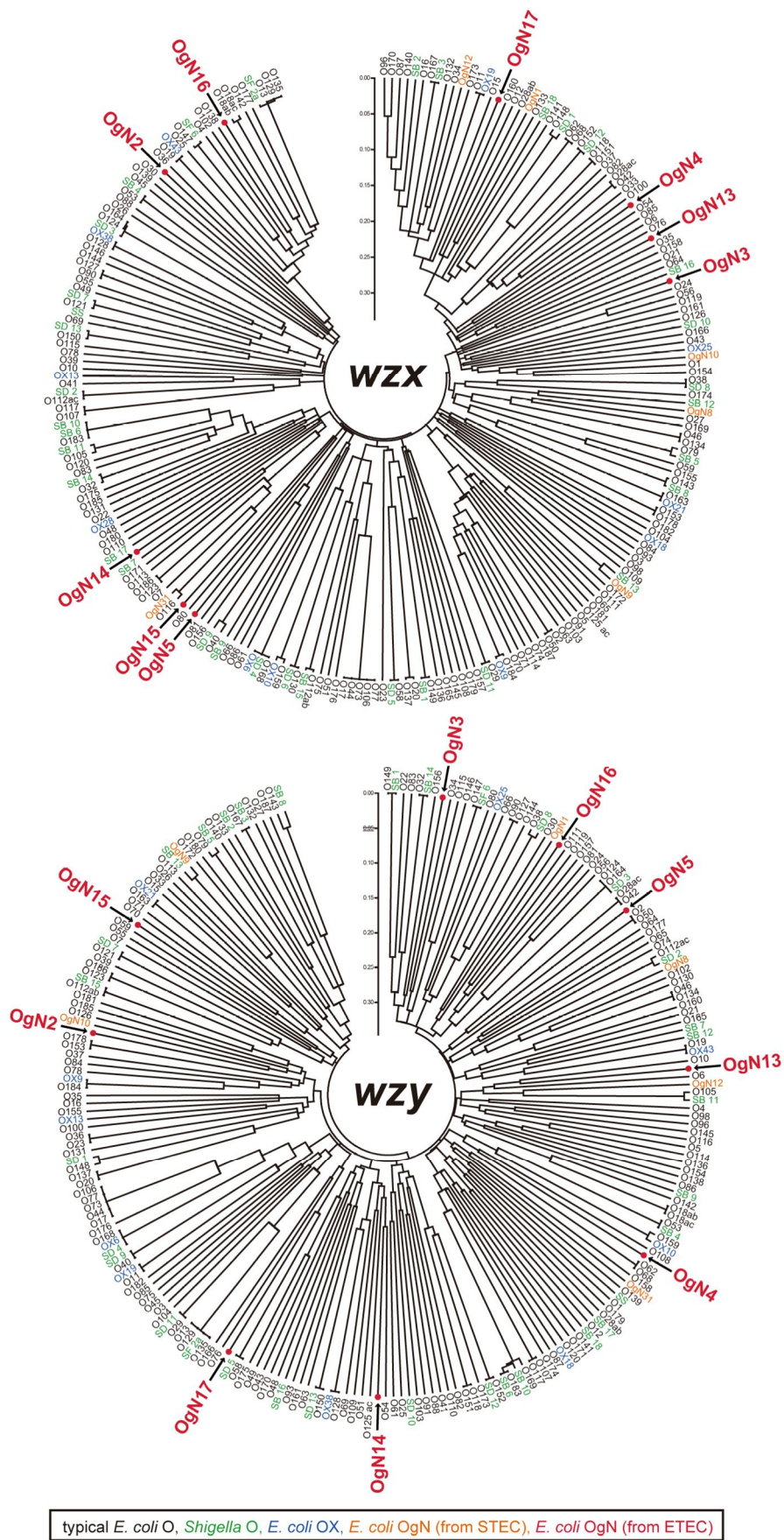


図5 . Og タイプの遺伝子マーカーとなる *wzx* および *wzy* の比較

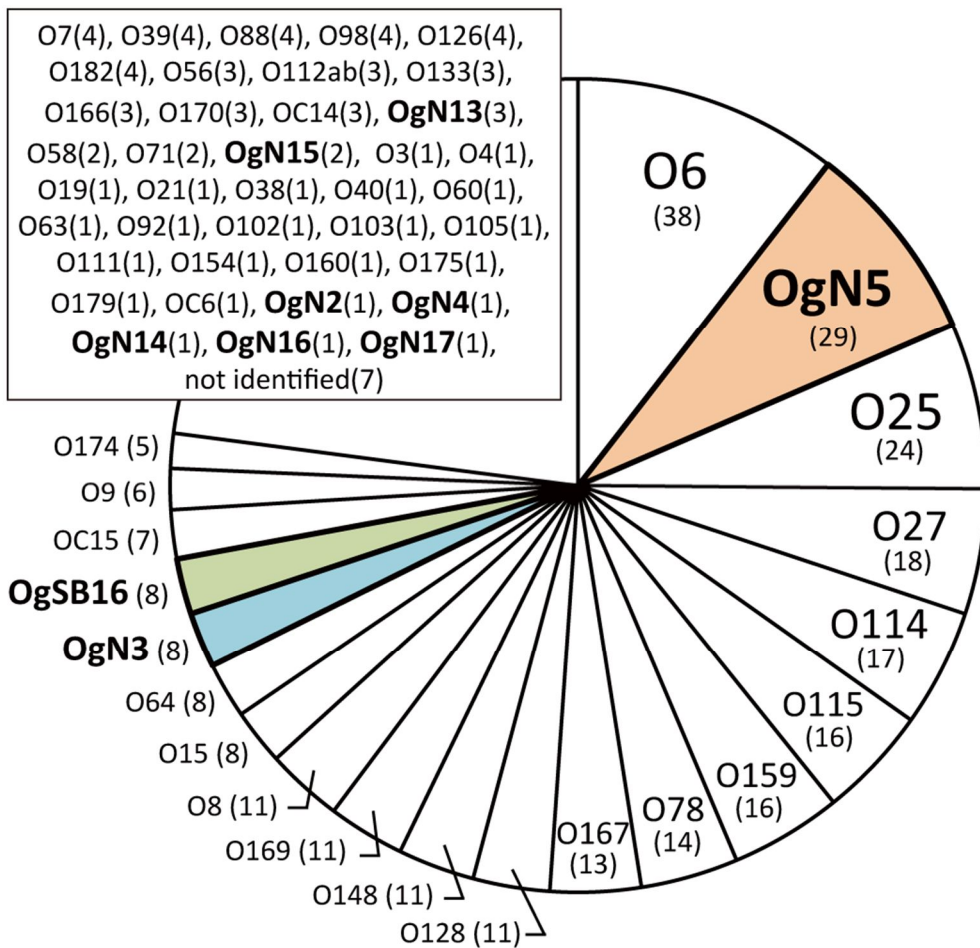


図 6. 海外分離株の新規 Og タイプを踏まえた分布

表 3. 3 種類の新規 Og タイプを判定する PCR プライマーセット

O genotype	Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Size (bp)
OgN3	OgN3_PCR_F	GCTTGGCATCGTTGGGGATA	wzy	189
	OgN3_PCR_R	TGCTACCAATCAGGCCGCTA		
OgN5	OgN5_PCR_F	GGTTTAAGCGACCCGTATCG	wzy	650
	OgN5_PCR_R	CCAATTCCAGCCAGTGATGAG		
OSB16	OgSB16_PCR_F	AACCGCAGTGGAAACTGCA	wzy	717
	OgSB16_PCR_R	AATTCCACATCAATCCACGGA		

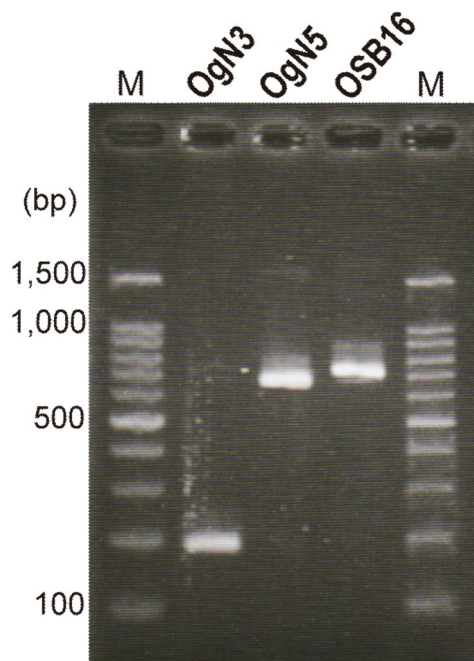


図 7. 3 種類の新規 Og タイプを判定する PCR 法の産物泳動像

表 4. 家畜および野生動物における ETEC 保菌調査

種類	検体数	陽性数 (コロニースweep PCR 法)			分離数		
		<i>lt</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>lt</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>
イノシシ	7	0	0	0	NT	NT	NT
シカ	114	6	1	10	1	1	7
牛	48	0	18	0	NT	7	NT
豚	9	1	3	0	0	2	NT